



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia
solanacearum* raça 2**

Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque

RECIFE-PE

2013

Grecy Mirian Rodrigues Albuquerque

**Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum*
raça 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

RECIFE-PE

2013

Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* raça 2

Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof^a. Dr^a. Elineide Barbosa de Souza – Orientadora

Prof^a. Dr^a. Rosa de Lima Ramos Mariano – Co-orientadora

RECIFE-PE

2013

Ficha Catalográfica

A345d Albuquerque, Greecy Mirian Rodrigues
 Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia*
solanacearum raça 2 / Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque.
-- Recife, 2013.
 63 f.

 Orientador (a): Elineide Barbosa de Souza.
 Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2013.
 Referências.

 1. *Musa* spp. 2. Filogenia 3. Filotipo 4. Sequevar 5. BOX-
PCR I. Souza, Elineide Barbosa de, orientador II. Título

CDD 632

Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* raça 2

Grecy Mirian Rodrigues Albuquerque

Dissertação apresentada e aprovada pela Banca Examinadora em 28 de fevereiro de 2013.

ORIENTADORA:

Prof.^a. Dr.^a. Elineide Barbosa de Souza

EXAMINADORES:

(Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara)

(Dr. Adriano Márcio Freire da Silva)

(Dr.^a. Kirley Michelly Marques da Silva)

Recife-PE

FEVEREIRO-2013

A minha querida família pelo amor, apoio, incentivo e confiança em todos os momentos da minha vida.

DEDICO

A Deus que me orientou e fortaleceu.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora pela presença constante em minha vida. Obrigada Senhor! Porque é meu amigo por que sempre contigo posso contar.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, pela formação oferecida no curso de Mestrado em Fitopatologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado.

A Prof^a Dr^a Elineide Barbosa de Souza, pela orientação neste e em outros trabalhos ao longo da minha vida Acadêmica, pelo exemplo de profissional, apoio, paciência, atenção, amizade, carinho e delicadeza.

A Prof^a Dr^a Rosa Mariano, pelas orientações, pelos conhecimentos repassados, minha iniciação científica, atenção e carinho, por seu olhar especial.

A minha família (mães, pai, irmãos, tios), força maior do meu caminhar, que esteve comigo em todos os momentos, amando, formando, orientando, ajudando e vibrando pelas conquistas.

Aos amigos do Laboratório de Fitobacteriologia, Kátia Cilene, Christianno Rollemberg, Edilaine Melo, Marco Aurélio, Marcos Araújo, Gabriela, Walquíria, Ivanise Viana, Myrzânia Guerra, Aldenir de Oliveira, Claudeana Souza, Jéssica e Meridiana pela amizade, apoio e ajuda em todos os momentos. E especialmente a Liliana Santos, Adriano Silva e Mirtis Midiam pela ajuda incondicional.

A Adriana Melo e Elizabete Rodrigues pela companhia e ajuda nos trabalhos.

As amigas companheiras de Curso Yrlânea, Luciana e especialmente Leila pela amizade, apoio, incentivo e companheirismo. A Renata Medeiros, Tássia Camila, Willams José pela amizade.

Ao amigo André Xavier que me iniciou na fitopatologia molecular. A Janaína Cortêz por toda experiência repassada, pelas orientações e amizade.

Aos funcionários e técnicos Darcy Martins, Romildo Angeiras, Luiz Coelho (Lula) e ao Sr. Luís, pela atenção, amizade e toda ajuda para realização deste trabalho.

A Dr^a Viviane Talamini da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros-Aracaju e a Dr^a. Rosalee Coelho do INPA/AM pela concessão de isolados utilizados neste trabalho.

Sumário

| | |
|--|----|
| RESUMO GERAL..... | x |
| ABSTRACT..... | xi |
| CAPÍTULO I | 12 |
| INTRODUÇÃO GERAL | 12 |
| A cultura da bananeira..... | 13 |
| Moko da bananeira e helicônia..... | 14 |
| Diversidade de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 19 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 25 |
| CAPÍTULO II | 33 |
| DIVERSIDADE DE ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>Ralstonia solanacearum</i> CAUSANDO MOKO | 33 |
| Resumo | 34 |
| Material e Métodos | 37 |
| Isolados bacterianos.. | 37 |
| Determinação do filotipo..... | 37 |
| Sequenciamento parcial do gene <i>egl</i> e filogenia..... | 38 |
| Avaliação da patogenicidade em plantas de bananeira e tomateiro.. | 38 |
| Análise da diversidade genética. | 39 |
| Perfil bioquímico..... | 40 |
| Resultados..... | 40 |
| Determinação do filotipo..... | 40 |
| Sequenciamento parcial do gene <i>egl</i> e filogenia..... | 41 |
| Avaliação da patogenicidade em plantas de bananeira e tomateiro.. | 41 |
| Análise da diversidade genética.. | 42 |
| Perfil bioquímico..... | 42 |

| | |
|-------------------------|----|
| Discussão | 43 |
| Agradecimentos.. .. | 47 |
| Literatura Citada | 47 |
| CONCLUSÕES GERAIS | 62 |

RESUMO GERAL

O Moko da bananeira e helicônia causado por *Ralstonia solanacearum* raça 2, biovar 1, é uma das principais doenças dessas culturas, em função dos riscos econômicos que representam para as regiões brasileiras, sobretudo para o Nordeste, principal produtor de banana do Brasil. *R. solanacearum* é uma praga quarentenária presente (A2) restrita aos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Pernambuco e Sergipe. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade de 38 isolados de bananeira e helicônias relacionados ao Moko, para caracterização de sua diversidade fenotípica, patogênica e genética e posicionamento filogenético. Todos os isolados foram caracterizados como filotipo II. A análise filogenética do gene *egl* revelou a presença das sequevares IIA-6 e IIA-24, já descritas para o Moko e de duas sequevares (IIA-41 e IIB-25) até então não relacionadas a esta doença, além de uma nova sequevar para o complexo *R. solanacearum* relacionada ao Moko, sendo proposta a denominação IIA-53. Todos os isolados foram patogênicos a bananeira e 12 também foram patogênicos ao tomateiro. A análise de BOX-PCR indicou alta diversidade na população, com a formação de 19 grupos sendo 13 constituídos, cada um por um único isolado. O perfil bioquímico obtido através do sistema Biolog[®] Gen III, também confirmou a alta diversidade entre os isolados.

Palavras-chave: *Musa* spp., filogenia, filotipo, sequevar, BOX-PCR

ABSTRACT

The Moko of banana and heliconia caused by *Ralstonia solanacearum* race 2 biovar 1 is a major disease of these crops, depending on the economic risks posed to the Brazilian regions, especially the Northeast, the largest producer of banana in Brazil. *R. solanacearum* is a quarantine pest present (A2) restricted to the states of Amapá, Amazonas, Pará, Pernambuco, Rondônia, Roraima and Sergipe. The objective of this study was to analyze the diversity of 38 isolates of banana and heliconia, to characterize their phenotypic, pathogenic, genetic diversity, and phylogenetic position. All isolates clustered in phylotype II. Phylogenetic analysis of *egl* gene revealed the presence of sequevars IIA-6 and IIA-24 already described for Moko and two sequevars (IIA-41 and IIB-25) not related to Moko till now but to solanaceas. A new sequevar for the *R. solanacearum* complex related to Moko was also proposed, IIA-53. All isolates were pathogenic to banana plants and 12 isolates were also able to cause wilt in tomato plants. The analysis of BOX-PCR showed high variability within the population, with formation of 19 groups, 13 of them consisting of a single isolated. The biochemical profiles obtained by Biolog[®] Gen III system also confirmed the high variability among isolates.

Keywords: *Musa* spp., phylogeny, phylotype, sequevar, BOX-PCR

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* raça 2

A cultura da bananeira

A bananeira (*Musa* spp.) é a frutífera tropical mais cultivada no mundo (NOMURA et al., 2010), tendo uma grande importância no cenário econômico mundial, tanto no que se refere à produção quanto à comercialização, caracterizando-se por ser cultivada durante todo o ano e pelo alto consumo, valor nutritivo e comercial de seus frutos, associado ao seu baixo custo de produção (AGRIANUAL, 2009).

A maioria das cultivares de banana tem seu centro de origem no continente Asiático, embora existam centros de origens secundários na África Oriental e Ilhas do Pacífico (DANTAS et al., 1999). Na literatura não existem relatos claros que indiquem como a cultura da banana foi introduzida no Brasil. No entanto, segundo Moreira e Cordeiro (2006) há indícios de que indígenas brasileiros já cultivavam a banana desde antes do ano de 1500, encontrados em cartas escritas por Pero Vaz de Caminha. Apesar da cultura da bananeira não ser originária do Brasil, a mesma é cultivada em todo o território nacional (SEBRAE, 2008).

Entre as frutas frescas que são comercializadas no mundo, a banana tem um papel de destaque, tendo sido a mais produzida em 2011, com uma produção de 106 milhões de toneladas, destacando-se a Índia como principal país produtor (SILVA NETO; GUIMARÃES, 2011). Em 2011, o Brasil foi o quinto maior produtor mundial, com produção de 7,3 milhões de toneladas, em 535 mil hectares de área cultivada (FAO, 2011). Segundo dados do IBGE (2012) a produção de bananas no Brasil teve um incremento de 2,6% entre os anos de 2009 e 2010, movimentando cerca de R\$ 3,7 bilhões, o que corresponde a 15,5% do valor total da produção de frutas do país. Em 2011, a região Nordeste foi responsável por 38,5% da produção brasileira, destacando-se os estados da Bahia, Pernambuco e Sergipe (IBGE, 2012).

As cultivares de banana, na sua maioria, apresentam três níveis cromossômicos distintos: diplóide, triplóide e tetraplóide, os quais correspondem, respectivamente, a dois, três e quatro múltiplos do número básico de 11 cromossomos ($x = n$). Essa evolução ocorreu a partir das espécies diploides selvagens *M. acuminata* Colla (AA) e *M. balbisiana* Colla (BB) (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955). Após o cruzamento

dessas duas espécies entre si resultou em uma mutação ocasionando o surgimento de indivíduos triploídes e tetraploídes (MANICA, 1997). A partir disso, foram definidos grupos genômicos que são as combinações variadas dos genomas de bananeiras demoninados pelas letras A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*), cujas combinações resultaram nos grupos descritos na Tabela 1 (CORDEIRO, 2000).

Tabela 1. Grupo genômico e subgrupo das principais cultivares de bananeiras plantadas no Brasil (SILVA et al., 2002).

| Grupo genômico | Subgrupo | Cultivares |
|----------------|-------------|---|
| AA | --- | Ouro |
| AAA | --- | Caipira |
| AAA | Cavendish | Nanica, Nanicão, Grande Naine, Williams |
| AAA | Gros Michel | Gros Michel, Highgate |
| AAB | --- | Maçã, Thap Maeo, Mysore |
| AAB | --- | Prata Anã ou Enxerto |
| AAB | Prata | Prata, Branca, Pacovan |
| AAB | Terra | Terra, Terrinha, Pacovaçu, D'Angola |
| ABB | Figo | Figo Vermelho, Figo Cinza |
| AAAA | Híbrido | IC-2 |

Embora o Brasil seja um potencial produtor e consumidor de banana, a bananicultura nacional sofre sérios problemas nas fases de produção e pós-colheita, o que é um fator limitante na sua inserção no mercado internacional (BUAINAIN; BATALHA, 2007). Um desses fatores é a perda em quantidade e qualidade dos frutos devido a problemas fitossanitários. Entre os problemas fitossanitários as doenças de origem fúngicas, como a sigatoka amarela, sigatoka negra e mal-do-panamá, e de origem bacterianas, como o Moko da bananeira, têm destaque relevante para cultura da bananeira (CORDEIRO, 2000).

Moko da bananeira e helicônia

Bananeiras triploides, helicônias e outras musáceas são infectadas por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., raça 2, biovar 1, causando Moko na bananeira e helicônia (HAYWARD, 1994).

Essa bactéria tem sido descrita como um dos patógenos bacterianos mais importantes do mundo, capaz de causar danos em cerca de 450 espécies de plantas pertencentes a mais de 54 famílias botânicas, entre as quais, culturas de alto valor econômico, como banana, tomate (*Solanum lycopersicum* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.) (XU et al., 2009).

Ralstonia solanacearum pertence ao reino Procariotae, divisão Bacteria, classe Proteobacteria, subclasse β -Proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae (YABUUCHI et al., 1995). É um fitopatógeno vascular, habitante do solo, gram-negativo, não formador de esporo. Suas colônias podem apresentar dois tipos morfológicos, em placas de agar: fluida ou mucoide e afluída ou não mucoide (EPPO, 2004; KELMAN, 1953). Em meio de cultura de Kelman contendo tetrazólio, isolados virulentos apresentam colônias brancas com centro róseo (Figura 1), e vermelhas nos avirulentos (KELMAN, 1954).

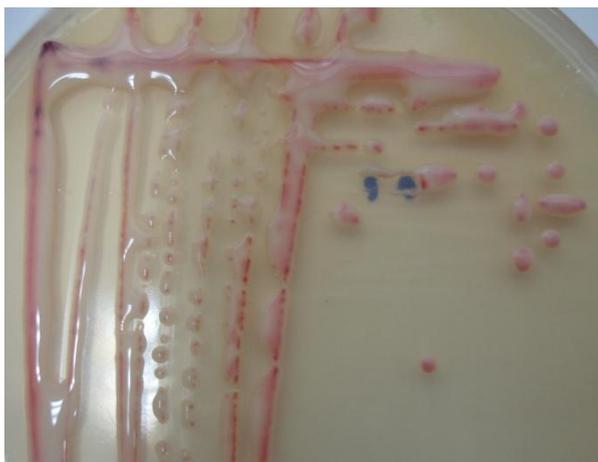


Figura 1. Colônias avirulentas de *Ralstonia solanacearum* exibindo bordas brancas e centro róseo.

A célula bacteriana tem a forma de bastonete, reto ou levemente curvo, medindo aproximadamente 0,5-1,0 x 1,5-3,0 μm e não produz pigmento fluorescente. Isolados virulentos são essencialmente não flagelados e não móveis, enquanto os isolados avirulentos são móveis por meio de 1 a 4 flagelos polares. Produzem poli- β -hidroxi-

butirato (MEHAN et al., 1994), apresentam metabolismo oxidativo e geralmente são aeróbios estritos. Alguns isolados podem reduzir nitrato a nitrito e produzir gás a partir de nitrato. Não hidrolisam o amido, caseína e arginina diidrolase e hidrolisam fracamente a gelatina. São oxidase e catalase positivos, e lipase negativos; não utilizam arginina ou betaína como única fonte de carbono. Crescem na faixa de 25 a 35°C, variando de acordo com os isolados; os provenientes de áreas tropicais apresentam temperatura ótima na faixa de 35°C. Seu crescimento é inibido em meio ácido e favorecido em condições alcalinas. Tolerante a sais, podendo crescer em NaCl a 1% em meio líquido, com pouco ou nenhum crescimento em NaCl 2% (EPPO, 2004; KELMAN, 1953; MEHAN et al., 1994).

O fitopatógeno está presente em vários países como: Belize, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Granada, Guatemala, Guiana, Honduras, Jamaica, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname, EUA e Venezuela, nas Américas; Etiópia, Líbia, Malawi, Nigéria e Senegal na África e Índia, Filipinas, Indonésia, Malásia, Tailândia e Vietnã, na Ásia (OEPP/EPPO, 2006) No entanto, apesar do agente etiológico estar presente em diversas áreas produtoras, a doença possui uma distribuição restrita (CORDEIRO, 2000). Tal fato se deve à presença de linhagens do patógeno que não atacam a bananeira, ficando a doença restrita ao hemisfério ocidental e Filipinas (WICKER et al, 2007).

Segundo relatos, o Moko da bananeira surgiu na Guiana por volta de 1840 (CORDEIRO, 2000) e, posteriormente, ocasionou problemas em plantios de Trindad e Tobago. No Brasil, o primeiro registro da doença foi oficialmente confirmado no ano de 1976, no então Território Federal do Amapá (estado do Pará) (TOKESHI; DUARTE, 1976). Posteriormente, o Moko foi relatado em alguns estados da região Norte (Amazonas, Pará, Rondônia, Amapá, Roraima) (MAPA, 2007; COELHO NETO et al., 2004; LINS; COELHO, 2004; ZAMBOLIM et al, 2002). No Nordeste, também foram detectados focos da doença em bananeira nos estados da Paraíba, Ceará (PONTES; FREIRE, 1972), Alagoas e Sergipe (ANDRADE et al., 2009; TAKATSU, 2001).

Em helicônias, o Moko foi assinalado pela primeira vez no Brasil em Pernambuco, no ano 2000 (ASSIS et al., 2000). A doença também foi detectada no Distrito Federal em helicônias e musáceas ornamentais (ZOCCOLI et al., 2009).

Atualmente, *R. solanacearum* é uma praga quarentenária presente (A2) no Brasil restrita aos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Pernambuco e

Sergipe (MAPA - Instrução Normativa Nº 52 de 20/11/2007). Esse organismo também é considerado praga quarentenária pela legislação Europeia e é tratado como potencial agente de bioterrorismo nos Estados Unidos da América (AILLOUD et al., 2012).

A sintomatologia do Moko da bananeira depende da idade da planta, da cultivar de bananeira, isolado envolvido e das condições ambientais (CORDEIRO, 2000). Os sintomas da doença manifestam-se principalmente por murcha das plantas em qualquer fase do ciclo vegetativo. Em plantas que ainda não entraram na fase de produção, pode ocorrer amarelecimento e necrose das folhas, iniciando-se pelas mais centrais e evoluindo para as demais (Figura 2A). As folhas podem curvar-se dorsalmente, provocando a quebra do pecíolo (Figura 2A), sendo a folha mais velha a última a sucumbir. Em brotações novas, surgem sintomas de enegrecimento e distorção foliar. Em cachos de plantas infectadas, ocorre o amadurecimento prematuro de frutas de forma isolada. O amarelecimento externo é acompanhado internamente por uma podridão seca, rígida e de coloração parda seguindo-se de escurecimento e apodrecimento (Figura 2B) (AGRIOS, 2005; CORDEIRO, 2000). No sistema radicular observa-se apodrecimento das raízes, as quais se tornam escuras (CORDEIRO, 2000).



Figura 1. Sintomas do Moko da bananeira: (A) plantas murchas, amarelecimento, necrose, seca das folhas e quebra do pecíolo; (B) frutas com podridão seca.

Os sintomas internos em bananeira caracterizam-se por uma descoloração vascular no rizoma, pseudocaule, engajo, ráquis femininas e nos frutos. No rizoma observa-se descoloração dos feixes vasculares na região central, representada por

pontuações avermelhadas dispersas (CORDEIRO, 2000). No pseudocaule ocorre escurecimento vascular, não localizado, caracterizado por pontuações escurecidas (PEREIRA et al., 2000). No engaço e nas ráquis o escurecimento vascular é caracterizado por pontuações avermelhadas distribuídas por toda sua extensão (GONDIM; CAVALCANTE, 2001).

Em plantas adultas de helicônias, ocorre amarelecimento que geralmente se inicia pelas folhas centrais, progredindo para murcha e seca da planta. Observa-se escurecimento da parte central do pseudocaule e do rizoma, os quais cortados evidenciam exsudação bacteriana. Nas brotações, as folhas ainda enroladas, apresentam deformação, amarelecimento e necrose que impedem o desenvolvimento, seguindo-se o colapso e morte da planta (MARIANO et al., 2007/2008; ZOCCOLI et al., 2009). Nas áreas de plantios comerciais a doença geralmente ocorre em reboleiras (ZOCCOLI et al., 2009).

Ralstonia solanacearum raça 2 invade os tecidos vasculares das plantas através de ferimentos nas raízes e nos tecidos de emergência de raízes secundárias (VASSE; FREY; TRIGALET, 1995). Após dois a três dias, o córtex já se apresenta inteiramente colonizado, juntamente com o parênquima vascular e os vasos do xilema (SAILE et al., 1997). A presença do crescimento bacteriano e a produção de exopolissacarídeo (EPS), principal fator de virulência deste fitopatógeno, interrompem o fluxo de água das raízes às folhas, o que resulta na redução do transporte de água ocasionando a murcha da planta por estresse hídrico (HIKICHI et al., 2007). O sucesso da infecção e posterior colonização, assim como intensidade do ataque, podem variar dependendo da susceptibilidade da planta, da virulência dos isolados e de fatores ambientais favoráveis (CORDEIRO, 2000). A presença da bactéria no xilema indica que o movimento da mesma ocorre através do fluxo de água (GONZÁLEZ; ARIAS; PETEIRA, 2009).

A disseminação da doença pode ser de diferentes formas, entre as quais se destacam o uso de ferramentas infectadas durante os tratos culturais, contato entre raízes e solo/raiz, mudas infectadas, água de superfície, insetos visitantes de inflorescências, como as abelhas (*Trigona* spp.), vespas (*Polybia* spp.) e moscas das frutas (*Drosophila* spp.) (CORDEIRO, 2000), nematóides e o homem (KELMAN et al., 1994).

A sobrevivência de *R. solanacearum* é favorecida por condições de umidade elevada do solo, enquanto períodos secos reduzem a viabilidade do patógeno e diminuem a intensidade da doença (HAYWARD, 1991). No estado do Amazonas, o

Moko está associado a plantações de banana sujeitas a inundações periódicas (COELHO NETTO; NUTTER JR., 2005). Em cultivo de banana, na ausência da planta hospedeira, a sobrevivência do patógeno diminui com o tempo, não dependendo do tipo de solo (PEREIRA; NORMANDO, 1993). A presença de plantas voluntárias e plantas daninhas hospedeiras permitem a multiplicação e sobrevivência da bactéria por muitos anos no solo, por contribuírem como fonte alternativa de inóculo e para manutenção dos níveis da bactéria no solo (JABUONSK; HIDALGO, 1987).

O controle do Moko é extremamente difícil, principalmente devido a ampla gama de hospedeiras, alta variabilidade genética do patógeno e a sobrevivência no solo por longos períodos, tornando o controle químico inviável e anti-econômico (LOPES, 1994). Dessa forma, impedir a entrada da doença na área de cultivo, proceder à detecção precoce e a rápida erradicação das plantas infectadas, podem auxiliar no convívio com a doença, mantendo-a em baixa incidência no campo. No entanto, a detecção de *R. solanacearum* em plantas assintomáticas e hospedeiras alternativas é dificultada, devido à falta de um sistema de detecção eficiente, assim como, inspeção do campo por profissionais qualificados (PINHEIRO, 2010).

Diversidade de *Ralstonia solanacearum*

Estudos têm mostrado que os diferentes processos seletivos ocorridos nas populações bacterianas têm elevado a diversidade genética. A distância geográfica também tem provocado divergências, uma vez que, pode influenciar na variação e na estrutura genética da população, devido à redução no fluxo gênico (LIU et al., 2009; NORMAN et al., 2009; TOUKAM et al., 2009). Além disso, a capacidade natural de troca de material genético por meio de transferência horizontal de genes, durante o processo de infecção de *R. solanacearum*, também contribui para a alta diversidade encontrada (BERTOLLA et al., 1999).

Ralstonia solanacearum é classificada ao nível infraespecífico em cinco raças (HE; KELMAN; SEQUEIRA, 1983) e seis biovars (HAYWARD, 1964). As raças são diferenciadas pela gama de hospedeiros (HE; KELMAN; SEQUEIRA, 1983). A raça 1 compreende isolados que infectam o maior número de culturas, desde solanáceas a outras plantas, destacando-se bananeiras ornamentais (*Musa* sp.), helicônia (*Heliconia* spp.) e a ornamental ave do Paraíso (*Strelitzia reginae* Banks). Já na raça 2 encontram-

se os isolados que afetam as bananeiras triplóides (banana comestível e banana subgrupo Terra ou Plátano) e helicônias (HAYWARD, 1994); enquanto que na raça 3 estão os isolados que colonizam especificamente a batata e ocasionalmente tomate, mas não colonizam outras culturas (BUDDENHAGEN; SEQUEIRA; KELMAN, 1962). As raças 4 e 5 infectam o gengibre (*Zingiber officinale* L.) e a amoreira (*Morus nigra* L.), respectivamente (HAYWARD, 1994).

Com relação à raça 2, causando Moko em banana, banana subgrupo Terra e helicônia na América Central e do Sul, foram definidos cinco grupos ou ecotipos com características de especificidade, agressividade e/ou virulência diferenciadas (FRENCH; SEQUEIRA, 1970). Grupo A, proveniente da Bacia Amazônica, ocorre nas margens de rios sujeitas a inundações e pode ser transmitido por insetos; Grupo D, provoca distorção das plantas e murcha lenta em bananeiras; Grupo B, da banana, é altamente virulento, induzindo murcha rápida, tem capacidade de infectar brácteas florais e sobreviver no solo; Grupo H, de helicônias; e Grupo SFR, apresenta colônias pequenas, fluídas e redondas, é altamente virulento a banana e transmitida por insetos, tem alta capacidade invasora de brácteas florais e sobrevive no solo (FRENCH; SEQUEIRA, 1970).

A classificação de acordo com a biovar é definida através da utilização de açúcares (dextrose, maltose, lactose, celobiose e trealose) e álcoois (manitol, sorbitol, dulcitol) como fonte de carbono e formação de ácidos, a partir dessas fontes, aliada a redução de nitrato a nitrito e produção de gás a partir de nitrato, sendo classificados em seis biovars (HAYWARD, 1964; HE; KELMAN; SEQUEIRA, 1983). A biovar 1 não utiliza nenhum desses compostos, em contrapartida, todos são utilizados pela biovar 3. A biovar 2 foi subdividida em: 2A (A para Andes) que ocorre em regiões com elevada altitude e 2T (T para tropical) que ocorre em regiões com baixa altitude, também conhecida como biovar N2 (HAYWARD, 1994).

Atualmente *R. solanacearum* é considerada um complexo de espécies, o qual é definido como um grupo de isolados relacionados, cujos membros individuais podem representar mais de uma espécie. *Ralstonia syzigii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al., agente causal da “doença de Sumatra do cravo da Índia” em Java e Sumatra e a ‘Blood disease bacterium’ (BDB) que ocorre na Indonésia, também participam deste complexo (FEGAN; PRIOR, 2005), no entanto, suas ocorrências nunca foram relatadas no Brasil. Estudos recentes têm sugerido que esse complexo teria se originado na região da

Oceania/Indonésia, posteriormente migrado para a África, e de lá para a América do Sul (possivelmente antes da fragmentação do continente ancestral Gondwana) e Ásia (WICKER et al., 2012). Considerando estudos de hibridação DNA-DNA (ROBERTS et al., 1990; VANECHOUTTE et al., 2004), Remenant et al. (2012) concluíram que o complexo é polifilético, apresentando três grupos de estirpes que excedem o limite aceito para especiação, e propõem além de *R. solanacearum*, a criação de duas novas espécies (*Ralstonia sequeirae* e *R. haywardii*) e três subespécies (*Ralstonia haywardii* subsp. *celebensis*, *R. haywardii* subsp. *solanacearum*, *R. haywardii* subsp. *syzygii*).

A taxonomia infraespecífica de *R. solanacearum* sofreu um processo de revisão que tem permitido o estudo do relacionamento filogenético, evolutivo e da variabilidade deste complexo (SILVEIRA et al., 2005). Inicialmente técnicas moleculares que formam “*fingerprint*” genético, tais como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) e rep-PCR (Repetitive element sequence based-polymerase chain reaction– Reação em cadeia da polimerase baseada em sequências de elementos repetitivos) foram utilizados nesses estudos (GARCIA, 2011). Outras técnicas utilizadas para esclarecer a filogenia deste complexo de espécies, como o sequenciamento da região ITS (16S-23S rRNA), do gene *hrpB* e do gene da endoglucanase (*egl*) (FEGAN; PRIOR, 2006; WICKER et al., 2007) têm sido utilizadas.

A partir de análises de RFLP, 33 grupos ou genótipos de *R. solanacearum* correspondendo a duas divisões distintas (I e II) fortemente relacionadas a origem geográfica dos isolados foram obtidas por Cook et al. (1989, 1991) e Gillings e Fahy (1994). A divisão I compreendeu isolados principalmente da Ásia, da raça 1 e biovars 3, 4 e 5. A divisão II isolados originados das Américas, pertencentes às biovars 1 (raças 1 e 2) e 2 (raça 3, exceto biovar N2). Taghavi et al. (1996) baseado no sequenciamento da região 16S do rDNA subdividiu a divisão II nas subdivisões 2a (isolados da América) e 2b (isolados de *R. syzygii* e BDB). Esta divisão foi expandida por Poussier et al. (2000) para 2c, composta principalmente de isolados africanos. Fegan e Prior (2005) também relataram a existência de um grupo composto por isolados da Indonésia, através de análises da região ITS (Internal transcribed spacer) e do gene *egl*. Segundo Villa et al. (2003), isolados asiáticos ainda poderiam ser subdivididos em três grupos.

Uma nova classificação hierárquica foi proposta por Fegan e Prior (2005) a partir do sequenciamento da região ITS (rRNA 16S-23S), dos genes *egl* e *MutS* com isolados das cinco raças, sendo subdivididos em quatro níveis taxonômicos: espécie, filotipo, sequevares e clones (Tabela 2).

TABELA 2. Esquema de classificação hierárquica de *Ralstonia solanacearum* segundo Fegan e Prior (2005).

| Nível taxonômico | Equivalência taxonômica | Nomenclatura | Método de identificação |
|------------------|-----------------------------|--|--|
| Espécie | Espécie | complexo <i>Ralstonia solanacearum</i> | PCR- oligonucleotídeos específicos |
| Filotipo | Subespécie | Filotipos (I a IV) | PCR Multiplex (ITS) |
| Sequevar | Grupo Infrasubespecífico | Sequevar (1 a 52) | Sequenciamento genes <i>egl</i> , <i>hrpB</i> e/ou <i>MutS</i> |
| Clone | Linha clonal | | Fingerprinting do genoma (rep-PCR, RAPD, AFLP...) |

Ralstonia solanacearum atualmente é subdividida em quatro filotipos, correspondentes aos quatro grupos genéticos identificados através de análise de sequência da região ITS, dos genes *hrpB* e *egl*, relacionados à origem geográfica do isolado. O filotipo I equivale a divisão I de Cook et al. (1989) e biovares 3, 4 e 5, provenientes principalmente da Ásia; filotipo II corresponde à divisão II, que inclui as raças 2 e 3 e as biovares 1, 2 e N2; filotipo III é constituído por isolados oriundos principalmente da África e ilhas vizinhas, com isolados pertencentes às biovares 1 e N2; filotipo IV contém isolados principalmente da Indonésia, mas também da Austrália e Japão, das biovares 1, 2 e N2, além de *R. syzygii* e a BDB (FEGAN; PRIOR, 2005).

Cada filotipo é composto por certo número de variantes de sequência ou sequevares, já tendo sido descritas 52 sequevares (TOUKAM et al., 2009). As sequevares, determinadas por relacionamento filogenético dos genes *egl*, *hrpB* e/ou *MutS*, só podem ser definidas se dois ou mais isolados sequenciados tiverem sequências similares (FEGAN; PRIOR, 2005; VILLA et al., 2005; WICKER et al., 2007; XU et al., 2009). Filotipos e sequevares da raça 2 podem ainda, ser identificados por meio de PCR

Multiplex, uma variação da PCR que permite a amplificação simultânea de diferentes sequências com a utilização de múltiplos iniciadores por reação, com os oligonucleotídeos iniciadores da série *Nmult e Mus*, respectivamente (FEGAN; PRIOR, 2005).

A classificação em Filotipo/sequevar aceita pela comunidade científica é a que melhor reflete a variabilidade deste complexo, sendo a raça 2 correspondente ao filotipo II, sequevares 2, 3, 4, 6, 24 (CELLIER; PRIOR, 2010; FEGAN; PRIOR, 2006; FEGAN; PRIOR, 2005). Fegan e Prior (2006) propuseram a divisão do filotipo II em dois subclusters distintos. As sequevares 3 e 4 ficaram contidas no subcluster B, e a sequevar 6 no subcluster A. Neste subcluster, também foram agrupados dois isolados da raça 2 provenientes do Brasil (ICMP6782 e ICMP9600), que foram classificados como sequevar 24. Dessa forma, as sequevares 6 e 24 são estreitamente relacionadas e pertencem ao filotipo IIA e as sequevares 2, 3 e 4, ao filotipo IIB (CELLIER; PRIOR, 2010; FEGAN; PRIOR, 2006). Esta classificação está de acordo com a proposta de Cook et al. (1989) que dividiu a raça 2, nos grupos MLG 24 (Sequevar 3), 25 (Sequevar 4) e 28 (Sequevar 6), correspondendo a divisão II que engloba isolados originados das Américas. A correspondência das sequevares 2 e 24 com os grupos MLG é desconhecida.

Wicker et al. (2007) analisaram uma população de 119 isolados de *R. solanacearum* obtidos de diferentes culturas na Martinica e verificaram que isolados provenientes das famílias Cucurbitaceae, Heliconiaceae e de tomate, pertenciam a sequevar 4. Esses isolados foram altamente patogênicos ao tomate, pimentão e berinjela e incapazes de causar murcha em bananeiras, apenas de ocasionar infecção latente. Esses isolados constituíram uma variante da sequevar 4 e foram denominados de filotipo II/4NPB, onde NPB significa não patogênico a bananas. Apesar de serem filogeneticamente indistinguíveis de outros membros do filotipo IIB/4, os isolados patogênicos da Martinica dentro deste grupo são claramente diferentes dos que causam Moko em bananas, sequevar 4 (MLG25).

Fegan e Prior (2006) verificaram que isolados da Biovar 1 que causam doença em batata e tomate agruparam-se com os isolados do subcluster A da raça 2. Da mesma forma, foi verificado o agrupamento de isolados patogênicos a bananeira do subgrupo B com outros de biovares 2 (raça 3) e 2T que causam doenças em batata. Um maior relacionamento das sequevares da raça 2 com isolados da biovar 1 (outra raça) que

causam doenças em tomate e batata no subcluster A, também foi verificado pelas análises de RFLP de Cook et al. (1989).

Cardozo et al. (2009), encontraram alta variabilidade em isolados de *R. solanacearum* obtidos de bananeira e helicônia da região de Urabá na Colômbia, ao determinarem a sequevar para apenas 14 isolados da raça 2, de um total de 25 avaliados, através de PCR Multiplex. Os isolados pertenceram as sequevars 4 (patogênicas a banana) e 6. Nenhum isolado da sequevar 3 foi diagnosticado, o que foi considerado inesperado, uma vez que esta sequevar está presente no Panamá, que faz fronteira com a região onde os isolados foram obtidos.

Além das classificações descritas anteriormente, os isolados de *R. solanacearum* podem ser diferenciados em: linhas clonais, determinadas por técnicas de *fingerprints*, a partir de rep-PCR, RAPD e AFLP (HORITA; TSUCHIYA, 2001; IVEY et al., 2007); em biotipos (1 a 11), com base em testes bioquímicos, relacionados às sequevars (FEGAN; PRIOR, 2005); pulsotipos, considerando-se análises de eletroforese de campo pulsado (STEVEN; VAN ELSAS, 2010); e grupos de virulência, patogenicidade a hospedeiros específicos (FEGAN; PRIOR, 2006).

A técnica de rep-PCR tem sido empregada com sucesso em estudos de variabilidade genética de *R. solanacearum*, distinguindo isolados de diferentes origens geográficas, biovars e hospedeiras (COSTA et al., 2007; HORITA; TSUCHIA, 2001; SILVEIRA et al., 2005; KUMAR et al., 2004). A utilização desta técnica para estudos de diversidade tem sido justificada pelo alto grau de conservação evolucionária dos elementos repetitivos e por isso, pode ser aplicada para estudos de variabilidade, mesmo para o complexo *R. solanacearum* (NORMAN et al., 2009; KUMAR et al., 2004; HORITA; TSUCHIYA, 2001). Os elementos ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e BOX possuem sequências de 124-127 pb e 154 pb, respectivamente. Estas sequências parecem estar localizadas em posições distintas ao longo do cromossomo, apresentando alguma importância na organização do genoma bacteriano (VERSALOVIC et al., 1994).

Pouco é conhecido sobre a diversidade genética, filogenética e fenotípica de isolados do Moko em bananeira e helicônia, no Brasil. Dessa forma, estudos de diversidade da raça 2 são necessários e os mesmos devem ser realizados em diferentes Agroecossistemas, uma vez que acredita-se que a variabilidade desta raça seja alta na América do Sul e esteja subestimada (FEGAN; PRIOR, 2006).

Diversos estudos de variabilidade e diversidade genética de isolados brasileiros de *R. solanacearum* têm sido realizados (COSTA et al., 2007; SILVEIRA et al., 2005; BRINGEL et al., 2004). A maioria, no entanto, está relacionado à raça 1 do patógeno. Há apenas um estudo que avaliou um maior número de isolados da raça 2 do Brasil, 19 isolados, onde foram determinados filotipos e sequevares. Todos os isolados foram identificados como filotipo II, e por PCR Multiplex com os oignonucleotídeos iniciadores da série *Mus*, três foram classificados como sequevar 6, enquanto os demais tiveram a sequevar indeterminada (PINHEIRO et al. 2011).

Considerando o número reduzido de informações atualizadas sobre isolados brasileiros de *R. solanacearum* relacionados ao Moko, o objetivo deste estudo foi analisar a diversidade fenotípica, patogênica e genética, bem como a posição filogenética de 55 isolados de *R. solanacearum* causando Moko.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2009.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 922p. 2005.
- AILLOUD, F.; CELLIER, G.; YAHIAOUI, N.; REMENANT, B.; ALLEN, C.; PRIOR, P. Banana Moko disease and diversity of its unpredictable causative agent *Ralstonia solanacearum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 45., 2012, Manaus. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2012. CD-ROM 2.
- ANDRADE, F. W. R.; AMORIM, E. P. R.; ELOY, A. P.; RUFINO, M. J. Ocorrência de doenças em bananeiras no Estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 305-309, 2009.
- ASSIS, S. M. P.; ROSA, R. C. T.; MARIANO, R. L. R. Ocorrência de *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em helicônia no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 319, 2000 (suplemento).
- BERTOLLA, F.; FROSTEGARD, A.; BRITO, B.; NESME, X.; SIMONET, P. During infection of its hosts, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, n. 5, p. 467-472, 1999.
- BRINGEL, J. M.; BEDENDO, I.; GUIMARÃES, P. M.; LOPES, C. A. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 isolates of potato and eggplant from Brazil by PCR. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 30, n. 3, p. 350-355, 2004.
- BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. (Coord.) **Cadeia produtiva de frutas**. Brasília: MAPA/SPA, 2007. 102 p. (Série Agronegócios, 7)

BUDDENHAGEN, I. W.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 52, n.7, p. 726, 1962.

CARDOZO, C.; RODRÍGUEZ, P.; MARÍN, M. Molecular characterization of the *Ralstonia solanacearum*/ species complex in the banana growing region of Uraba. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 27, p. 203-210, 2009.

CELLIER, G.; PRIOR, P. Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 11, p. 1250-1261, 2010.

COELHO NETTO, R. A.; PEREIRA, B. G.; NODA, H.; BOEHER, B. Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3/4, p. 21-27, 2004.

COELHO NETTO, R. A.; NUTTER Jr., F. W. Use of GPS and GIS technologies to map the prevalence of Moko disease of banana in the amazon region of Brazil. p.431-436. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Ed.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p. 431-436.

COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 2, n. 3, p. 113-121, 1989.

COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. DNA probes as tools for the study of host-pathogen evolution: the example of *Pseudomonas solanacearum*. In: HENNEKE, H.; VERMA, D. P. S. (Eds.). **Advances in Molecular Genetics of Plant-Interactions**, v.a. Kluwer: The Netherlands, 1991, p. 103-108.

CORDEIRO, Z. J. M (org.). **Banana: Fitossanidade**. Brasília: Embrapa para transferência de Tecnologia, 2000. 121p. (Frutas do Brasil, 8).

COSTA, S. B.; FERREIRA, M. A. S. V.; LOPES, C. A. Diversidade patogênica e molecular de *Ralstonia solanacearum* da região amazônica brasileira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 285-294, 2007.

DANTAS, J. L. L.; SHEPHERD, K.; SILVA, S. O.; SOARES FILHO, W. S. Classificação botânica, origem, evolução e distribuição geográfica. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da banana: Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. p. 27-34.

EPPO. Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe. *Ralstonia solanacearum* race 2. France: European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2006. Disponível em:

<<http://pqr.eppo.org/datas/PSDMS2/PSDMS2.pdf>>. Acesso em: 05 fev. 2013.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex?

In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. Saint. Paul: APS Press, 2005, p. 449-461.

FEGAN, M.; PRIOR, P. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. **Australasian Plant Pathology**, Orange, v. 35, n. 1, p. 93-101, 2006.

FAO- Fao-Food and Agriculture Organization. Faostat. 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 03 fev. 2013.

FRENCH, E.R.; SEQUEIRA, L. Strains of *Pseudomonas solanacearum* from Central and South America: a comparative study. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 3, p. 506-512, 1970.

GARCIA, A. L. **Diversidade populacional de *Ralstonia solanacearum* em pimentão no estado de Pernambuco e controle de murcha bacteriana**. 2011, 96f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

GILLINGS, M. R.; FAHY, P. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* biovar and N2 assessed using restriction endonuclease analysis of total genomic DNA. **Plant Pathology**, London, v. 42, n. 55, p. 744-753, 1994.

GONDIM, T. M. S.; CAVALCANTE, M. J. B. **Como produzir banana**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2001. 31 p. (Embrapa Acre. Documentos, 44).

GONZALEZ, I.; ARIAS, Y.; PETEIRA, Y. Interacción planta-bacterias fitopatógenas: caso de estudio *Ralstonia solanacearum*- plantas hospedantes. **Revista de Protección Vegetal**, La Habana, v. 24, n. 2, p. 69-80, 2009.

HAYWARD, A. C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 265-277, 1964.

HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 65-87, 1991.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.) **Bacterial wilt - The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994, p. 9-24.

HE, L. Y.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 12, p. 1357-1361, 1983.

HIKICHI, Y.; YOSHIMUCHI, T.; TSUJIMOTO, S.; SHINOHARA, R.; NAKAHO K.; KANDA, A.; KIBA, A.; OHNISHI, K. Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 24, n. 1, p. 149-154, 2007.

HORITA, M.; TSUCHIYA, K. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia*

solanacearum. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 4, p. 399-407, 2001.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.

Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro: IBGE,

2012. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201202.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2013.

IVEY, M. L. L.; GARDNER, B. B. M.; OPINA, N.; MILLER, S. A. Diversity and geographic distribution of *Ralstonia solanacearum* from eggplant in the Philippines.

Phytopathology, Saint Paul, v. 97, n. 11, p. 1467-1475, 2007.

JABUONSKI, R. E.; HIDALGO, O. A. Doenças bacterianas. In: REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Coord.). **Produção de batata**. Brasília: Linha Gráfica. 1987. p.85-93.

KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: A literature review and bibliography. **Agricultural Experiment Technical Bulletin**, North Carolina, 1953. 194p.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 44, n. 12, p. 693-695, 1954.

KELMAN, A.; HARTMAN, G. L.; HAYWARD, A. C. 1994. Introduction. p.1-7. In: Hayward, A.C., G.L. Hartman (eds.). 1994. Bacterial wilt The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford: CAB International

KUMAR, A.; SARMA, Y. R.; ANANDARAJ, M. Evaluation of genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of ginger using REP-PCR and PCR-RFLP. **Current Science**, Bangalore, v. 87, n. 11, p. 1555-1561, 2004.

LIU, Y.; KANDA, A.; YANO, K.; KIBA, A.; HIKICHI, Y.; AINO, M.; KAWAGUCHI, A.; MIZOGUCHI, S.; NAKAHO, K.; SHIOMI, H.; TAKIKAWA, Y.; OHNISHI, K. Molecular typing of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum* in relation to the ability to induce a hypersensitive reaction in tobacco. **Journal of General Plant Pathology**, Dordrecht, v. 75, n. 5, p. 369-380, 2009.

LOPES, C. A. Situação da murcha bacteriana da batata no Brasil. In: LOPES, C. A.; ESPINOZA, N. R. (Eds.). **Enfermedades bacterianas de la Papa: Memorias del taller sobre enfermedades bacterianas de la Papa**. Lima: Centro Internacional de la Papa. 1994. p.7-9.

MANICA, I. **Fruticultura tropical 4**, Banana. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. 485p.

MAPA. **Instrução Normativa Nº 52** de 20/11/2007. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislação.do/>>. Acesso em 28 jan. 2013.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; AMORIM, E. P. R. Murcha-bacteriana da bananeira e helicônias. **Ciência Agrícola**, Maceió, v. 8, n. 1, p. 115-125. 2007/2008.

MEHAN, V. K.; LIAW, B. S.; TAN, Y. J.; ROBINSON-SMITH, A.; MCDONALD, D.; HAYWOD, A. C. **Bacterial wilt of Groundnut**. Patancheru: Internacional Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1994, n. 35, 28p. (Boletim informativo, 35).

MOREIRA, R. S.; CORDEIRO, Z. J. M. A história da banana no Brasil. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17., 2006, Joinville, SC. Bananicultura: um negócio sustentável. **Anais...** Joinville: ACORBAT/ACAFRUTA, 2006. v. 1, p. 49-82.

NOMURA, E. S.; PENTEADO, L. A. C.; GARCIA, V. A.; DAMATTO JÚNIOR, E. R.; FUZITANI, E. J.; SAES, L. A. Produção integrada de frutas (PIF) - banana: futuro ou realidade? Vale do Ribeira: APTA, 2010. Disponível em: <http://www.aptaregional.sp.gov.br/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=776&Itemid=284>. Acesso em: 24 jan. 2013.

NORMAN, D. J.; ZAPATA, M.; GABRIEL, D. W. DUAN, Y. P.; YUEN, J. M. F.; MANGRAVITA-NOVO, A.; DONAHOO, R. S. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 9, p. 1070-1077, 2009.

OEPP/EPPO. EPPO Standards PM 7/21. Diagnostic protocols for regulated pests: *Ralstonia solanacearum*. **EPPO Bull**, Oxford, v. 34, p. 173-178, 2004.

PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A. F. S.; VÈRAS, S. M. **Doenças da bananeira no Estado do Amazonas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. (Circular Técnica, 7).

PEREIRA, L. V.; NORMANDO, M. C. S. Sobrevivência de *Pseudomonas solanacearum* raça 2 em solos de terra firme do Estado do Amazonas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 137-142, 1993.

PINHEIRO, C. R. **Caracterização molecular e diversidade genética de *Ralstonia solanacearum*, agente causal do Moko da bananeira**. 2010, 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PINHEIRO, C. R.; AMORIM, J. A. E.; DINIZ, L. E. C.; SILVA, A. M. F.; TALAMINI, V.; SOUZA JÚNIOR, M. T. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto a filotipos e sequevares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 5, p. 593-602, 2011.

PONTES, J. J.; FREIRE, F. O. C. “Moko Disease” da bananeira nos perímetros irrigados do Nordeste. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 5, n. 2, p. 191-195, 1972.

REMENANT, B.; COUPAT-GOUTALAND, B.; GUIDOT, A.; CELLIER, G.; WICKER, E.; ALLEN, C.; FEGAN, M.; PRUVOST, O.; ELBAZ, M.; CALTEAU, A.; SALVIGNOL, G.; MORNICO, D.; MANGENOT, S.; BARBE, V.; MÉDIGUE, C.; PRIOR, P. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 6, p. 379, 2010.

ROBERTS, S.; EDEN-GREEN, S.; JONES, P.; AMBLER D. *Pseudomonas syzygii* sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 13, n. 1, p. 34–43, 1990.

SAILE, E.; MCGARVEY, J. A.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, Saint. Paul, v. 87, n. 12, p. 1264 - 1271, 1997.

SEBRAE. **Banana: Estudos de Mercado SEBRAE/ESPM**. Brasília: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2008. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/0D8AE2879FDAB331832574DC004521C1/\\$File/NT0003904E.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/0D8AE2879FDAB331832574DC004521C1/$File/NT0003904E.pdf)>. Acesso em 05 fev. 2013.

SILVA, S. O.; ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SILVEIRA, J. R. Bananeira. In: BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. p. 101-158.

SILVA NETO, S. P. da; GUIMARÃES, T. G. Evolução da cultura da banana no Brasil e no mundo. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/287/>>. Acesso em: 08 fev. 2013.

SILVEIRA, J. R. P.; DUARTE, V.; MORAES, M. G.; OLIVEIRA, A. M. R.; BARNI, V.; MACIEL, J. L. N. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-Rep e RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 615-622, 2005.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **The Journal of the Linnean Society of London**, London, v. 55, n. 359, p. 302-312, 1955.

STEVEN, P.; VAN ELSAS, J. D. Genetic and phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 strains obtained from Dutch waterways. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 97, n. 2, p. 171-188, 2010.

TAGHAVI, M.; HAYWARD, C.; SLY, L. I.; FEGAN, M. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, New York, v. 46, n. 1, p. 10–15, 1996.

TAKATSU, A. 2001. Moko da bananeira no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE

- BANANICULTURA, 2001, Jaboticabal: Anais... Jaboticabal: FUNEP. p.439-452.
- TOKESHI, H.; DUARTE, M. L. R.; Moko da bananeira no território Federal do Amapá. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 2, n. 3, p. 224-229, 1976.
- TOUKAM, G. M. S.; CELLIER, G.; WICKER, E.; GUILBAUD, C.; KAHANE, R.; ALLEN, C.; PRIOR, P. Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 11, p. 1123-1130, 2009.
- VANEECHOUTTE, M.; KAMPFER, P.; DE BAERE, T.; FALSEN, E.; VERSCHRAEGEN, G. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia (Pseudomonas) syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, England, v. 54, n. 2, p. 317-27, 2004.
- VASSE, J.; FREY, P.; TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 8, n. 2, p. 241-251, 1995.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.
- VILLA, J.; TSUCHIYA, K.; HORITA M.; NATURAL M.; OPINA N.; HYAKUMACHI, M. DNA analysis of *Ralstoniasolanacearum* and related bacteria on 282-pb PCR amplified fragment. **Plant Disease**, Saint Paul v. 87, n. 11, p. 1337-1343, 2003.
- VILLA, J. E.; TSUCHIYA, K.; HORITA, M.; NATURAL, M.; OPINA, N.; HYAKUMACHI, M. Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences. **Journal General Plant Pathology**, Dordrecht, v. 71, n. 1, p. 39-46, 2005.
- WICKER, E.; GRASSART, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M. *Ralstonia solanacearum* Strains from Martinique (French West Indies) Exhibiting a New Pathogenic Potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 21, p. 6790-6801, 2007.
- WICKER, E.; LEFEUVRE, P.; DE CAMBIAIRE, J. C.; POUSSIER, S.; PRIOR, P. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. **International Society for Microbial Ecology Journal**, England, v. 6, n. 5, p. 961-974, 2012.
- XU, J. O.; PAN, Z. C.; XU, J. S.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, L. Q.; HE, L. Y.; FENG, J. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht-Holanda, v. 125, n. 4, p. 641-653, 2009.

YABUUCHI, E.; YOSHIMASA, K.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia solanacearum* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni e Doudoroff, 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1986) comb.nov., & *Ralstonia eutropho* (Davis, 1969) comb. nov. **Mycrobiology and Immunology**, Tokyo, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995.

ZAMBOLIM, L. (Org.). **Manejo integrado de doenças e pragas: fruteiras tropicais**. Viçosa-MG, p. 279-352. 2002.

ZOCCOLI, D. M.; TOMITA, C. K.; UESUGI, C. H. Ocorrência de murcha bacteriana em helicônias e musácea ornamental no Distrito Federal. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 45-46, 2009.

CAPÍTULO II

DIVERSIDADE DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Ralstonia solanacearum* CAUSANDO MOKO

1 **Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* causando Moko**

2

3 **Greecy M. R. Albuquerque, Liliana A. Santos, Kátia C. S. Félix, Christtianno L.**

4 **Rolleberg, Adriano M. F. Silva, Rosa L. R. Mariano,** Laboratório de

5 Fitobacteriologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de

6 Pernambuco; e **Elineide B. Souza,** Departamento de Biologia, Universidade Federal

7 Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-

8 900, Recife-PE, Brasil.

9

10 **Resumo**

11 Trinta e oito isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* causando Moko, de

12 bananeiras e helicônias, foram analisados quanto à diversidade fenotípica, patogênica e

13 genética, e ao posicionamento filogenético. Todos os isolados foram caracterizados

14 como filotipo II. A análise filogenética do gene *egl* revelou a presença das sequevares

15 IIA-6 e IIA-24 já descritas para o Moko e de duas sequevares (IIA-41 e IIB-25) até

16 então não relacionadas a esta doença, além de uma nova sequevar para o complexo *R.*

17 *solanacearum* relacionada ao Moko, sendo proposta a denominação IIA-53. Todos os

18 isolados foram patogênicos a bananeira e 12 também foram patogênicos ao tomateiro. A

19 análise de BOX-PCR indicou alta diversidade na população, com a formação de 19

20 grupos sendo 13 constituídos, cada um, por um único isolado. O perfil bioquímico

21 obtido através do sistema Biolog[®] Gen III, também confirmou a alta diversidade entre

22 os isolados.

23

24 **Palavras-chave:** *Musa* spp., filogenia, filotipo, sequevar, BOX-PCR

25 Tradicionalmente, *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., raça 2,
26 biovar 1 é capaz de infectar bananeiras triplóides, helicônias (18) e outras musáceas
27 ornamentais (42), causando Moko. No Brasil, a raça 2 de *R. solanacearum* é uma praga
28 quarentenária presente (A2), ocorrendo nos seguintes estados: Amazonas, Pará,
29 Rondônia, Roraima, Pernambuco e Sergipe (22).

30 Atualmente *R. solanacearum* é considerada um complexo de espécies (10, 13),
31 do qual também participam *Ralstonia syzigii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al. e a
32 Blood disease bacterium (BDB) (9, 29), as quais nunca foram relatadas no Brasil.
33 Estudos recentes têm sugerido que o complexo teria se originado na região da
34 Oceania/Indonésia, posteriormente migrado para a África, e de lá para a América do Sul
35 (possivelmente antes da fragmentação do continente ancestral Gondwana) e Ásia (36).

36 Em função da alta diversidade dos isolados, *R. solanacearum* tem sido
37 classificada, de acordo com propriedades fenotípicas e genéticas, em: cinco raças,
38 definidas com base na gama de hospedeiros (17); seis biovars, pelas características
39 bioquímicas (15); quatro filotipos, relacionados à origem geográfica dos isolados (9); 52
40 sequevares que são grupos de isolados com região altamente conservada dentro de
41 genes sequenciados (37); e clones (linhas clonais). Também tem sido proposta a
42 diferenciação do complexo de espécies de *R. solanacearum* em grupos de virulência
43 com base na patogenicidade a diferentes hospedeiros (1). Remenant et al. (26)
44 concluíram que o complexo é polifilético, apresentando três grupos de estirpes que
45 excedem o limite aceito para especiação, e propõem além de *R. solanacearum*, a criação
46 de duas novas espécies (*R. sequeirae* e *R. haywardii*) e três subespécies (*R. haywardii*
47 subsp. *celebensis*, *R. haywardii* subsp. *solanacearum*, *R. haywardii* subsp. *syzygii*).

48 A classificação em filotipos e sequevares, aceita pela comunidade científica, é a
49 que melhor reflete a diversidade deste complexo, sendo os isolados que causam Moko

50 correspondentes ao filotipo II (relacionado ao continente americano) ao qual pertencem
51 as sequevares 3, 4, 6 (9), 24 (10) e 2 (4). Esta classificação está de acordo com a
52 proposta por Cook et al. (6) que dividiu a raça 2, através de análises multilocus por
53 RFLP, nos grupos MLGs 24 (Sequevar 3), 25 (Sequevar 4) e 28 (Sequevar 6)
54 correspondentes a Divisão II que engloba isolados originados das Américas. O filotipo
55 II, atualmente, está subdividido em IIA (sequevares 6 e 24) e IIB (sequevares 2, 3 e 4)
56 (4, 10). O filotipo pode ser determinado pela análise filogenética dos genes *hrpB* e da
57 endoglucanase (*egl*), e por PCR Multiplex utilizando os oligonucleotídeos da série
58 *Nmult* (região ITS 16S-23S rRNA) proposta por Fegan e Prior (10). As sequevares, por
59 sua vez, têm sido determinadas por relacionamento filogenético do gene *egl*, *hrpB* e/ou
60 do gene de reparo do DNA (*MutS*) (10, 41).

61 Muitos trabalhos têm utilizado a técnica de rep-PCR para analisar a diversidade
62 de populações de *R. solanacearum*, no Brasil e no mundo (18, 22, 24, 34). O
63 conhecimento dessa diversidade é determinante para estudos de epidemiologia e
64 orientação de programas de controle da doença, principalmente em estratégias que
65 visam à resistência específica a isolados prevalentes em determinados locais.

66 No Brasil, a maioria das pesquisas com diversidade de *R. solanacearum* está
67 relacionada à raça 1 do patógeno (8, 27). No entanto, 19 isolados causando Moko (*R.*
68 *solanacearum* raça 2) foram caracterizados, determinando-se filotipos e sequevares,
69 através de PCR Multiplex (24). Estudos de diversidade são necessários, pois se acredita
70 que a diversidade da raça 2 seja elevada e subestimada na América do Sul (10).

71 Considerando o número reduzido de informações atualizadas sobre isolados
72 brasileiros de *R. solanacearum* relacionados ao Moko, o objetivo deste estudo foi
73 analisar a diversidade fenotípica, patogênica e genética, bem como a posição

74 filogenética de 38 isolados obtidos de bananeira (*Musa* spp.) e helicônia (*Heliconia*
75 spp.).

76 **Material e Métodos**

77 **Isolados bacterianos.** Foram utilizados oito isolados provenientes da Coleção
78 de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, São Paulo; 27 do Instituto Nacional
79 de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus; dois do Laboratório de Fitobacteriologia
80 da Universidade Federal Rural de Pernambuco e um da Embrapa Tabuleiros Costeiros –
81 Aracaju, os quais foram obtidos a partir de plantas sintomáticas de bananeira e
82 helicônia, totalizando 38 isolados (Tabela 1). O isolado tipo de *R. solanacearum*,
83 IBSBF 292 (=ICMP 1727, NCPPB 325; ATCC 11696; LMG 2299), oriundo de
84 tomateiro e que pertence a raça 1, biovar 1, filotipo IIA e sequevar 7 foi utilizado como
85 padrão de comparação em todas as análises realizadas.

86 **Determinação do filotipo.** A extração do DNA dos isolados para análise de
87 filotipo foi realizada a partir do crescimento bacteriano em meio de Kelman (22) a 29°C
88 por 48 h, utilizando-se o Kit MiniPrep para extração de DNA genômico bacteriano
89 (Axygen Biosciences, EUA). O filotipo foi determinado por PCR Multiplex utilizando
90 os oligonucleotídeos iniciadores da série *Nmult* (10). As reações foram compostas por
91 PCR Master Mix (1X), DMSO (5%), oligonucleotídeos iniciadores (*Nmult* 21:1F,
92 *Nmult* 21:2F, *Nmult* 22:INF, *Nmult* 23:AF e *Nmult* 22:RR - 2 µM cada; 759 e 760 - 1
93 µM cada) e DNA (120 ng). A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100
94 nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 5 min seguidos de 30 ciclos
95 (94°C por 15 s, 59°C por 30 s e 72°C por 30 s) e extensão final a 72°C por 10 min. Os
96 produtos da PCR foram corados com Sybr Gold e separados por eletroforese a 80 V/cm,
97 em gel de agarose 1,5% preparado em TBE 0,5 X por 1,5 h. Foi utilizado o marcador

98 GeneRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Canadá) para determinação
99 do tamanho dos fragmentos.

100 **Sequenciamento parcial do gene *egl* e filogenia.** Para o sequenciamento
101 parcial do gene *egl* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores Endo-F (5'-
102 ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3') e Endo-R (5'-
103 GCGTTGCCCGGCACGAACACC-3') (28) e a reação consistiu de: PCR Master Mix
104 (1X), oligonucleotídeos iniciadores (0,5 µM) e DNA (100 ng). Os produtos da PCR
105 foram submetidos à eletroforese gel de agarose 1,5% preparado em TBE 0,5 X por 2,0
106 h, com o marcador GeneRuler 100 pb DNA Ladder para determinação do tamanho dos
107 fragmentos. Em seguida foram purificados com o Kit de Purificação PCR Clean Up
108 (Axygen Bioesciences, EUA) e sequenciados pela Macrogen[®] (Coréia do Sul). Os
109 cromatogramas gerados pelo sequenciamento foram analisados pelo Staden Package[®]
110 versão 2.0 para formação dos contigs, os quais foram submetidos a alinhamento
111 múltiplo com a ferramenta ClustalW no software Mega 5.0[®] Foram realizadas análises
112 de agrupamento pelo método Neighbour-joining (NJ) entre os isolados estudados e
113 outros de referência do Genbank (sequências conhecidas) (Tabela 1), incluindo o
114 isolado tipo da espécie (IBSBF 292), utilizando o algoritmo de Jukes-cantor com
115 valores de bootstrap de 2.000.

116 As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas entre si e também com
117 as sequências existentes no Banco de Dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov),
118 utilizando-se o programa BLASTn do “National Center for Biotechnology Information
119 – NCBI”.

120 **Avaliação da patogenicidade em plantas de bananeira e tomateiro.** Os
121 isolados foram submetidos a teste de patogenicidade em mudas de bananeira cv.
122 Williams (*Musa* sp. AAA), obtidas por micropropagação. As mudas foram cultivadas

123 em vasos plásticos de 500 ml contendo substrato Carolina Padrão[®] (torta de Sphagno,
124 vermiculita expandida, calcário dolomítico, gesso agrícola e traços de NPK) até
125 apresentarem seis folhas definitivas. Nesta ocasião, as mudas foram inoculadas
126 injetando-se 1 ml das suspensões (1×10^8 UFC/ml) dos isolados de *R. solanacearum* no
127 pseudocaulo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura média
128 de $36 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar média de 85%. As avaliações foram realizadas por
129 40 dias, observando-se a presença de sintomas de Moko. Para cada isolado foram
130 inoculadas quatro plantas.

131 A capacidade de isolados brasileiros de *R. solanacearum* causando Moko em
132 infectar tomateiros foi investigada utilizando mudas da cv. Santa Clara, a qual é
133 cultivada no Brasil e suscetível a murcha bacteriana. Plantas com 25 dias de cultivo em
134 vasos plásticos de 500 ml contendo substrato Carolina Padrão[®] foram inoculadas pelo
135 método de ferimento de raízes (11). As plantas foram mantidas em casa de vegetação
136 com temperatura e umidade relativa do ar médias de $38 \pm 2^\circ\text{C}$ e 88%, respectivamente,
137 e avaliadas durante 30 dias. A patogenicidade do isolado foi descrita usando o critério
138 qualitativo (-) planta sem sintoma e (+) planta murcha ou morta. Para cada isolado
139 foram inoculadas três plantas.

140 **Análise da diversidade genética.** Os isolados de *R. solanacearum* causando
141 Moko foram analisados por rep-PCR utilizando o oligonucleotídeo iniciador
142 correspondente a sequência repetitiva BOX, conforme Horita e Tsuchiya (18), com
143 algumas modificações. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100.
144 A reação de BOX-PCR foi composta de PCR Master Mix (2X), do oligonucleotídeo
145 iniciador BOXA-1R (5'-CTACGGCAAGGC GACGCTGACG-3') (2 μM), DNA (200
146 ng), e ajustada em água ultra pura para um volume total de 50 μl . As condições de
147 amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 8 min seguido de 35 ciclos (94°C

148 por 1 min, 51°C por 1 min, 65°C por 8 min) e extensão final a 65°C por 5 min. Os
149 fragmentos amplificados de BOX foram corados com Sybr Gold, visualizados em gel de
150 agarose 1,5% e determinados com o marcador GeneRuler 1 Kb DNA Lader (Fermentas
151 Life Sciences, Canadá). Foi construída uma matriz binária, onde cada banda formada
152 entre 2500 e 900 pb foi pontuada como presente (1) ou ausente (0) para todos os
153 isolados. Um dendrograma com matriz de distância foi construído por agrupamento
154 pelo método UPGMA (Método de Agrupamento Médio Entre Grupos) a partir do
155 coeficiente de similaridade de Jaccard. As análises foram realizadas no software MVSP
156 (Multivariate Statistic Package) versão 3.2.

157 **Perfil bioquímico.** A diversidade na população foi avaliada utilizando o sistema
158 Biolog[®] Gen III com base na utilização de 71 fontes de carbono e sensibilidade a 21
159 substâncias inibitórias. A suspensão do inóculo foi preparada em fluido de inoculação
160 IF-A, ajustando-se a transmitância para 98%, a partir de crescimento em meio Biolog
161 Universal Growth (BUG[®]) a 31°C por 36 h. Em seguida, 100 µl da suspensão foram
162 dispensados em cada poço das microplacas do Biolog[®], que foram incubadas a 33°C por
163 22 a 36 h. A avaliação se deu pela presença de crescimento bacteriano no poço,
164 evidenciado pela coloração roxa indicadora da redução do TTC. Os dados foram
165 analisados pelo programa Microlog M versão 5.2 e um dendrograma com os resultados
166 foi gerado e analisado pelo método UPGMA (Método de Agrupamento Médio Entre
167 Grupos) com o software MVSP versão 3.2.

168 **Resultados**

169 **Determinação do filotipo.** A análise eletroforética da reação de PCR Multiplex
170 resultou na amplificação do fragmento de 281 pb, específico da espécie *R.*
171 *solanacearum*, bem como no *amplicon* de 372 pb (Figura 1), indicando que todos os
172 isolados brasileiros relacionados ao Moko pertencem ao filotipo II, das Américas.

173 **Sequenciamento parcial do gene *egl* e filogenia.** A comparação das sequências
174 parciais do gene *egl* dos 38 isolados relacionados ao Moko e as sequências depositadas
175 no GenBank, realizadas através do programa BLASTn revelou alta identidade (E value
176 =0,0±0,02) para o respectivo gene, sendo os isolados identificados como *R.*
177 *solanacearum*. A posição filogenética dos respectivos isolados foi determinada pelo
178 relacionamento com sequências de referências do banco de dados do GenBank,
179 cobrindo toda a diversidade genética conhecida (52 sequevares) para o complexo *R.*
180 *solanacearum*. Foi construída uma árvore pelo método de agrupamento Neighbor-
181 joining que revelou a presença das sequevares 6 (isolado IBSBF 2661) e 24 (18
182 isolados) relacionadas ao Moko, e a presença de três grupos principais, com alto nível
183 de suporte, que não agruparam com nenhuma das sequevares até então descritas para o
184 Moko. O primeiro grupo, formado pelos isolados F3, Cotpin 2, F2 e IBSBF 2572,
185 constitui uma nova sequevar para o complexo *R. solanacearum*, relacionada ao Moko,
186 sendo proposta a denominação sequevar IIA-53; o segundo grupo foi formado por 11
187 isolados, relacionados ao isolado CMR39 de batata em Camarões, sendo da sequevar
188 IIA-41; e o terceiro grupo B10, B4 e B7, intimamente relacionados ao isolado UW477
189 de batata do Peru, pertencente a sequevar IIB-25 (Figura 2). Como era esperado, o
190 isolado tipo da espécie (IBSBF 292) foi classificado como sequevar IIA-7. A sequevar
191 24 já havia sido determinada para o isolado IBSBF 1900 por Fegan e Prior (10) (Tabela
192 1), pelo sequenciamento parcial do gene da endoglucanase sendo utilizada como
193 referência para esta sequevar, na análise filognética do gene *egl*.

194 A nova sequevar designada IIA-53 foi constituída apenas pelos isolados
195 provenientes do estado de Sergipe, região Nordeste (F3, Cotpin 2, F2 e IBSBF 2572),
196 Brasil.

197 **Avaliação da patogenicidade em plantas de bananeira e tomateiro.** Os
198 isolados brasileiros obtidos de bananeira e heliconia com sintomas de Moko induziram
199 sintomas da doença em bananeira entre 15 e 30 dias após a inoculação. Além do isolado
200 IBSBF 292 (raça 1), 12 dos 38 isolados inoculados em tomateiro incitaram murcha nas
201 plantas de tomate cv. Santa Clara aos 30 dias após a inoculação (Tabela 1). Os isolados
202 das sequevares IIB-25 e IIA-53 não foram patogênicos ao tomateiro

203 **Análise da diversidade genética.** Um padrão reproduzível de produtos de
204 amplificação foi obtido no teste de BOX-PCR, com tamanhos variando de 3500 a 500
205 pb, gerando diferentes perfis. A análise indicou alta diversidade na população, com
206 formação de 19 grupos ao nível de 60% de similaridade, sendo 13 grupos formados
207 cada um por um único isolado, e cinco grupos com linhas clonais (Figura 3). A técnica
208 foi eficiente para distinguir linhas clonais dentro da população e permitiu correlacionar
209 os perfis genômicos com a sequevar IIA-53.

210 **Perfil bioquímico.** O perfil nutricional revelou alta diversidade bioquímica dos
211 isolados, não tendo sido encontrada dentre as 71 fontes de carbono disponíveis no
212 Biolog[®] Gen III nenhuma fonte de uso comum a todos. Os carboidratos utilizados por
213 mais de 80% dos isolados foram: ácido D-glucurônico (92,3%); pectina e ácido D-
214 galacturônico (89,7%); ácido quínico e ácido L-málico (84,6%); ácido cítrico e L-
215 histidina (82%). Nenhuma substância inibidora foi eficiente contra 100% dos isolados,
216 sendo a maior sensibilidade em relação à rifampicina SV (92,3%), lincomicina,
217 vancomicina e violeta tetrazolio (87,2%). Os isolados não utilizaram ácido propriônico
218 e D-serina, bem como não foram inibidos por bromato de sódio.

219 O dendrograma gerado com o perfil bioquímico separou os isolados em 18
220 grupos, dos quais nove foram constituídos por apenas um isolado, com nível de

221 similaridade de 68% (Figura 4). O perfil bioquímico também não separou os isolados
222 quanto a sequevar, patogenicidade ao tomateiro e diversidade genética.

223 **Discussão**

224 O Moko da bananeira, causado por *R. solanacearum* raça 2, praga quarentenária
225 presente (A2) no Brasil, tem sido observado em cultivos nas regiões Norte e Nordeste,
226 limitando a produção em algumas áreas (30). Nesse estudo foi analisada a diversidade
227 fenotípica, genética e patogênica, e a posição filogenética de isolados brasileiros de *R.*
228 *solanacearum* causando Moko. Os resultados mostraram alta diversidade na população,
229 como esperado, desde que, isolados que são ecologicamente adaptados a um hospedeiro
230 particular, a exemplo do patossistema em estudo, exibem uma maior diversidade (37).
231 No Brasil, informações sobre a diversidade genética de isolados de *R. solanacearum*
232 que causam Moko são escassas, destacando-se o estudo de Pinheiro et al. (24).

233 Na classificação hierárquica proposta por Fegan e Prior (9), todos os isolados de
234 *R. solanacearum* infectando musáceas e heliconiáceas são classificados como filotipo II
235 (subgrupos A e B), das Américas, o que foi comprovado neste trabalho. Este filotipo
236 tem sido relacionado mais estreitamente ao Moko do que a origem geográfica, uma vez
237 que outros isolados obtidos de bananeiras, oriundas dos continentes africano e asiático
238 também foram considerados como pertencentes a este filotipo (3). Um estudo recente,
239 baseado em análises de microarranjo e de dados genômicos (14, 26, 36), prevê a divisão
240 do complexo *R. solanacearum* em três grupos abrangendo os quatro filotipos. O grupo 1
241 englobaria os filotipos I e III, grupo 2 o filotipo II e o grupo 3 consistiria de isolados do
242 filotipo IV. Nessa classificação, o filotipo II permaneceria com duas subdivisões e o
243 filotipo IV estaria mais relacionado ao grupo 1 (5).

244 O relacionamento filogenético do gene *egl* revelou que isolados brasileiros de *R.*
245 *solanacearum* do Moko pertencem a duas (IIA-6 e IIA-24) das cinco (IIB-2, IIB-3, IIB-

246 4, IIA-6 e IIA-24) sequevares previamente descritas para o Moko e também às
247 sequevares IIA-41 e IIB-25 descritas para isolados de batata e tomate (4) e até então não
248 relacionadas a essa doença. Esse resultado sugere a alta diversidade dos isolados de *R.*
249 *solanacearum* do Moko no Brasil. Considerando que os isolados F3, Cotpin 2, F2 e
250 IBSBF 2572 não se agruparam com nenhuma das sequevares descritas para o complexo
251 *R. solanacearum* e o alto valor de *bootstrap* obtidos neste estudo, propõe-se uma nova
252 sequevar para esse complexo e relacionada ao Moko, sendo denominada de sequevar
253 IIA-53. Fegan e Prior (10) já haviam verificado a existência de uma sequevar,
254 anteriormente não determinada para o Moko, a sequevar 24, em três isolados brasileiros.
255 Os isolados da sequevar IIA-53 são todos oriundos do estado de Sergipe, região
256 Nordeste do Brasil, não patogênicos ao tomateiro e formaram um único grupo na
257 análise de BOX-PCR.

258 Cardozo et al. (3), na Colômbia, utilizando PCR-Multiplex para 25 isolados do
259 Moko, determinaram as sequevares IIB-4 e IIA-6 apenas para 14 deles. Também com
260 base nessa técnica, Pinheiro et al. (24) avaliaram 19 isolados, dos quais foi determinada
261 a sequevar de apenas 3 (IIA-6). Dos sete isolados em comum com Pinheiro et al. (24)
262 analisados nesse estudo, cinco relacionaram-se com a sequevar 24 (IBSBF 188, IBSBF
263 615, IBSBF 187, IBSBF 1900 e IBSBF 2571), um isolado com a sequevar 6 (IBSBF
264 2661) e um (IBSBF 2572) com a nova sequevar IIA-53. Este trabalho confirmou a
265 sequevar IIA-24 em isolados brasileiros do Moko, provenientes da região Norte do país,
266 como verificado por Fegan e Prior (10).

267 Além das duas sequevares até então não relacionadas ao Moko e da nova
268 sequevar proposta, é possível que existam outras novas sequevares ou ainda não
269 relacionadas ao Moko no Brasil e na América do Sul. Isto é respaldado pelo fato de que
270 as últimas sequevares associadas ao Moko foram detectadas no Brasil (sequevar 24)

271 (10) e na Colômbia (sequevar 2) (4). A diversidade deste complexo é tão elevada que
272 isolados das sequevares 6 e 24 têm sido mais estreitamente relacionados a isolados da
273 biovar 1 (obtidos de tomateiro e batata) no subcluster A, do que a outros isolados do
274 Moko (10).

275 O relacionamento filogenético do gene da endoglucanase foi eficiente na
276 determinação das sequevares dos isolados brasileiros de *R. solanacearum*. Cook e
277 Sequeira (7) já acreditavam que as árvores geradas por este gene mostram de maneira
278 representativa estes relacionamentos; e vários autores utilizam essa ferramenta para
279 posicionamento filogenético de isolados de *R. solanacearum* (9, 10, 26, 32). Além
280 disso, este gene tem sido considerado conservado, o que se confirmou na população
281 estudada, uma vez que de 822 sítios presentes, 605 foram considerados conservados e
282 108 variáveis.

283 Os 38 isolados brasileiros do Moko foram patogênicos a bananeira, induzindo
284 sintomas de murcha, distorção e necrose foliar, escurecimento dos vasos do xilema e/ou
285 morte, característicos da doença. A capacidade de isolados brasileiros de *R.*
286 *solanacearum* que causam Moko incitar sintomas de murcha em tomateiros não era
287 conhecida. Verificou-se uma reação variável entre os isolados estudados, não tendo sido
288 observada correlação dos 12 isolados que infectaram essa hospedeira com sequevar. Os
289 resultados concordam com os de Ailloud et al. (1) que relatam que alguns isolados do
290 Moko podem causar murcha em tomateiro, embora isolados da sequevar 24 não tenham
291 sido utilizados na pesquisa. Baseado nesses autores, no presente estudo, o isolado IBSBF
292 2661 que se comportou como patogênico ao tomateiro confirma pertencer a sequevar
293 IIA-6. Isolados causando Moko nunca foram isolados de plantas de tomate e batata com
294 murcha no campo, embora sejam capazes de estabelecer infecção nesses hospedeiros
295 (4).

296 Análises de *fingerprint* de DNA baseadas na sequência repetitiva da cadeia da
297 polimerase (BOX-PCR) têm sido amplamente utilizadas em estudos de diversidade e
298 relação genética entre isolados de *R. solanacearum* (18, 22, 23, 28). A alta diversidade
299 encontrada no perfil genético dos isolados brasileiros de *R. solanacearum* causando
300 Moko, utilizando essa técnica, com a formação de 19 grupos constituídos por um único
301 isolado cada, mostrou que esses isolados constituem um grupo heterogêneo. Alto nível
302 de diversidade também foi observado por Horita e Tsuchiya (18) com a formação de 35
303 grupos dentre 74 isolados japoneses de *R. solanacearum*, obtidos de diferentes
304 hospedeiros, utilizando rep-PCR (REP, ERIC e BOX). A baixa similaridade entre os
305 isolados brasileiros sugere que várias linhagens bacterianas causam o Moko no Brasil.
306 A ausência de correlação de BOX-PCR com a sequevar evidencia ainda mais a
307 diversidade da população, no entanto, as cinco linhas clonais observadas foram
308 constituídas de isolados da mesma sequevar. A habilidade da bactéria em se adaptar
309 rapidamente ao ambiente, por meio de mecanismos como transferência horizontal de
310 genes durante o processo de infecção (14) confere características adaptativas e reduzem
311 esse tipo de correlação (24).

312 Os resultados obtidos também apoiam a condição de *R. solanacearum* como um
313 complexo de espécies. A maioria dos isolados utilizados nesse estudo é originária do
314 estado do Amazonas, na região Norte do Brasil. Alto nível de polimorfismo, revelado
315 por BOX-PCR, também foi relatado entre isolados brasileiros das biovars 1, 3 e N2
316 oriundos deste estado, patogênicos a tomate, outras solanáceas, maracujazeiro
317 (*Passiflora edulis* L.) e *Melanthera discoidea* Blake (9), com grupos formados sem
318 correlação com a raça, biovar ou região geográfica. De acordo com Thwaites et al. (31)
319 a maior diversidade genética de isolados de *R. solanacearum* causando Moko é

320 encontrada em isolados da América do Sul associados a *Heliconia* spp., no entanto,
321 neste estudo verificou-se que isto também se aplica a isolados obtidos de *Musa* spp.

322 A alta diversidade genética foi refletida na diversidade bioquímica exibida pelos
323 isolados, os quais diferiram em relação à maioria das fontes de carbono e substâncias
324 inibitórias pertencentes ao sistema Biolog[®] Gen III. Os dendrogramas revelaram alto
325 grau de polimorfismo, confirmando os resultados de BOX-PCR, com 50% dos isolados
326 em grupos individuais.

327 Este estudo revelou que o Moko no Brasil é causado por isolados de *R.*
328 *solanacearum* que apresentam alta diversidade genética e uma nova posição filogenética
329 em relação a sequevares. Além das sequevares IIA-6 e IIA-24 já descritas, foram
330 encontrados isolados pertencentes as sequevares IIA-41 e IIB-25 até então relacionadas
331 apenas a solanáceas e uma nova sequevar, proposta como IIA-53, para o complexo *R.*
332 *solanacearum* e relacionada ao Moko. Esse conhecimento é importante para estudos de
333 epidemiologia e orientação de programas de manejo da doença e, sobretudo, expande as
334 informações sobre a diversidade do complexo *R. solanacearum* no Brasil e no mundo.

335 **Agradecimentos.** Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
336 Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo a Greecy M. R. Albuquerque,
337 de pesquisa a Adriano M. F. Silva (Proc. 101000/2011-1), Rosa L. R. Mariano (Proc.
338 309697/2011-5) e Elineide B. Souza. A Dr^a. Rosalee Coelho do INPA/AM e a Dr^a
339 Viviane Talamini da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros-Aracaju, pela doação de isolados
340 utilizados neste estudo.

341 **Literatura Citada**

342 1. Ailloud, F., Cellier, G., Yahiaoui, N., Remenant, B., Allen, C., and Prior, P.
343 Banana Moko disease and diversity of its unpredictable causative agent
344 *Ralstonia solanacearum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

- 345 FITOPATOLOGIA, 45., 2012, Manaus. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira
346 de Fitopatologia, 2012. CD-ROM 2.
- 347 2. Castillo, J. A. and Greenberg, J. T. 2007. Evolutionary dynamics of *Ralstonia*
348 *solanacearum*. Appl. Environ. Microbiol 73:1225-1238.
- 349 3. Cardozo, C., Rodríguez, P., and Marín, M. 2009. Molecular characterization of
350 the *Ralstonia solanacearum*/ species complex in the banana growing region of
351 Uraba. Agron. Colombiana 27:203-210.
- 352 4. Cellier, G., and Prior, P. 2010. Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia*
353 *solanacearum* strains pathogenic to potato. Phytopathology 100:1250-1261.
- 354 5. Cellier, G., Remenant, B., Chiroleu, F., Lefeuvre, P., and Prior, P. 2012.
355 Phylogeny and population structure of Brown-rot and Moko disease-causing
356 strains *Ralstonia solanacearum* phylotype II. Appl. and Environ Microbiol.
357 78:2367-2375.
- 358 6. Cook, D., Barlow, E., and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas*
359 *solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with
360 DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Mol. Plant
361 Microbe In. 2:113-121.
- 362 7. Cook, D., and Sequeira, L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas*
363 *solanacearum* by molecular genetic methods. Pages 77-93 in: Bacterial Wilt:
364 The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. A. C.
365 Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- 366 8. Costa, S. B., Ferreira, M. A. S. V., and Lopes, C. A. 2007. Diversidade
367 patogênica e molecular de *Ralstonia solanacearum* da Região Amazônica
368 brasileira. Fitopatol. Bras. 32:285-294.

- 369 9. Fegan, M., and Prior, P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum*
370 species complex? Pages 449-461 in: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia*
371 *solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds.
372 American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- 373 10. Fegan, M., and Prior, P. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum*
374 species complex cause bacterial wilts of banana. Australas. Plant Path. 35:93–
375 101.
- 376 11. Felix, K. C. S., Souza, E. B., Michereff, S. J., and Mariano, R. L. R. 2012.
377 Survival of *Ralstonia solanacearum* in infected tissues of *Capsicum annuum* and
378 in soils of the state of Pernambuco, Brazil. Phytoparasitica 40:53-62.
- 379 12. Guidot A., Prior, P., Schoenfeld, J., Carrère, S., Genin, S., and Boucher, C.
380 2007. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia*
381 *solanacearum* inferred from gene distribution analysis. J. Bacteriol. 189:377–
382 387.
- 383 13. Gillings, M. R., and Fahy, P. 1994. Genomic fingerprinting: towards a unified
384 view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. Pages 95-112 in:
385 Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas*
386 *solanacearum*. A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International,
387 Wallingford, UK.
- 388 14. Guidot, A., Coupat, B., Fall, S., Prior, P., and Bertolla, F. 2009. Horizontal gene
389 transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative
390 genomic hybridization on microarrays. ISME Journal 3:549-562.
- 391 15. Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl.
392 Bacteriol. 27:265-277.

- 393 16. Hayward, A. C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. Pages 9-24 in:
394 Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas*
395 *solanacearum*. A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International,
396 Wallingford, UK.
- 397 17. He, L. Y.; Sequeira, L.; and Kelman. A. 1983. Characteristics of strains of
398 *Pseudomonas solanacearum*. Plant Dis. 67: 1357-1361.
- 399 18. Horita, M., and Tsuchiya, K. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia*
400 *solanacearum*. 2001. Phytopathology 91:399-407.
- 401 19. Lebeau, A., Daunay, M. C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J. F., Dintinger, J.,
402 Chiroleu, F., Wicker, E. and Prior, P. 2011. Bacterial wilt resistance in tomato,
403 pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the
404 *Ralstonia solanacearum* species complex. Phytopathology 101:154-165.
- 405 20. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas*
406 *solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology
407 44:693-695.
- 408 21. MAPA. Instrução Normativa Nº 52 de 20/11/2007. Online:
409 <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislação.do/>>.
410 Acesso em 28 jan. 2013.
- 411 22. Norman, D. J., Zapata, M., Gabriel, D. W., Duan, Y. P., Yuen, J. M. F.,
412 Mangravita-Novo, A., and Donahoo, R. S. 2009. Genetic diversity and host
413 range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America.
414 Phytopathology 99:1070-1077.

- 415 23. Nouri, S., Bahar, M., and Fegan, M. 2009. Diversity of *Ralstonia solanacearum*
416 causing potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar
417 2T strains outside South America. *Plant Pathol.* 58:243-249.
- 418 24. Pinheiro, C. R., Amorim, J. A. E., Diniz, L. E. C., Silva, A. M. F., Talamini, V.,
419 and Souza Júnior, M. T. 2011. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia*
420 *solanacearum* e caracterização molecular quanto à filotipos e sequevares. *Pesq.*
421 *Agropec. Bras.* 46:593-602.
- 422 25. Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C., and Fegan, M. 2000. Partial
423 sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the
424 known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Syst. and*
425 *Appl. Microbiol.* 23:479-486.
- 426 26. Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen,
427 C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., Salvignol, G., Mornico, D.,
428 Mangenot, S., Barbe, V., Médigue, C., and Prior, P. 2010. Genomes of three
429 tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal
430 significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* 11:379.
- 431 27. Silveira, J. R. P., Duarte, V., Moraes, M. G., Oliveira, A. M. R., Barni, V., and
432 Maciel, J. L. N. 2005. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum*
433 isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana por PCR-rep e RAPD.
434 *Fitopatol. Bras.* 30:615-622.
- 435 28. Siri, M. I., Sanabria, A., and Pianzola, M. J. 2011. Genetic diversity and
436 aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of
437 potato in Uruguay. *Plant Dis.* 95, 1292–1301.
- 438 29. Taghavi, M.; Hayward, C.; Sly, L. I., and Fegan, M. 1996. Analysis of the
439 phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*,

- 440 *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S
441 rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 46:10–15.
- 442 30. Talamini, V., Silva, A. M. F., Almeida, M. A., Moraes, A. C., Warwick, D. R.
443 N., Nascimento, M. P. A., and Devi, C. K. Situação do Moko da bananeira no
444 estado de Sergipe. Online:
445 http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2010/doc_159.pdf
- 446 31. Thwaites, R., Eden-Green, S. J., and Black, R. 2000. Diseases caused by bacteria
447 Moko. Pages 213-221 in: Diseases of Banana, Abacá and Enset. Jones, D. R.,
448 ed. CAB International, Wallingford, UK.
- 449 32. Toukam, G. M. S., Cellier, G., Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C.,
450 and Prior, P. 2009. Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* Stains in
451 Cameroon. Plant Dis. 93:1123-1130
- 452 33. Vanechoutte, M., Kampf, P., De Baere, T., Falsen, E., and Verschraegen, G.
453 2004. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic
454 lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of
455 *Ralstonia (Pseudomonas) syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. Int. J. Syst.
456 Evol. Microbiol. 54:317–27.
- 457 34. Viana, F. C., Berger, I. J., and Duarte, V. 2012. Caracterização de populações de
458 *Ralstonia solanacearum* Smith em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) no Brasil.
459 Trop. Plant Pathol. 37:123-129.
- 460 35. Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan,
461 M., and Prior, P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French
462 West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. Appl. and Environ.
463 Microbiol. 73:6790-6801.

- 464 36. Wicker, E., Lefeuvre, P., de Cambiaire, J. C., Poussier, S., and Prior, P. 2012.
465 Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant
466 pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. ISME J. 6:961-974.
- 467 37. Xu, J. O., Pan, Z. C., Xu, J. S., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, L. Q., He, L. Y.,
468 and Feng, J. 2009. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from
469 China. Eur. J. Plant Pathol. 125: 641–653.
- 470 38. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., and Nishiuchi, Y. 1995. Transfer
471 of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal
472 of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov.,
473 *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha*
474 (Davis 1969) comb. nov. Microbiol Immunol 39:897-904.

475
476**Tabela 1.** Isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* causando Moko

| Isolado ^w | Hospedeiro | Origem | Filotipo/ Sequevar | Patogenicidade Bananeira/ Tomateiro ^y | Referência |
|----------------------|---|-----------------|-----------------------|--|-------------|
| IBSBF 2661 | <i>Heliconia</i> sp. | Abreu e Lima/PE | IIA-6 | +/+ | Este estudo |
| IBSBF 615 | <i>Musa</i> sp. | Pará | IIA-24 | +/+ | Este estudo |
| B3 | Banana prata (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Irاندوبا/AM | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| B11 | Banana prata (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Anamã/AM | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| B6 | Banana prata (<i>Musa</i> sp. AAB) | Anamã/AM | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| B15 | Banana prata (<i>Musa</i> sp. AAB) | Anamã/AM | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| B14 | Banana prata (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Anamã/AM | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| B133 | <i>Musa</i> sp. | Manacapuru/AM | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| B17 | Banana Pacovan (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Anamã/AM | IIA-24 | +/+ | Este estudo |
| B67 | Banana Figo (<i>Musa</i> sp.) (ABB) | Parintins/AM | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| B5 | Banana prata (<i>Musa</i> sp. (AAB) | Anamã/AM | IIA-24 | +/+ | Este estudo |
| B9 | Banana prata (<i>Musa</i> sp. (AAB) | Anamã/AM | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| B1 | <i>Musa</i> sp. | Anamã/AM | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| B13 | Banana prata (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Anamã/AM | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| B35 | Banana Pacovan (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Coari/AM | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| IBSBF 187 | <i>Musa</i> sp. | Humaitá/AM | IIA-24 | +/+ | Este estudo |
| IBSBF 188 | <i>Musa</i> sp. | Humaitá/AM | IIA-24 | +/+ | Este estudo |
| IBSBF 2571 | <i>Musa</i> sp. | Tabatinga/AM | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| IBSBF 1544 | <i>Musa</i> sp. | Amazonas | IIA-24 | +/- | Este estudo |
| IBSBF 1900 | <i>Musa</i> sp. | Itacoara/AM | IIA-24 | +/- | (10) |
| Cotpin 2 | <i>Musa</i> sp. | Propriá/SE | IIA-53 | +/- | Este estudo |
| IBSBF 2572 | <i>Musa</i> sp. | Japoatã/SE | IIA-53 | +/- | Este estudo |
| F2 | Banana (<i>Musa</i> sp.) | Propriá/SE | IIA-53 | +/- | Este estudo |

Tabela 1. Continuação...

| Isolado ^v | Hospedeiro | Origem | Filotipo/ Sequevar | Patogenicidade Bananeira/ Tomateiro ^y | Referência |
|------------------------|---|-------------------------------|-----------------------|--|-------------|
| F3 | Banana (<i>Musa</i> sp.) | Propriá/SE | IIA-53 | +/- | Este estudo |
| B95 | <i>Musa</i> sp. | Alto Solimões/AM | IIA-41 | +/+ | Este estudo |
| B106 | Banana prata (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Alto Solimões/AM | IIA-41 | +/- | Este estudo |
| B54 | Banana Pacovan (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Manacapuru/AM Rio Preto da | IIA-41 | +/+ | Este estudo |
| B73 | Banana maçã (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Eva/AM | IIA-41 | +/+ | Este estudo |
| B64 | Banana prata (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Parintins/AM | IIA-41 | +/- | Este estudo |
| B75 | Banana comprida (<i>Musa</i> sp.)(AAB) | Tefé/AM | IIA-41 | +/- | Este estudo |
| B74 | Banana comprida (<i>Musa</i> sp.)(AAB) | Tefé/AM | IIA-41 | +/+ | Este estudo |
| B66 | Banana roxa (<i>Musa</i> sp.) (AAA) | Parintins/AM | IIA-41 | +/+ | Este estudo |
| B105 | Banana prata (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Alto Solimões/AM | IIA-41 | +/+ | Este estudo |
| B96 | <i>Musa</i> sp. | Alto Solimões/AM | IIA-41 | +/- | Este estudo |
| BV136 | <i>Musa</i> sp. | Paraná do Supia/AM | IIA-41 | +/- | Este estudo |
| B7 | Banana Pacovan (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Anamã/AM | IIB-25 | +/- | Este estudo |
| B4 | Banana Pacovan (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Anamã/AM | IIB-25 | +/- | Este estudo |
| B10 | Banana prata (<i>Musa</i> sp.) (AAB) | Anamã/AM | IIB-25 | +/- | Este estudo |
| IBSBF 292 ^x | <i>Solanum lycopersicum</i> | EUA | IIA-7 | .../+ | Este estudo |

Tabela 1. Continuação...

| Isolado ^v | Hospedeiro | Origem | Filotipo/ Sequevar | Patogenicidade Bananeira/ Tomateiro ^y | Referência |
|--|--------------------------|-----------|-----------------------|--|------------|
| Isolados referência^z | | | | | |
| LNPV28.23 | Batata | Reunião | IIB-1 | ... | 4 |
| CFBP14 | Banana plátano | Colômbia | IIB-2 | | 4 |
| Molk2 | <i>Musa</i> sp. | Filipinas | IIB-3 | ... | 34 |
| UW163 | Banana plátano | Peru | IIB-4 | | 4 |
| CFBP6783 | <i>Heliconia caribea</i> | Martinica | IIB-4NPB | ... | 34 |
| CFBP2957 | Tomate | Martinica | IIA-5 | | 34 |
| UW181 | Banana plátano | Venezuela | IIA-6 | ... | 4 |
| CFBP4822 | Tomate | Finlândia | IIA-7 | | 4 |
| MAFF30155 | Tomate | Japão | IV-8 | | 4 |
| R28(<i>R. syzigii</i>) R229 | Cravo | Indonésia | IV-9 | ... | 4 |
| (Blood disease bacterium) | Banana | Indonésia | IV-10 | | 4 |
| UW151 | Gengibre | Austrália | I-16 | | 25 |
| CMR33 | Tomate | Camarões | III-20 | ... | 4 |
| NCPPB332 | Batata | Zimbábue | III-22 | ... | 25 |
| ICMP9600 | Banana | Brasil | IIA-24 | ... | 10 |
| UW477 | Batata | Peru | IIB-25 | | 25 |
| CIP240 | Batata | Brasil | IIB-26 | ... | 23 |
| ISBSF1712 | <i>Pelargonium</i> sp. | Brasil | IIB-27 | | 35 |
| NCPPB3987 | Batata | Brasil | IIB-28 | | 25 |

Tabela 1. Continuação...

| Isolado^w | Hospedeiro | Origem | Filotipo/ Sequevar | Patogenicidade Bananeira/ Tomateiro^y | Referência |
|----------------------------|-------------------|---------------|-------------------------------|--|-------------------|
| CIP301 | Batata | Peru | IIA-35 | ... | 4 |
| CFBP2957 | Tomate | Martinica | IIA-36 | ... | 25 |
| CIP120 | Batata | Peru | IIA-38 | ... | 19 |
| CFBP2958 | Tomate | Guadalupe | IIA-39 | ... | 25 |
| UW469 | Batata | Brasil | IIA-40 | ... | 2 |
| CMR39 | Batata | Camarões | IIA-41 | ... | 31 |
| MAD17 | Pimenta | Madagascar | I-46 | ... | 5 |
| T1-UY | Tomate | Uruguai | IIA-50 | ... | 5 |
| CFBP7014 | Antúrio | Trinidad | IIB-51 | ... | ... |

477 ^w IBSBF – isolados da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, São Paulo; Isolados com código B - Instituto
478 Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA; isolados F2 e F3 – Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de
479 Pernambuco; isolado Cotpin 2 - Embrapa Tabuleiros Costeiros – Aracajú.

480 ^x IBSBF 292 – isolado tipo da espécie (*Ralstonia solanacearum*, raça 1).

481 ^y Patogenicidade ao tomateiro (*Solanum lycopersicum*).

482 ^z Isolados referência utilizados para determinação das sequevares, obtidos do GenBank.

483

484

485

486

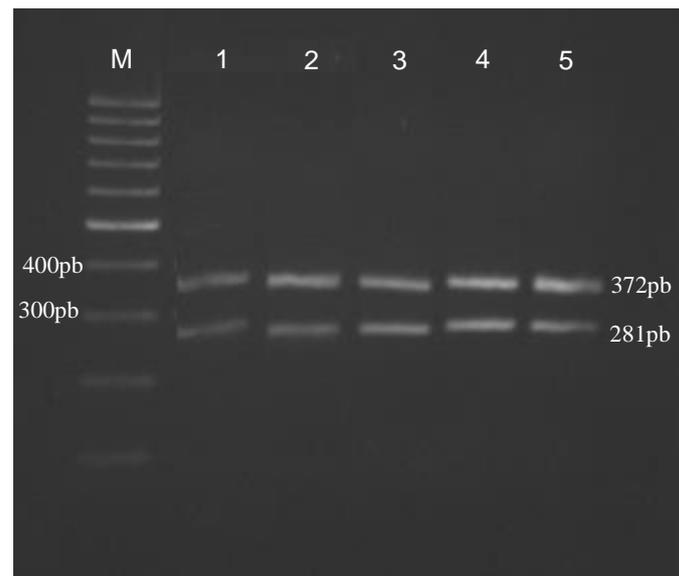
487

488

489

490

491



492 **Figura 1.** Produtos de PCR Multiplex para identificação de espécie e filotipo de

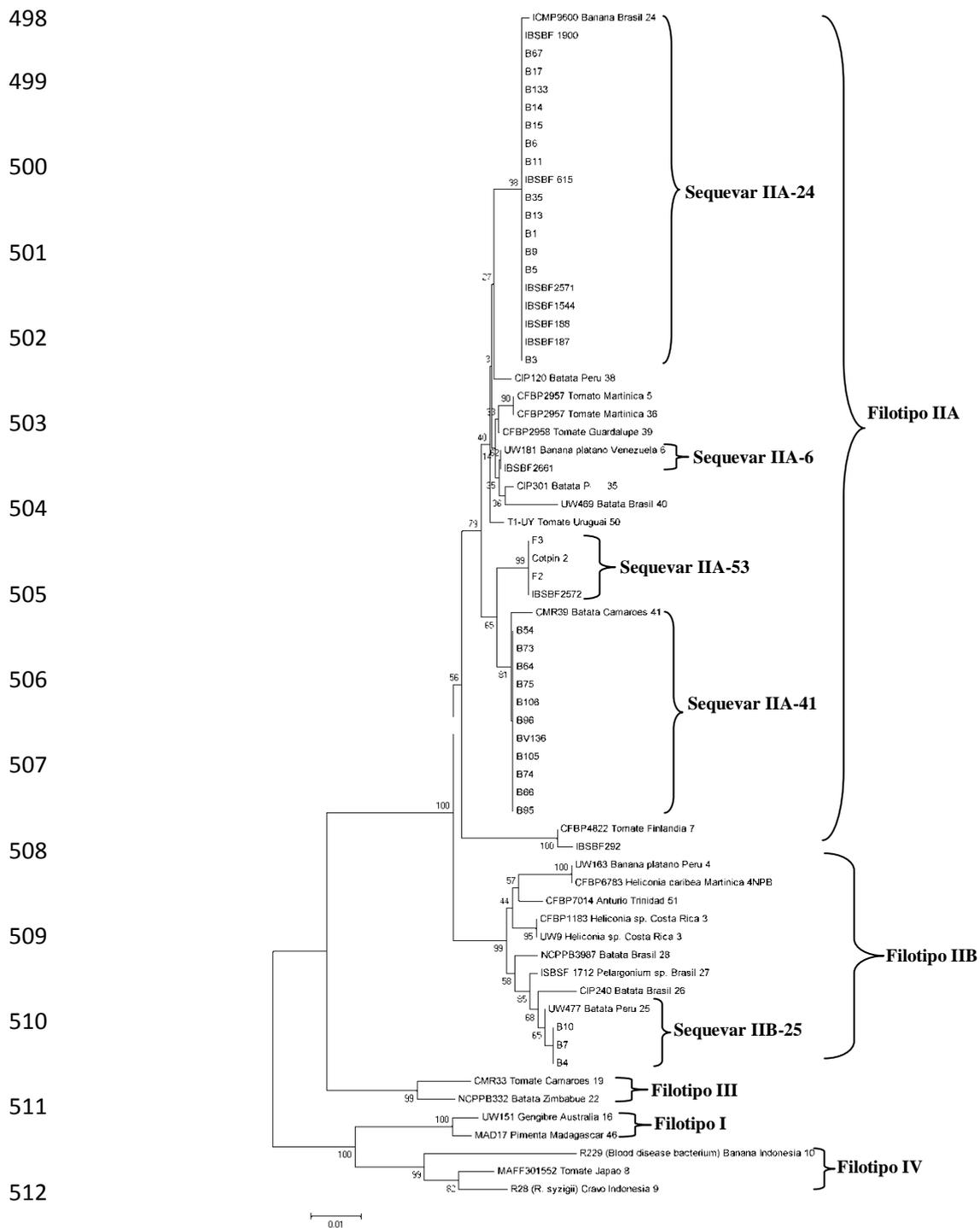
493 *Ralstonia solanacearum* causando Moko no Brasil, em gel de agarose 1,5%. M-

494 Marcador molecular 100 pb DNA ladder; 1-Isolado IBSBF 1544; 2- F2; 3- B35; 4-

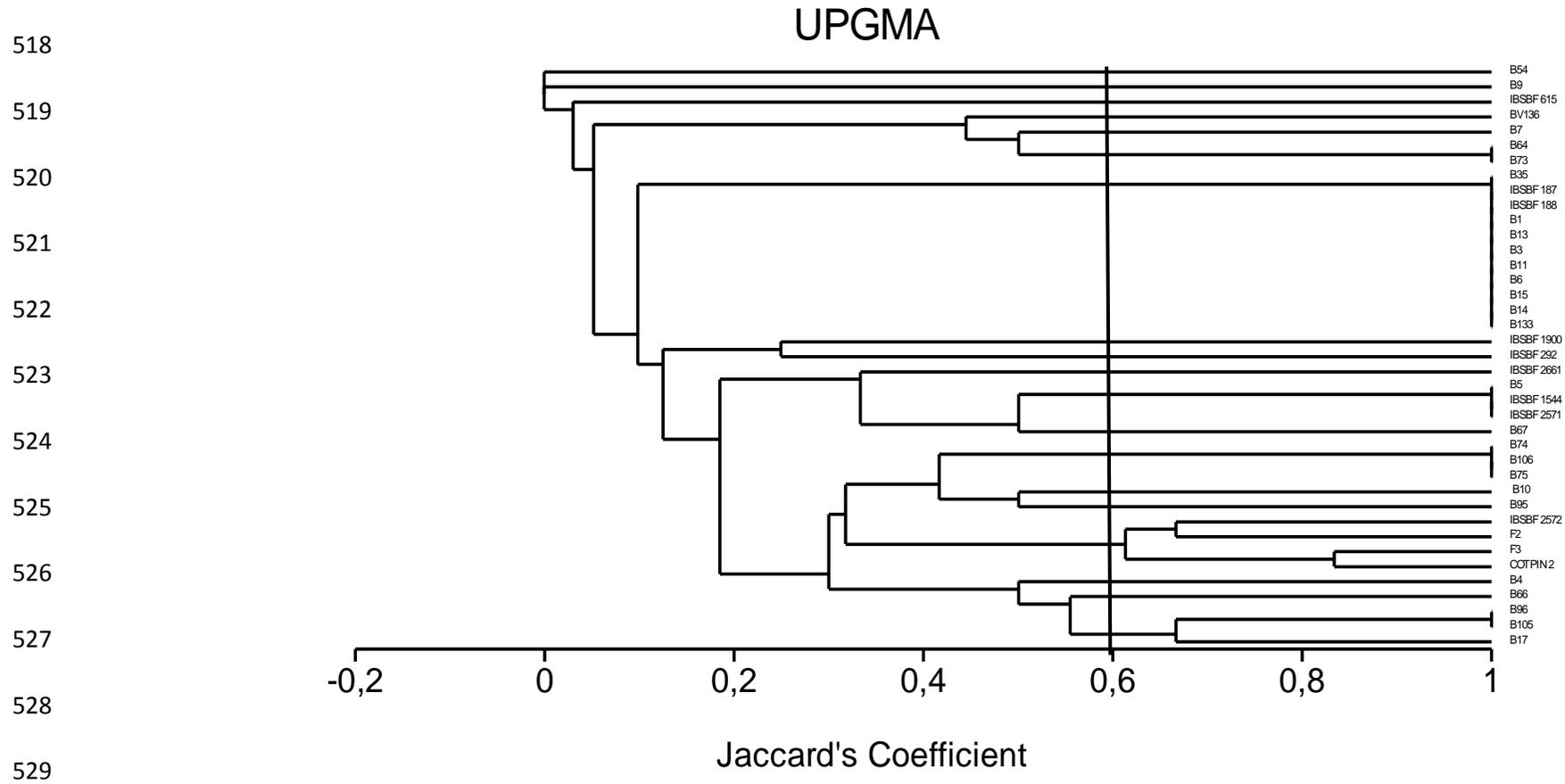
495 BV136; 5- IBSBF 292 (isolado tipo da espécie). Linhas 1 a 5 filotipo II.

496

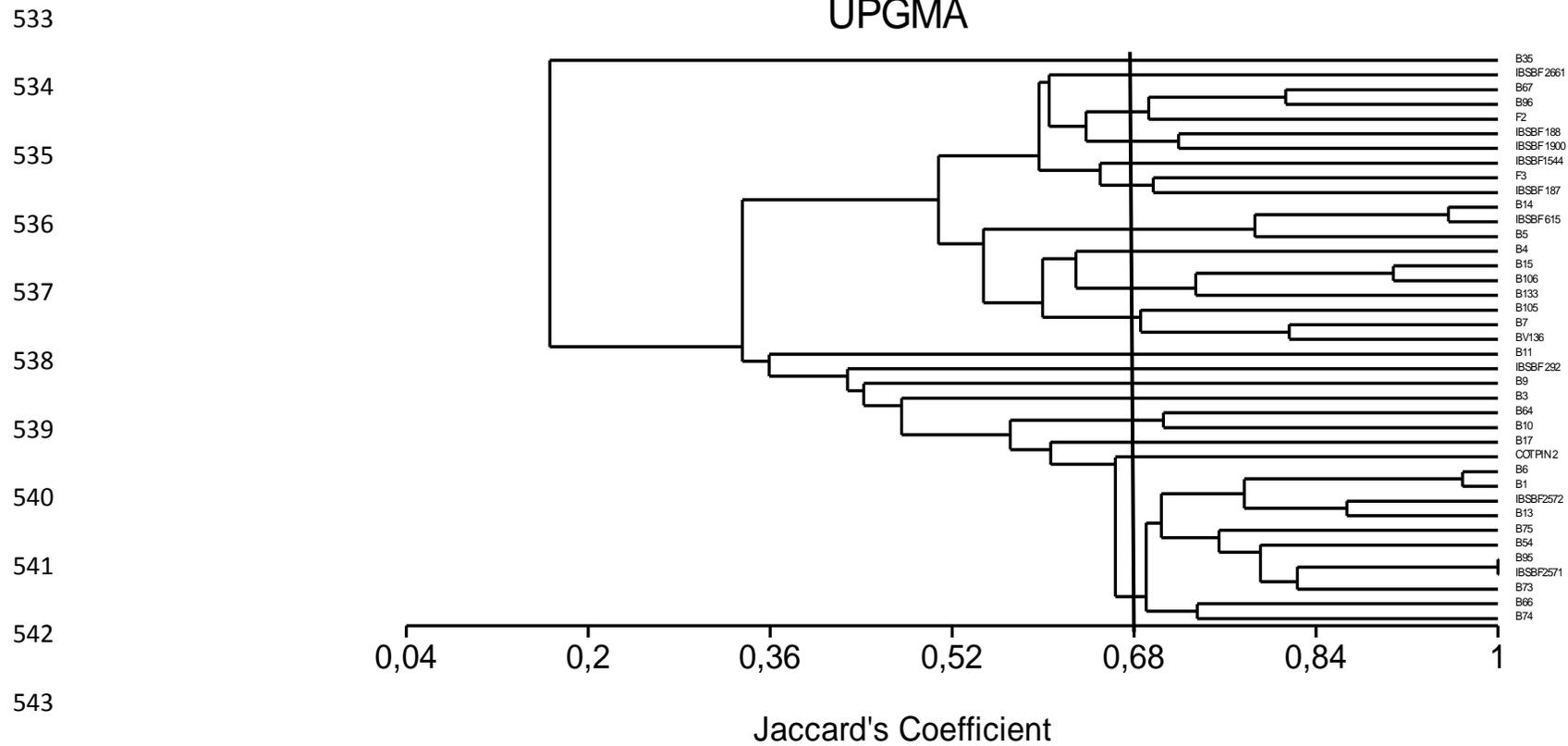
497



513 **Figura 2.** Análise filogenética de sequências parciais do gene *egl* de isolados brasileiros
 514 de *Ralstonia solanacearum* causando Moko. Relacionamento filogenético determinado
 515 pelo método Neighbor-joining com o coeficiente de Jukes-cantor. Valores dos ramos
 516 indicam porcentagem de *bootstrap* para 2000 repetições.



530 **Figura 3.** Diversidade genética de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* causando Moko, com base em BOX-PCR. Coeficiente de
531 similaridade calculado com base nos *fingerprints* pelo coeficiente de Jaccard. Dendrograma construído pelo método UPGMA utilizando o
532 software MVSP (3.2). IBSBF 292 – isolado tipo da espécie, raça 1.



545 **Figura 4.** Perfil bioquímico de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* causando Moko, utilizando o sistema Biolog[®] GEN III.

546 Dendrograma construído pelo método UPGMA utilizando o software MVSP (3.2).

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- O Moko da bananeira e helicônia no Brasil é causado por isolados de *Ralstonia solanacearum* filotipo II;
- Os isolados de *R. solanacearum* filotipo II analisados pertencem as sequevares IIA-6 e IIA-24 relacionadas ao Moko e as sequevares IIB-25 e IIA-41 até então relacionadas apenas a solanáceas;
- Está sendo proposta a nova sequevar IIA-53, para o complexo *R. solanacearum*, relacionada ao Moko.
- Alguns isolados causando Moko são capazes de causar murcha em tomateiros, sendo este o primeiro relato para isolados brasileiros de *R. solanacearum* raça 2;
- A população de *R. solanacearum* estudada apresenta alta variabilidade evidenciada pela técnica de BOX-PCR e perfil bioquímico.