

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Ralstonia solanacearum* EM  
TABACO NO BRASIL

Fernanda Carvalho Viana  
Eng. Agrônoma (UFRRJ)

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Ênfase em Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil  
Julho de 2010

# FOLHA PARA HOMOLOGAÇÃO

Aos meus pais, Joaquim e Eliane,  
pelo amor incondicional,

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que tive na minha vida.

À minha família tão querida que sempre me apoiou, em especial, meus pais Joaquim e Eliane, meu irmão Bruno, Ciça, Dina, tia Márcia e Vó Isa – vocês são muito especiais para mim.

À minha amiga e “irmã-emprestada” Tatiana pela amizade, confiança, apoio, paciência, incentivo, conselhos, risadas e puxões de orelha. Obrigada por tudo.

À minha segunda família: meus amigos cariocas que estão no Rio Grande do Sul. Sem vocês eu não teria aguentado ficar por aqui.

Ao Irving Joseph Berger, meu gestor na Souza Cruz, pela amizade, suporte, críticas e sugestões. Você é um grande pesquisador.

Ao professor Valmir Duarte, pelos ensinamentos, ajuda e principalmente pela confiança.

À professora Gertrudes Corção, sempre disposta a me ajudar e dar sugestões valiosas ao trabalho.

À Márcia Martins Guerra, minha psicoterapeuta, que fez com que eu enxergasse a minha vida por um ângulo diferente.

Aos colegas da Souza Cruz, em especial ao Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade pela amizade e ajuda.

Aos professores do Departamento de Fitossanidade pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade e à Marisa secretária do PPG-Fitotecnia pelo auxílio e boa vontade de sempre.

À Souza Cruz, pela oportunidade deste trabalho ser realizado.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

# CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Ralstonia solanacearum* EM TABACO NO BRASIL<sup>1</sup>

Autor: Fernanda Carvalho Viana  
Orientador: Valmir Duarte

## RESUMO

*Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana em diversos hospedeiros, dentre eles as solanáceas, causa grandes prejuízos na cultura do tabaco, se não manejada. Por se tratar de uma espécie complexa, esta bactéria é classificada de diversas formas. A mais recente divide a espécie em três níveis taxonômicos: filotipo, sequevar e clone. Devido a ausência de estudos sobre as populações de *R. solanacearum* na cultura do tabaco, este trabalho teve como objetivo caracterizar 120 isolados oriundos de solos com histórico da doença e plantas de tabaco com murcha bacteriana, coletados em 13 municípios do Paraná, 24 de Santa Catarina, 13 do Rio Grande do Sul, um da Paraíba e dois de Pernambuco, em biovar, filotipo e diversidade genética através das sequências repetitivas BOX, ERIC e REP (rep-PCR). Os resultados indicaram que todos os isolados estudados pertencem a biovar 1 e filotipo II. Embora tenha sido constatada homogeneidade quanto a biovar e o filotipo, os resultados da rep-PCR permitiram a divisão dos isolados em seis grupos (A, B, C, D, E e F), a partir de 61% de similaridade, independente da origem geográfica, tipo de amostra, época de coleta e cultivar. Os grupos A e B foram os que tiveram maior número de representantes, 47 e 20, respectivamente. A variabilidade encontrada por rep-PCR pode significar que outras estratégias para verificar a diversidade da população local de *R. solanacearum* devam ser utilizadas, tais como titulação da virulência e/ou comparação de sequências de alguns genes, auxiliando desta forma, nos programas de melhoramento genético de tabaco e de manejo integrado da doença.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (66p.) Julho, 2010.

# CHARACTERIZATION OF *Ralstonia solanacearum* POPULATIONS IN TOBACCO FROM BRAZIL

Author: Fernanda Carvalho Viana  
Advisor: Valmir Duarte

## ABSTRACT

*Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt on different hosts, including members of Solanaceae, causes severe losses in tobacco crop, if not managed. Being a complex species, this bacterium is classified in several ways. Lately, the species is being divided into three taxonomic levels: phylotype, sequevar and clone. Due to lack of studies on populations of *R. solanacearum* in tobacco, this research aimed to characterize 120 isolates from soil and wilted tobacco plants, from 13 counties from Paraná, 24 from Santa Catarina, 13 from Rio Grande do Sul, one from Paraíba and two from Pernambuco, by biovar, phylotype, and by using repetitive polymerase chain reaction (rep-PCR) element (BOX, ERIC and REP) primers. The results indicated that all isolates belong to biovar 1 and phylotype II. Although there was homogeneity regarding biovar and phylotype, the results of rep-PCR allowed the formation of six groups (A, B, C, D, E and F) from 61% of similarity, regardless of soil or plant or geographical origin, sample type, collecting date or cultivar. Groups A and B were those that had the greatest number of isolates, 47 and 20, respectively. The shown variability by rep-PCR suggests that other strategies, such as titration of virulence and/or comparison of some gene sequences, to study the local population diversity of *R. solanacearum* should be pursued, in order to provide more precise answers to the breeding programs of tobacco and integrated disease management.

---

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (66p.) July, 2010.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
2.1 A cultura do tabaco.....	05
2.2 O patógeno <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	08
2.2.1 Classificações de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	11
2.2.2 Diversidade genética de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	14
2.3 Manejo da murcha bacteriana.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	20
3.2 Determinação de biovar.....	21
3.3 Extração de DNA.....	22
3.4 Confirmação da identidade de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	22
3.5 Filotipagem.....	23
3.6 Diversidade genética.....	24
3.7 Análise filogenética.....	25
3.8 Titulação da virulência.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Determinação de biovar.....	28
4.2 Filotipagem.....	31
4.3 rep-PCR.....	33
4.4 Titulação da virulência.....	39
5. CONCLUSÕES.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
7. APÊNDICE.....	52



## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Carboidratos utilizados na diferenciação de biovares de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Hayward <i>et al.</i> , 1992). .....	12
2. Relação entre as raças, biovares e divisões de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Schaad <i>et al.</i> , 2001). .....	13
3. Esquema de classificação de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Fegan & Prior, 2005).....	14
4. Estado, número de municípios e origem dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> obtidos de lavouras de tabaco. Cachoeirinha, RS, 2010.....	21
5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR-multiplex para determinação do filotipo (Fegan & Prior, 2005).....	24
6. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na avaliação da diversidade genética (Versalovic <i>et al.</i> , 1994).....	25
7. Logaritmo do número de células capaz de causar doença em 50% das mudas (CE <sub>50</sub> ) em cada cultivar. Cachoeirinha, RS, 2010.....	39

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Mapa das áreas produtoras e porcentagens de produção de tabaco no Sul do Brasil (SindiTabaco, 2010).....	6
2. Croqui da distribuição das bandejas utilizadas na titulação da virulência. Cachoeirinha, RS, 2010.....	27
3. Produtos de amplificação da PCR-multiplex para filotipagem dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> . M- marcador molecular de 100 bp (Invitrogen); 1- Controle negativo (água milli-Q); 2- IB66; 3- IB133; 4- IB350; 5- 64 (PR); 6- 11 (PR); 7- 20 (PR); 8- 62 (SC); 9- 77 (SC); 10- 87 (SC); 11- 106 (RS); 12- 112 (RS); 13- 114 (RS); 14- 118 (PE); 15- 119 (PE); 16- 120 (PB). Cachoeirinha, RS, 2010. ....	32
4. Produtos de amplificação da BOX-PCR dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> . M- marcador molecular de 100 bp (Invitrogen); 1- Controle negativo (água milli-Q); 2- 108 (RS); 3- 58 (SC); 4- 59 (SC); 5- 60 (SC); 6- 61(SC); 7- 62 (SC); 8- 63 (SC); 9- 64 (SC); 10- 7 (PR); 11- 65 (SC); 12- 8 (PR); 13- 9 (PR); 14- 66 (SC); 15- 67 (SC); 16- 68 (SC); 17- 69 (SC); 18- 10 (PR); 19- 12 (PR); 20- 13 (PR); 21- 70 (SC); 22- 71 (SC); 23- 72 (SC). Cachoeirinha, RS, 2010.....	34
5. Produtos de amplificação da ERIC-PCR dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> . M- marcador molecular de 100 pb (Invitrogen); 1- Controle negativo (água milli-Q); 2- 3 (PR); 3- 65 (SC); 4- 75 (SC); 5- 14 (PR); 6- 79 (SC); 7- 80 (SC); 8- 118 (PE); 9- 119 (PE); 10- 120 (PB); 11- 114 (RS); 12- 96 (SC); 13- 97 (SC); 14- 113 (RS); 15- 85 (SC); 16- 15 (PR); 17- 82 (SC); 18- 115 (RS); 19- 7 (PR). Cachoeirinha, RS, 2010.....	34
6. Produtos de amplificação da REP-PCR dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> . M- marcador molecular de 100 pb (Invitrogen); 1- Controle negativo (água milli-Q); 2- 34 (SC); 3- 35 (SC); 4- 36 (SC); 5- 37 (SC); 6- 38 (SC); 7- 39 (SC); 8- 40 (SC); 9- 41 (SC); 10- 42 (SC); 11- 43 (SC); 12- 44 (SC); 13- 45 (SC); 14- 46 (SC); 15- 98 (RS); 16- 99 (RS); 17- 100 (RS); 18- 101 (RS); 19- 102 (RS); 20- 103 (RS); 21- 47 (SC); 22- 62 (SC); 23- 63 (SC); 24- 64 (SC); 25- 7 (PR). Cachoeirinha, RS, 2010.....	35

	Página
7. Dendograma obtido a partir da análise de rep-PCR dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e agrupamento pelo método UPGMA. Número entre parênteses indicam o número de isolados adicionais que constituem a linhagem clonal junto ao isolado representado Cachoeirinha, RS, 2010.....	37

## RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
1. Isolados utilizados no estudo. Cachoeirinha, RS, Brasil, 2010....	52
2. Estirpes padrão adquiridas da Coleção de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo. Cachoeirinha, RS, Brasil, 2010.....	55
3. Conversão de porcentagem para probits (Finney, 1971). Cachoeirinha, RS, 2010.....	55
4. Planilha binária originária da rep-PCR utilizada na construção do dendograma. Cachoeirinha, RS, Brasil, 2010.....	56
5. Relação de isolados representes seus representantes utilizados na construção do dendograma. Cachoeirinha, RS, 2010.....	63
6. Número de plantas com murcha aos 15 dias após a inoculação. Cachoeirinha, RS, 2010.....	64
7. Relação entre a concentração de células de <i>Ralstonia solanacearum</i> e o número de mudas com murcha (probit) 15 dias após a inoculação. A- Burley suscetível; B- Burley resistente; C- Virgínia suscetível; D- Virgínia resistente. Cachoeirinha, RS, Brasil, 2010.....	65

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) é uma das atividades agrícolas de maior importância econômica e social no Brasil. Dados da Afubra mostram que a cultura é predominante na região Sul, contribuindo com cerca de 96% da produção de tabaco no país, está presente em 730 municípios, envolvendo 186 mil famílias de pequenos agricultores no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo uma das culturas mais rentáveis para o pequeno agricultor.

O Brasil é o maior exportador de tabaco desde 1993, sendo o segundo maior produtor, perdendo a primeira posição para China. Na safra 2008/2009, a produtividade alcançou a marca de 744 mil toneladas oriundas de 374 mil ha, empregando direta e indiretamente mais de 2,5 milhões pessoas, sendo 1,1 milhões no meio rural. As propriedades, de 16,1 ha em média, utilizam o equivalente a 15% da área para o plantio de tabaco, e embora seja uma parcela pequena, 65% da renda das famílias é derivada desta cultura. O lucro gerado pela cultura na última safra foi de R\$ 4,3 bilhões, 13% maior que na safra anterior (2007/2008). Deste lucro, mais de 70% são pagos em impostos para o governo.

Apesar do aumento da produção ao longo dos anos, muitas lavouras são perdidas em decorrência de doenças, principalmente pela murcha

bacteriana. O agente da murcha bacteriana, *Ralstonia solanacearum* Smith, é uma bactéria Gram negativa que ataca diversas famílias botânicas, dentre elas as solanáceas. Em cultivos de tabaco a doença tem sido relatada em todas as grandes áreas produtoras tanto no Brasil como em outros países. Não existem no Brasil dados de perdas causadas pela doença em tabaco, porém, é sabido que lavouras de outras solanáceas, como batata e tomate, têm sido abandonadas em função da agressividade da doença e do difícil controle, por esta bactéria habitar naturalmente os solos e diversas hospedeiras sem manifestar sintomas, tornando-se uma importante fonte de inóculo.

*Ralstonia solanacearum* é considerada uma espécie complexa, sendo caracterizada de diversas formas. A caracterização em raças separa as estirpes em relação aos hospedeiros, enquanto que biovars as caracterizam quanto ao uso de carboidratos. Esta caracterização, inconsistente para alguns autores, ainda é amplamente utilizada. Recentemente uma nova classificação foi proposta, dividindo a bactéria em quatro níveis taxonômicos: espécie, filotipo, sequevar e clone, sendo bastante aceita pela comunidade científica.

A bactéria é endêmica em regiões subtropicais e tropicais, porém algumas raças associadas a biovars são consideradas pragas quarentenárias em alguns locais, como a raça 3/ biovar 2, predominante em batata, no Canadá, Estados Unidos (EUA) e diversos países da Europa e a raça 2, que causa murcha em musáceas no Brasil.

Do ponto de vista epidemiológico, estudos têm sido realizados com as solanáceas no Brasil, principalmente com a batata e tomate. Na década de

80, foi realizado um levantamento em todas as regiões do Brasil, indicando a predominância na região Sul da biovar 1 e da biovar 2. Em cultivos de batata, a biovar 2 é relatada mais frequentemente que a biovar 1. Apesar de ser uma importante doença para a cultura do tabaco, poucos são os relatos relacionados a esta bactéria.

Estudos de caracterização conduzidos em outros países mostram que populações de uma mesma região possuem diversidade genética, sendo esta informação de suma importância aos programas de melhoramento vegetal. No Brasil, em tabaco, ainda não existem dados sobre a diversidade populacional de *R. solanacearum*.

Com o advento da biologia molecular, diversas técnicas foram desenvolvidas para avaliar a diversidade genética de populações bacterianas, como os marcadores moleculares. Estudos realizados nos EUA e Irã, por exemplo, mostram que o uso de sequências repetitivas foram capazes de distinguir populações de *R. solanacearum* destes países, mostrando ser uma importante ferramenta do ponto de vista fitossanitário, já que algumas populações encontradas eram semelhantes à de populações de países latino-americanos.

Devido ao difícil controle da bactéria, práticas de manejo têm sido adotadas para manejar a doença, tais como época de plantio, manejo do solo e introdução de cultivares resistentes. O controle químico é uma prática inviável, econômica e tecnicamente. Neste cenário, o uso de cultivares resistentes se apresenta como alternativa mais promissora. O desenvolvimento de novas cultivares é um processo lento, que demanda alguns anos de pesquisa, sendo dificultado por não ter bem definido o

padrão genético de resistência para as diversas estirpes do patógeno. Variedades de tabaco resistentes à murcha bacteriana em uma região podem ser suscetíveis em outra. Uma das causas pode ser a existência de estirpes diferentes em cada local e também pela dificuldade de se encontrar fontes de resistência na planta.

Desta forma, o conhecimento da diversidade e distribuição de populações de *R. solanacearum* predominantes em tabaco no Brasil torna-se uma importante ferramenta na busca de novas cultivares resistentes a este patógeno. Isto impactará positivamente na produção de tabaco, beneficiando tanto os produtores, que possuem o problema instalado em sua propriedade, quanto às indústrias de tabaco.

Considerando a carência de levantamentos e estudos de diversidade genética de populações de *R. solanacearum* no Brasil, este trabalho tem como objetivo caracterizar isolados oriundos de lavouras de tabaco no país quanto a biovar, filotipo e diversidade genética.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura do tabaco

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), pertencente à família das Solanáceas, tem a América do Sul como centro de origem (Soares *et al.*, 2008). Atualmente, a cultura está presente em diversas partes do mundo e é cultivada com fins comerciais, movimentando bilhões de dólares/ ano com a produção de cigarros.

A importância econômica do tabaco no Brasil se equivale à sua importância a nível internacional. De acordo com a Associação dos Fumicultores do Brasil (Afubra, 2010) desde 1993, o Brasil é o maior exportador de tabaco no mundo, ocupando a segunda posição em volume produzido. Na safra 2008/2009, o tabaco foi cultivado em 376 mil hectares, sendo distribuído em mais de 700 municípios e 186 mil produtores integrados na região Sul. Em todo o ciclo de produção, estão envolvidas aproximadamente 800 mil pessoas, gerando uma receita de R\$ 4,4 bilhões (Afubra, 2010). O Rio Grande do Sul é o maior estado produtor de tabaco, seguido de Santa Catarina e do Paraná (Figura 1).

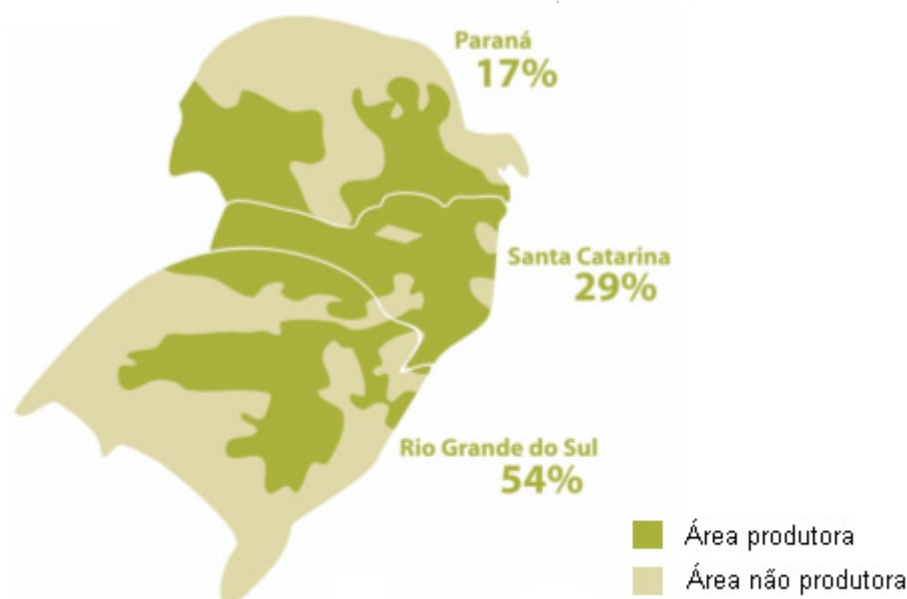


FIGURA 1. Mapa das áreas produtoras e porcentagens de produção de tabaco no Sul do Brasil (SindiTabaco, 2010).

Os dois principais tipos de tabaco cultivados na região Sul são os tipos galpão, caracterizado pela cura das folhas em galpões com ventilação natural e o tipo estufa, em que as folhas são curadas em estufas com temperatura e umidade controlada (Brasil, 2007). Em tabaco tipo Oriental, as folhas são curadas ao sol, podendo passar por um processo de fermentação posterior. O tabaco oriental apresenta características aromáticas marcantes, e são produzidos no Nordeste (NE) brasileiro, onde o clima semi-árido é propício ao seu cultivo (Brasil, 1993). As principais variedades do tabaco tipo galpão são dos grupos Burley e Comum, que participam com cerca de 16 e 2%, respectivamente, do total produzido (Afubra, 2010). Já para o tabaco tipo estufa, a variedade Virgínia é a principal, respondendo por 82% da produção na safra de 2008/2009. Já o tabaco da variedade oriental e para capa de charuto, ambos produzido no Nordeste brasileiro, contribuiu com cerca de 4,4% da produção nesta mesma safra (Afubra, 2010).

As perdas decorrentes de problemas fitossanitários durante a fase de cultivo são muitas se o manejo de solos, alocação de cultivares e outras boas práticas agrícolas são falhas. O tabaco é hospedeiro de diversos patógenos, dentre eles, *Ralstonia solanacearum* Smith (Yabuuchi *et al.*, 1995), agente causal da murcha bacteriana. O patógeno, presente em todos os continentes (Lucas, 1975; OEPP/EPPO, 2004; Denny & Hayward, 2001; Elphinstone, 2005), é responsável por perdas significativas na cultura e vem aumentando cada vez mais nos últimos anos (Fortnum, 2001; Fortnum & Kluepfel, 2005; Mila, 2010). Muitas lavouras têm sido abandonadas em função do seu difícil controle, já que esta bactéria habita naturalmente os solos e diversas plantas hospedeiras sem manifestar sintomas, tornando-se uma importante fonte de inóculo (Lopes & Refschneider, 1999).

No Brasil, não existem dados de perda provocados pela doença em tabaco (Medeiros, 2005), porém em espécies da mesma família, como batata, tomate, pimentão e berinjela, as perdas podem ser superiores a 70%, devastando as lavouras (Maciel *et al.*, 2001; Bringel, 2002; Coelho-Netto *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2007; Lopes, 2010). Em tabaco, há relatos que em algumas cidades da Carolina do Sul (EUA) aproximadamente 95% das lavouras apresentaram a doença em 1998, tendo 7% da safra afetada. No mesmo ano, perdas econômicas na Carolina do Norte e Carolina do Sul foram estimadas em 40 milhões de dólares. Perdas médias de 10 a 30% da produtividade em tabaco também foram estimadas na Austrália (Elphinstone, 2005).

Atualmente, a busca por cultivares melhoradas associada a outras práticas de manejo têm sido uma das alternativas para a produção de tabaco

em áreas infestadas. Porém, as perdas permanecem altas, devido à rápida disseminação do patógeno, seja pela movimentação do solo, por maquinários agrícolas (Fortnum & Kluepfel, 2005) ou sementes.

## **2.2 O patógeno *Ralstonia solanacearum***

*Ralstonia solanacearum* pertence a classe das  $\beta$ -proteobactérias, é Gram negativa, aeróbica e em forma de bastonetes (OEPP/EPPO, 2004). Em meio de cultura Kelman, acrescido de cloreto de trifeniltetrazólio, as colônias virulentas são fluidas, com bordas de cor creme com centro avermelhado, enquanto as colônias avirulentas são totalmente avermelhadas (Kelman, 1954).

A bactéria é um dos fitopatógenos de maior importância econômica, causando grandes perdas de produção em diversas culturas, além da persistência no solo, ampla gama de hospedeiros e distribuição geográfica (Elphinstone, 2005; Denny, 2006). Agente causal da murcha bacteriana, *R. solanacearum* possui mais de 200 espécies hospedeiras em cerca de 50 famílias botânicas, dentre elas as solanáceas (Hayward, 1991). A bactéria é endêmica em áreas tropical, subtropical e temperada, limitando o cultivo de diversas culturas nestas regiões (Genin & Boucher, 2002).

A bactéria penetra no hospedeiro através de ferimentos e aberturas naturais no sistema radicular. Após a penetração, a bactéria inicia sua multiplicação, colonizando os espaços intercelulares e posteriormente o tecido vascular (Shinohara *et al.*, 2005), restringindo a passagem de água e nutrientes a partir daquele ponto, apresentando, conseqüentemente, o sintoma de murcha. Em corte transversal do caule, é observado um

escurecimento do tecido vascular, seguido de exsudação de pus bacteriano (Lopes & Quezado-Soares, 1997; Felix, 2009). Em tabaco, o principal sintoma é a murcha unilateral da folha, semelhante a uma deficiência hídrica. Depois, o sintoma evolui para o amarelecimento foliar e morte da planta (OEPP/EPPO, 2004).

*Ralstonia solanacearum* é capaz de sobreviver por longos períodos no solo, na água e em raízes de plantas não hospedeiras. A sobrevivência no solo depende de fatores como o pH, tipo de solo, quantidade de matéria orgânica, ervas daninhas e microbiota presente (Hayward, 1991; Coutinho, 2005; Satou *et al.*, 2006). Populações de *R. solanacearum* foram recuperadas de água de rio, no verão e no outono, no Reino Unido (Elphinstone *et al.*, 1998). Em áreas de várzea, como na Amazônia e no delta do Rio Nilo no Egito, a bactéria tem sido recuperada frequentemente das áreas cultivadas com solanáceas (Coelho-Netto *et al.*, 2003; Tomlinson *et al.*, 2009). Mesmo após a rotação com diferentes culturas e pousio da área, durante um período de 3 a 5 anos, foi observada a sobrevivência de *R. solanacearum* em plantas daninhas que estavam presentes no local (Glick, 1995). A permanência do patógeno em campos de cultivo infestados ocorre em função da existência de plantas capazes de manter a bactéria em concentrações elevadas por períodos prolongados (Bringel, 2002). Em estudo realizado no Distrito Federal, foi constatado que plantas não suscetíveis à murcha bacteriana, como beterraba, cenoura, coentro, pepino, quiabo, repolho e salsa, podem manter uma população elevada de um isolado de *R. solanacearum*, altamente virulento à batata e ao tomateiro (Viana, 1995).

Por se tratar de praga quarentenária em alguns locais, como a raça 3/ biovar 2 e raça 2, a disseminação da bactéria através de hospedeiros assintomáticos tornou-se uma preocupação mundial depois de surtos recentes da doença na Europa, nos EUA e também no Brasil.

No Brasil, somente a raça 2 é considerada quarentenária (Brasil, 2008), porém não existem relatos de que esta raça seja patogênica ao tabaco, restringindo-se as espécies de banana (*Musa spp.*) e *Heliconia spp.*

As barreiras fitossanitárias na Europa ganharam maior importância após a doença provocar perdas consideráveis em batata na Suécia (Olsson, 1976), Bélgica, Inglaterra, França, Alemanha, Itália, Holanda, Portugal e Espanha (Elphinstone, 1996; Stead, 1996). Apesar de terem um controle rígido e estarem sempre alerta em relação à entrada de batata, em 1999, *R. solanacearum* foi acidentalmente introduzida nestes locais através da importação de gerânios da África e América Central, regiões onde a bactéria é endêmica (Janse *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2007). Porém, nos EUA, o impacto foi maior em 2003 e 2004, quando plantas de gerânio foram importadas do Quênia, Costa Rica e Guatemala, provocando murcha em sementeiras desta espécie nas casas de vegetação, causando sérios prejuízos (Swanson *et al.*, 2007).

Nos EUA, o Departamento de Agricultura (United States of Department Agriculture - USDA), e na Europa, a Organização de Proteção de Plantas (European and Mediterranean Plant Protection - EPPO) são órgãos fiscalizadores, que tem como objetivo desenvolver estratégias para evitar a entrada e disseminação de agentes fitopatogênicos, além de promoverem a segurança e efetivos métodos de controle, o que tornaram

estes órgãos referências mundiais no combate à murcha bacteriana (EPPO, 2010).

### **2.2.1 Classificações de *Ralstonia solanacearum***

*Ralstonia solanacearum* é considerada uma espécie complexa, por apresentar variabilidade fenotípica e genética dentro da própria espécie (Gillings & Fahy, 1994; Tsuchiya, 2004; Fegan & Prior, 2005). As análises fenotípicas e genotípicas de isolados de *R. solanacearum* de diferentes regiões geográficas também evidenciaram a heterogeneidade da bactéria (Timms-Wilson *et al.*, 2001).

O primeiro tipo de classificação utilizado para *R. solanacearum* consistiu em diferenciação de raças, em total de cinco, devido à preferência por determinados hospedeiros (Buddenhagem *et al.*, 1962; Hayward, 1991). Posteriormente, classificou-se a princípio em cinco biovars, com base na utilização de diversas fontes de carbono (Hayward, 1964; Hayward, 1991) (Tabela 1). Um sexto biovar foi considerado, após estudos que mostraram uma variação da biovar 2, a variante tropical 2T (ou N2) (Hayward *et al.*, 1992). Diferenças em relação ao fenótipo da biovar 2 foram observadas, sendo sugerida nova nomenclatura: biovar 2A (Andes), para isolados especializados em batata em climas frios e biovar 2T (tropical), para isolados associados a regiões de baixa altitude (French *et al.*, 1993).

TABELA 1. Carboidratos utilizados na diferenciação de biovars de *Ralstonia solanacearum* (Hayward *et al.*, 1992).

Carboidratos	Biovars					
	1	2	2T	3	4	5
Manitol	-	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	-	+	+	-
Trealose	+	-	+	+	+	+
Lactose	-	+	+	+	-	+
Maltose	-	+	+	+	-	+
Celobiose	-	+	+	+	-	+

A classificação em raças e biovars tem sido utilizadas há mais de 40 anos. Porém, estes tipos de classificação, baseados na caracterização fenotípica, têm se mostrado inconsistentes (Alvarez, 2005; Champoiseau, 2010).

Estudo empregando a técnica molecular de RFLP (Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição), mostrou que *R. solanacearum* podia ser agrupada em duas divisões, de acordo com a origem geográfica: a divisão 1, com estirpes primeiramente isoladas da Ásia, compreendendo às biovars 3, 4 e 5, e a divisão 2, com estirpes primeiramente isoladas das Américas, cujos biovars 1, 2 e 2T fazem parte (Cook *et al.*, 1989; Cook & Siqueira, 1994) (Tabela 2). A análise do sequenciamento do gene 16S do DNAr confirmaram os resultados do RFLP, separando a espécie em duas divisões e incluindo, dentro da divisão americana, isolados da Indonésia (Taghavi *et al.*, 1996; Seal *et al.*, 1999), assim como isolados coreanos e japoneses (Jeong *et al.*, 2007). Pelo sequenciamento também foi possível



incluir *Pseudomonas syzygii* e blood disease bacterium (BDB) na divisão 2 (Seal *et al.*, 1999), ambas reclassificadas posteriormente como do gênero *Ralstonia*. Posteriormente, através do sequenciamento parcial dos genes *hrpB* e *egl*, isolados de *R. solanacearum* de origem africana foram também incluídos na divisão americana (Poussier *et al.*, 2000).

TABELA 2. Relação entre as raças, biovares e divisões de *Ralstonia solanacearum* (Schaad *et al.*, 2001).

Raça	Hospedeiro	Distribuição Geográfica	Biovar	Divisão <sup>1</sup>
1	Solanáceas e outros	Ásia, Austrália Américas	3,4 1	1 2
2	Musáceas	Caribe, Brasil, Filipinas	1	2
3	Batata (primeiramente)	em todo o mundo <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2
4	Gengibre	Ásia	3,4	1
5	Amoreira	China	5	1

<sup>1</sup> Baseado na técnica de RFLF (Restriction Fragment Length Polymorphism).

<sup>2</sup> Originário nos Andes, mas disseminado pelo mundo pela infecção latente de tubérculos de batata.

<sup>3</sup> Tipicamente da raça 3, também referidos como biovar 2A. As estirpes da Amazônia pertencem ao biovar 2T.

Recentemente foi proposto um esquema de classificação hierárquica, capaz de distinguir a diversidade existente na espécie em quatro níveis taxonômicos: espécie, filotipo, sequevar e clone (Fegan & Prior, 2005) (Tabela 3). Através deste esquema, *R. solanacearum* pode ser dividida em quatro filotipos, referentes a origem geográfica: o filotipo I contendo estirpes isoladas da Ásia; filotipo II, estirpes das Américas; filotipo III, estirpes africanas; e filotipo IV, estirpes isoladas primeiramente da Indonésia, Japão,

Filipinas, Coréia e Austrália (Fegan & Prior, 2005; Villa *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2007).

Os filotipos são determinados por PCR-multiplex, cujo desenvolvimento foi baseado nas sequências da região ITS, gene *hrpB* e do gene *egl*. Cada filotipo é composto por um número de sequevares. O sequevar (sequência variante), que é definido como um grupo de isolados com sequências altamente conservadas, é analisado com base no sequenciamento do gene *egl*. Já as linhas clonais são identificados utilizando técnicas que mostrem diferenças no genoma, tais como rep-PCR, RAPD, AFLP e PFGE (Fegan & Prior, 2005).

TABELA 3. Esquema de classificação de *Ralstonia solanacearum* (Fegan & Prior, 2005). Cachoeirinha, RS, 2010.

Nível Taxonômico	Equivalência Taxonômica	Nomenclatura	Método de identificação
Espécie	Espécie	complexo <i>R. solanacearum</i>	PCR - Oligonucleotídeos
Filotipo	Subespécie	Filotipos I, II, III e IV	PCR - Multiplex (ITS)
Sequevar	Grupo Infrasubespecífico	Sequevar 1-23	Sequenciamento do gene da Endoglucanase
Clone	Linha Clonal		<i>Fingerprinting</i> do Genoma (rep-PCR, RAPD, AFLP, etc.)

### 2.2.2 Diversidade genética de *Ralstonia solanacearum*

A técnica de marcadores moleculares tem sido considerada uma ferramenta simples, capaz de avaliar a diversidade genética de inúmeras populações bacterianas (De Bruijn, 1992; Tsuchiya, 2004). Para *R. solanacearum*, as técnicas moleculares têm permitido o estudo do

relacionamento filogenético e evolucionário, bem como o de variabilidade em nível intraespecífico (Silveira *et al.*, 2005).

Métodos baseados na análise genômica têm sido empregados na avaliação da diversidade genética entre *R. solanacearum*, destacando o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), análise do gene *hrp*, PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Smith *et al.*, 1995; Poussier *et al.*, 1999; Martins, 2000; Horita *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2003; Jaunet & Wang, 1999; Horita & Tsuchiya, 2001).

Através da reação em cadeia da polimerase, as sequências repetitivas (rep-PCR), composta principalmente pelos elementos BOX, ERIC e REP, têm sido utilizadas em estudos de diversidade genética de fitobactérias, incluindo espécies de *Xanthomonas* (Mahuka *et al.*, 2006), *Pseudomonas* (Louws *et al.*, 1994), *Clavibacter* (Louws *et al.*, 1998) e *Ralstonia* (Frey *et al.*, 1996; Jaunet & Wang, 1999; Kumar *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2005; Ivey *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2007).

O elemento REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), possui sequências de 35-40 pares de base (pb), que estão dispersas em todo genoma bacteriano. Já o ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) possui sequências de 124-127 pb altamente conservadas e presente em locais diferentes no genoma entre as espécies, e, o elemento BOX, possui sequências de 154 pb (Versalovic *et al.*, 1994). Estas sequências parecem estar localizadas em posições distintas ao longo do cromossomo, e muito embora sua função não seja clara, sugere-se alguma

importância na organização do genoma bacteriano (Versalovic *et al.*, 1994; Burr *et al.*, 1998).

Recentemente no Irã, isolados de *R. solanacearum* raça 3/ biovar 2 oriundos de batata foram agrupados através da rep-PCR por origem geográfica, separando os isolados mundialmente distribuídos daqueles com características genotípicas e fenotípicas relacionados à biovar 2T originária da América do Sul (Nouri *et al.*, 2009). Avaliando isolados de batata nas Filipinas, a análise de ERIC e BOX-PCR revelou grande variabilidade genética. Os isolados foram agrupados por área de coleta, porém os grupos formados não tinham correlação com a patogenicidade (Natural *et al.*, 2005).

Nos EUA, 107 isolados interceptados de hortaliças e plantas ornamentais foram avaliados através da rep-PCR, onde foi possível o agrupamento dos isolados por biovar e origem (Norman *et al.*, 2009). Resultados similares foram obtidos comparando isolados brasileiros de diferentes hospedeiros com isolados africanos, da América Central, Indonésia, Peru e Austrália, via REP-PCR, sendo agrupados por origem, mas não por raça ou biovar (Martins, 2000). Diferentemente, nas Filipinas, a análise de ERIC-PCR dos isolados de berinjela coletados em cinco províncias formaram grupos predominantes, mas independente do local (Ivey *et al.*, 2007).

A caracterização de isolados das biovars 1 e 2 em batata no Rio Grande do Sul foi feita através da rep-PCR e RAPD, sendo diferenciadas as biovars 1 e 2 por ERIC e BOX-PCR. Neste caso, somente por BOX-PCR foi possível verificar a variabilidade existente entre isolados da biovar 2. Já com o RAPD, a separação das biovars foi clara, apresentando um perfil

característico relacionado com a origem do isolado, revelando a existência de pouca variabilidade no local (Silveira *et al.*, 2005).

Resultados similares foram obtidos utilizando os elementos ERIC e BOX (Van Der Wolf *et al.*, 1998), sendo possível agrupar isolados de mesma biovar, porém não houve variação entre os isolados da biovar 2. A variabilidade entre isolados da biovar 2 também foi determinada utilizando a técnica PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), sendo encontradas 10 linhagens clonais distintas entre 45 isolados da biovar 2, obtidos em áreas produtoras de batata no Quênia (Smith *et al.*, 1995).

Isolados de origem amazônica, oriundos de diversos hospedeiros, foram submetidos à análise com o elemento BOX. Foi observado alto grau de polimorfismo entre os isolados, que ficaram divididos em cinco agrupamentos, porém sem correlação com o hospedeiro, biovar, ecossistema ou local de coleta (Costa *et al.*, 2007).

### **2.3 Manejo da Murcha Bacteriana**

*Ralstonia solanacearum* é um patógeno de difícil controle devido à sua capacidade de sobreviver no solo por longos períodos na ausência de hospedeiros, e também, pelo grande número de hospedeiros desta bactéria (Takatsu & Lopes, 1997; Lopes & Reifschneider, 1999). Práticas de manejo têm sido utilizadas para controlar a doença, tais como época de plantio, manejo do solo e também a introdução de cultivares resistentes. Porém, ainda encontra-se dificuldade em desenvolver estratégias de controle, devido à falta de conhecimentos sobre a ecologia e a evolução desta bactéria (Cook & Siqueira, 1994).

Para estudos epidemiológicos e o controle efetivo de doenças, o conhecimento da estrutura genética da população é importante, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de genótipos resistentes (Van der Wolf *et al.*, 1998). A grande diversidade genética encontrada em bactérias de solo e a diferenciação genética destas populações podem chegar ao nível microgeográfico, dependendo do tipo de solo e propriedades da rizosfera do hospedeiro (Dii Cello *et al.*, 1997; Silveira, 2002).

As populações bacterianas podem sofrer diferentes processos seletivos, dando origem a diversos padrões de diversidade genética. Além disso, a distância geográfica também pode ser responsável por influenciar a variação e a estrutura genética da população devido à diminuição do fluxo gênico, induzindo a divergência (Castillo & Greenberg, 2007). Desta forma, a forte correlação existente entre a variabilidade genética de *R. solanacearum* e o número de espécies hospedeiras gera problemas no manejo da doença, assim como, dificuldades na produção de cultivares de plantas que sejam universalmente resistentes (Genin & Boucher, 2002).

Como o controle químico é inviável, uma vez que a doença está instalada na lavoura, a alternativa é o uso de cultivares melhoradas resistentes ao patógeno. Sabe-se que a busca por cultivares melhoradas é lenta, o que demanda alguns anos de desenvolvimento. Muitas vezes, o melhoramento de cultivares realizado utilizando uma estirpe não demonstra bons resultados, e isto é observado pelo desempenho desuniforme das cultivares ditas resistentes em diferentes regiões (Medeiros, 2005). Isto pode ocorrer devido à interferência do ambiente ou pela presença de estirpes com

características diferentes daquela em que foi desenvolvido o trabalho de melhoramento.

A falta de conhecimento sobre as estirpes existentes em uma determinada área dificulta, e às vezes, torna inviável a seleção de genótipos resistentes em programas de melhoramento (Bringel, 2002). Desta forma, é necessário considerar a variabilidade e a distribuição dos isolados do patógeno na região de cultivo (Elphinstone, 1992). Estudos sobre a virulência do patógeno também servem de auxílio no melhoramento. A titulação da virulência, é um método simples, mas tem sido pouco utilizado para fins de melhoramento.

Na Flórida, foi conduzido um estudo sobre a diversidade genética de isolados de *R. solanacearum* que foram interceptados nos EUA. Além da diversidade, avaliou-se a patogenicidade dos isolados de tomate, pimentão e plantas ornamentais. O estudo mostrou que todos os isolados eram altamente virulentos ao tomate e todos causaram murcha em tabaco, apesar da agressividade ser diferente (Norman *et al.*, 2009).

Estudos epidemiológicos e de diversidade das populações de *R. solanacearum* predominantes em batata na região Sul e em tomate na Amazônia têm mostrado um retrato do que está ocorrendo no Brasil (Silveira *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2007). Estas informações são de fundamental importância, pois poderão auxiliar o trabalho de melhoramento na busca de novas cultivares e no desenvolvimento de novas estratégias de manejo da doença.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia (LFM) da Souza Cruz S.A., Cachoeirinha, RS.

#### 3.1 Isolados de *Ralstonia solanacearum*

Cento e vinte isolados de *R. solanacearum* da coleção do LFM, obtidos de 1988 a 2010, provenientes de lavouras de tabaco do Paraná (PR), Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS), Pernambuco (PE) e Paraíba (PB), de solos e de plantas com sintomas de murcha bacteriana foram utilizados (Tabela 4). Os isolados de 1 a 23 são oriundos do PR, de 24 a 97 de SC, de 98 a 117 do RS, 118 e 119 de PE e o isolado 120 da PB (Apêndice 1). Um isolado de tomate, oriundo do RS, foi utilizado, assim como três estirpes padrão adquiridas da coleção do Instituto Biológico de São Paulo (Apêndice 2). Os isolados foram recuperados em meio de cultura SPA (sacarose, 20; peptona, 5; agar, 18 g/L de água destilada) contendo 0,005% de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC), a 28°C por 48 h. Colônias fluidas e de centro avermelhado foram utilizadas nos testes posteriores.



TABELA 4. Estado, número de municípios e origem dos isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de lavouras de tabaco. Cachoeirinha, RS, 2010.

Estado	Municípios	Origem	
		Solo	Planta
Paraná	13	7	16
Rio Grande do Sul	11	9	13
Santa Catarina	24	13	59
Paraíba	1	-	1
Pernambuco	2	-	2
Total	51	29	91

### 3.2 Determinação de biovar

Os isolados foram cultivados em meio de cultura Kelman (peptona, 10; caseína, 1; agar, 18 g; glicerol, 5 mL/ L de água destilada, pH 7,0) (Kelman, 1954) a 28 °C por 24 h. A partir de uma colônia isolada foi feita uma suspensão de 10<sup>8</sup> células/ mL em solução salina 0,85%, sendo 50 µL transferidos para o meio basal (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; KCl, 0,2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2; azul de bromotimol, 0,03; agar, 6 g/L de água destilada), contendo 1% de celobiose ou lactose ou maltose, passados por filtro de 0,2 µm, ou dulcitol ou manitol ou sorbitol, autoclavados a 110 °C por 20 min. O meio basal sem os carboidratos foi utilizado como controle negativo. As placas foram incubadas a 28 °C e as avaliações realizadas após 5, 7, 12 e 20 dias. A capacidade do isolado utilizar a fonte de carbono foi considerada positiva quando a cor do meio mudou de verde-oliva para amarela (Schaad *et al.*, 2001). Estirpes padrão da biovar 1, 2 e 3 adquiridas da Coleção de Culturas do Instituto Biológico (IBSBF), serviram de controle positivo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.3 Extração de DNA

O DNA dos isolados foi extraído por lise alcalina (Carvalho, 2009). Uma colônia típica de cada isolado foi cultivada em meio LB (triptona, 10; extrato de levedura, 5; NaCl, 10 g/L de água destilada - pH 7,0 ajustado com NaOH) por 24 h a 28°C. Após o período de incubação, 1,5 mL da cultura foram transferidos para um microtubo, centrifugadas a 5000 g por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o procedimento anterior foi repetido. O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) 1 mM) e agitado em vortex, acrescido em seguida de 100 µL do tampão de lise (água destilada, 9,3 mL; NaOH 10 N, 200 µL; SDS 20%, 500 µL). O microtubo foi agitado de três a quatro vezes por inversões suaves, ficando em descanso por 5 min. Foram acrescentados 300 µL da solução de neutralização (Acetato de Amônio 7,5 M) e em seguida foi realizada a centrifugação a 12000 g por 5 min. Todo o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Foram acrescentados dois volumes de etanol 95%; centrifugado a 12000 g por 15 min e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 12000 g por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o DNA extraído foi seco ao ar por 2 h. O DNA foi solubilizado em tampão TE contendo RNase (20 µg/ mL) e mantidos a -20°C.

### 3.4 Confirmação da identidade de *Ralstonia solanacearum*

O DNA dos isolados de *R. solanacearum* foi diluído 1:10 em água milli-Q esterilizada e submetido à PCR com os oligonucleotídeos iniciadores (oligos) OLI1 (5' GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC 3') e Y2 (5'

CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT 3') (Seal *et al.*, 1993). A reação foi realizada em um volume final de 20  $\mu$ L (tampão (20 mM Tris pH 8,4; 50 mM KCl), 1 X; oligos 1,0  $\mu$ M;  $MgCl_2$ , 2,0 mM; dNTPs, 0,25 mM; *Taq* DNA polimerase, 1 U/ reação (Invitrogen); DNA, 1  $\mu$ L) em termociclador TECHNE (TC-312), nas seguintes condições: 94 °C/ 2 min, 30 X (94 °C/ 45 s, 68 °C/ 20 s, 72 °C/ 20 s), 72 °C/ 10 min, tendo a água Milli-Q esterilizada como controle negativo. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1,5% (Invitrogen) com TBE 0,5 X contendo 10  $\mu$ L de SYBR Safe (Invitrogen), submetidos à eletroforese a 4 V/ cm por 2 h, visualizados sob luz ultravioleta e fotografado posteriormente.

### 3.5 Filotipagem

O DNA dos isolados foi submetido à PCR-multiplex (Fegan & Prior, 2005) sem os oligos 759/760, universais para *R. solanacearum*, em um volume final de 20  $\mu$ L (tampão (20 mM Tris pH 8,4; 50 mM KCl), 1 X;  $MgCl_2$ , 1,5 mM; dNTPs, 0,25 mM; oligos (Tabela 5); *Taq* DNA polimerase, 2 U/ reação (Invitrogen); DNA diluído 1:10, 1  $\mu$ L), nas seguintes condições: 96 °C/ 5 min, 30 X (94 °C/ 15 s; 59 °C/ 30 s; 72 °C/ 30 s), 72 °C/ 10 min, tendo a água Milli-Q esterilizada como controle negativo. Os produtos da PCR foram separados conforme descrito anteriormente.

TABELA 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR-multiplex para determinação do filotipo (Fegan & Prior, 2005).

Nome	Concentração (pmol)	Sequência
Nmult:21:1F	7	5' CGTTGATGAGGCGCGCAATTT 3'
Nmult:21:2F	7	5' AAGTTATGGACGGTGGGAAGTC 3'
Nmult:23:AF	18	5' ATTACSAGAGCAATCGAAAGATT 3'
Nmult:22:InF	7	5' ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA 3'
Nmult:22:RR	10	5' TCGCTTGACCCTATAACGAGTA 3'

### 3.6 Diversidade genética de *Ralstonia solanacearum*

A PCR para cada sequência repetitiva - BOX, ERIC e REP (Versalovic *et al.*, 1994) - foi realizada separadamente, em um volume final de 20  $\mu$ L (tampão (20 mM Tris pH 8,4; 50 mM KCl), 1 X; MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM (ERIC e REP) e 2,0 mM (BOX); dNTPs, 0,25 mM; oligos (Tabela 6); *Taq* DNA polimerase, 2 U/ reação (Invitrogen); e, DNA diluído 1:10, 1  $\mu$ L), nas seguintes condições: 95°C/ 7 min, 30 X (94°C/ 1 min; 53°C (BOX), 52°C (ERIC) e 44°C (REP) / 1 min; 65°C/ 8 min), 65°C/ 16 min. A água Milli-Q esterilizada foi utilizada como controle negativo. Os produtos da PCR foram separados conforme descrição anterior, exceto o tempo de corrida (4,5 h).

TABELA 6. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na avaliação da diversidade genética (Versalovic *et al.*, 1994).

Nome	Concentração ( $\mu\text{mol}$ )	Sequência
BOX		
BOXA1 R	30	5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3'
REP		
REP 1	50	5' IIIICGICGICATCIGGC 3'
REP 2	50	5' ICGICTTATCIGGCCTAC 3'
ERIC		
ERIC 1R	50	5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3'
ERIC 2	50	5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'

### 3.7 Análise filogenética

Os perfis resultantes da amplificação por rep-PCR foram analisados através das bandas formadas entre 300 e 1500 pb no gel de agarose, sendo estimadas visualmente. Matrizes de presença-ausência foram construídas baseadas nestas bandas formadas e que posteriormente foram analisadas pelo programa NTSYS, versão 2.1. O coeficiente de similaridade para as combinações geradas foram determinados pelo coeficiente de similaridade de Dice (Dice, 1945) usando o programa SIMQUAL e o agrupamento pelo método UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Average) para a construção do dendograma dos isolados.

### 3.8 Titulação da Virulência

Isolados de *R. solanacearum* 15, 70 e 112, oriundos do PR, SC e RS respectivamente, foram selecionados aleatoriamente e avaliados em cultivares resistentes e suscetíveis de tabaco Burley e Virgínia, duas vezes.

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de Kelman, a 27°C por 48 h e transferidos para solução salina (NaCl 0,85%). A suspensão bacteriana foi ajustada no Densimat (Biomeriéux) para  $10^8$  UFC/mL (D.O.<sub>600</sub>= 0,1) e diluída para  $10^7$  e  $10^6$  UFC/mL.

Os tratamentos constaram de quatro cultivares e três isolados bacterianos em três diluições, em 36 bandejas contendo duas bandejas de 25 células cada, simulando o sistema *float* (Figura 2). Em casa de vegetação, mudas de tabaco com 45 dias foram feridas (corte de raízes secundárias expostas no torrão) e imediatamente inoculadas com 1,5 L da suspensão bacteriana correspondente por bandeja. Após a completa absorção, o nível de água foi mantido em 2 cm de profundidade. Após 15 dias, o número de mudas com murcha foi registrado e transformado em porcentagem e probits, de acordo com a tabela de Finney (1971, Apêndice 3). Um gráfico foi construído para cada cultivar, correlacionando o probit (Y) e o logaritmo da concentração bacteriana (X). A concentração estimada de células que induz murcha em 50% das mudas (CE<sub>50</sub>) foi estimada através da equação linear gerada pelos dados, localizando o valor no eixo X correspondente a cinco no eixo Y (Ercolani, 1984; Yossen *et al.*, 1998).

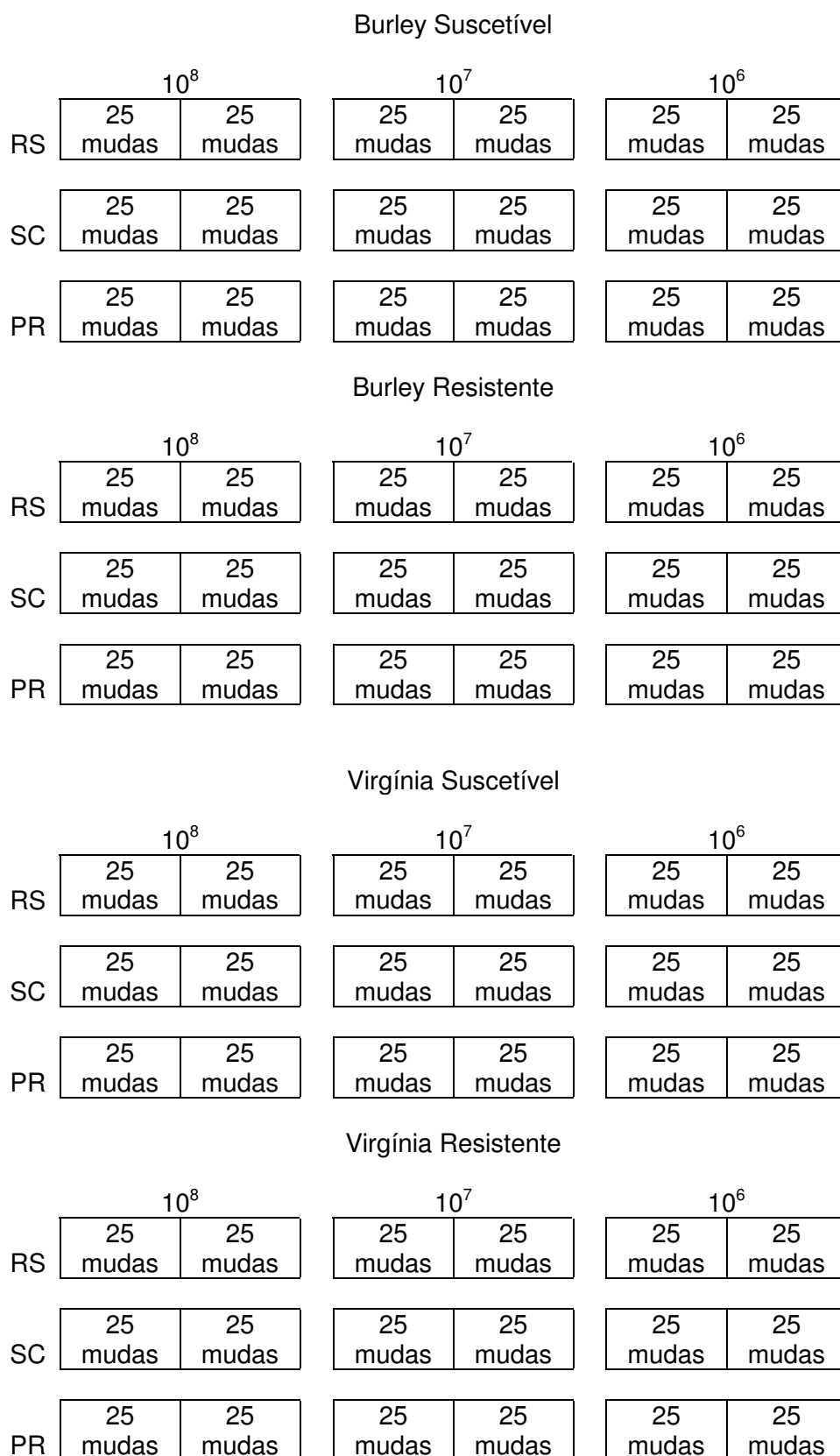


FIGURA 2. Croqui da distribuição das bandejas utilizadas na titulação da virulência. Cachoeirinha, RS, 2010.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação de biovar

Independente do tipo de amostra, da cultivar, da época de coleta ou da origem geográfica, os 120 isolados foram identificados como biovar 1. A ocorrência da biovar 1 no Rio Grande do Sul (RS) já havia sido relatada em tabaco, assim como da biovar 3 na Bahia (BA) (Duarte *et al.*, 2003). A biovar 1 tem sido registrada na região Sul, principalmente na cultura da batata (Lopes *et al.*, 1993; Silveira *et al.*, 2002; Maciel *et al.*, 2004).

A homogeneidade em relação a biovar entre os isolados de *R. solanacearum* de tabaco na Coréia também foi confirmada, porém todos da biovar 3 (Jeong *et al.*, 2007). Na China, as biovars 3 e 4 foram identificadas em tabaco (Xu *et al.*, 2009). Por outro lado, a biovar 1 é predominante em tabaco e tomate no sudeste dos EUA (Denny & Hayward, 2001). Também existem relatos desta biovar em tabaco no México (Elphinstone, 2005).

No Brasil, estudos revelaram a predominância da biovar 1 nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-oeste, onde predomina clima quente (Reifschneider & Takatsu, 1985). Cultivos irrigados de tomate e batata no Centro-Oeste ficam limitados pela bactéria, inviabilizando a cultura em muitos casos (Elphinstone, 2005). Em viveiros clonais de eucalipto ocorreram prejuízos na ordem de milhões de dólares, nos estados do



Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais e Pará em decorrência desta biovar (Alfenas *et al.*, 2006). Há registros na Amazônia das biovars 1 e 3 devastando cultivos de tomate (Coelho-Netto *et al.*, 2003). A predominância da biovar 1 também foi encontrada em jiló e berinjela, seguida da biovar 3, que apareceu mais frequentemente em pimentas. Por outro lado a biovar 2T também foi encontrada, mas em menos de 10% dos isolados de tomate e pimentão estudados (Coelho-Netto *et al.*, 2004).

A ocorrência das biovars 1 e 2 em batata, com predominância da última, também foi verificada no Paraná (PR) e no RS (Silveira *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 1993). No estudo de Silveira (2002) em batata, 80 isolados originários dos municípios de São Lourenço do Sul e Pelotas foram caracterizados na sua totalidade como biovar 2. Embora estes municípios também sejam produtores de tabaco, no presente trabalho não foi detectada a presença da biovar 2 entre os isolados oriundos de amostras de solo coletadas naquela região.

Em cultivos de helicônias no Pernambuco (PE) e no Distrito Federal a biovar 1/ raça 2, praga quarentenária no Brasil, foi detectada. Presume-se que o patógeno tenha entrado no país através de mudas de regiões em que a doença está presente ou de mudas sem procedência conhecida, deixando em alerta a vigilância fitossanitária (Assis *et al.*, 2005; Zoccoli *et al.*, 2009).

Pesquisas conduzidas com diferentes hospedeiros, em várias partes do mundo, ora mostram homogeneidade de biovars, ora não. Na Ásia, a maior frequência é das biovars 3, 4 e 5. No Japão, os isolados da planta ornamental *Campanula* sp. foram identificados como biovar 3 (Kusumoto & Takikawa, 2005). Já na Coréia, em estudo realizado com tomate, batata,

pimentão e berinjela, a biovar 4 foi predominante na maioria das amostras, porém também foi detectada a presença da biovar 1, mas apenas em uma determinada região do país (Jeong *et al.*, 2007). Na China, não foi observada a presença da biovar 1 entre os 92 isolados estudados, sendo encontrada as biovars 3 e 4 em batata e tomate (Xu *et al.*, 2009). Nas Filipinas, 70 e 30% dos isolados de berinjela foram determinados como biovars 4 e 3, respectivamente (Ivey *et al.*, 2007).

Já no continente americano, as biovars 1 e 2 ocorrem mais freqüentemente, embora também seja detectada a biovar 3. Na Guatemala, isolados de banana foram identificados como biovar 1, enquanto que os isolados de tomate e berinjela revelaram ser da biovar 3 (Sanchez-Perez *et al.*, 2008); a biovar 2 também foi encontrada em gerânios assintomáticos (Swanson *et al.*, 2007). Em decorrência da importação de flores com infecção latente da América Central, Canadá e Quênia, as biovars 1 e 2 tem sido detectadas frequentemente em gerânios nos EUA (Ji *et al.*, 2007; Norman *et al.*, 2009).

Apesar de todos os isolados de tabaco estudados pertencerem a biovar 1, isto não significa que estes isolados sejam geneticamente iguais ou tenham o mesmo padrão de virulência. A classificação em biovars (Hayward, 1964) ainda é utilizada como forma de caracterização de *R. solanacearum*, porém, sistemas de classificação baseados na caracterização fenotípica têm se mostrado inconsistentes (Alvarez, 2005; Champoiseau, 2010).

### 4.3 Filotipagem

Os 120 isolados de *R. solanacearum*, oriundos do PR, SC, RS, PE e PB de tabaco, foram identificados como filotipo II, de origem americana (Figura 3). A banda de 372 pb, esperada para estirpes do filotipo II (Fegan & Prior, 2005), foi obtida por PCR-multiplex para todos os isolados de tabaco deste estudo, incluindo as estirpes IB133, IB350 e o isolado Tomate. Uma exceção foi observada para a estirpe IB66, cujo produto foi uma banda de 144 pb, esperada para estirpes de origem asiática, filotipo I.

O filotipo II agrupa estirpes das biovars 1, 2 e 2T (Fegan & Prior, 2005). Embora não tenham sido encontradas estirpes do filotipo I entre os isolados estudados, o registro da ocorrência da biovar 3 em tabaco cultivado em Cruz das Almas, BA (Duarte *et al.*, 2003) não exclui esta possibilidade, pois o filotipo I inclui todas as estirpes pertencentes às biovars 3, 4 e 5, isoladas primeiramente da Ásia (Fegan & Prior, 2005). O registro da biovar 3 poderia ser devido a diferença do tipo de tabaco produzido naquela área, com cultivares específicas para capa de charuto. No entanto, os três isolados do presente trabalho, oriundos de PE e da PB, de tabaco tipo Oriental Brasileiro, também foram caracterizados como filotipo II.

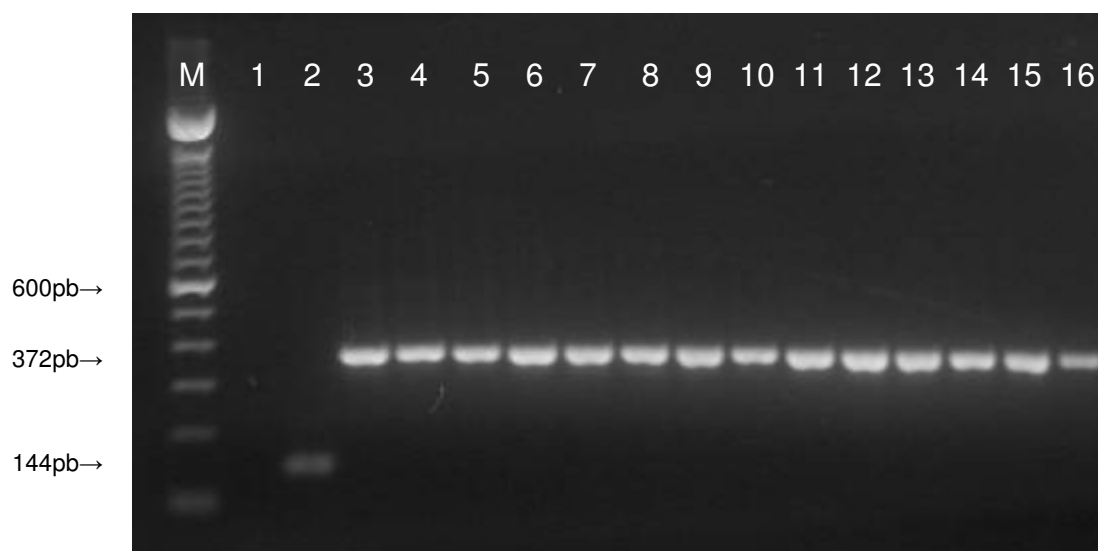


FIGURA 3. Produtos de amplificação da PCR-multiplex para filotipagem dos isolados de *Ralstonia solanacearum*. M- marcador molecular de 100 bp (Invitrogen); 1- Controle negativo (água milli-Q); 2- IB66; 3- IB133; 4- IB350; 5- 64 (PR); 6- 11 (PR); 7- 20 (PR); 8- 62 (SC); 9- 77 (SC); 10- 87 (SC); 11- 106 (RS); 12- 112 (RS); 13- 114 (RS); 14- 118 (PE); 15- 119 (PE); 16- 120 (PB). Cachoeirinha, RS, 2010.

A filotipagem foi importante para distinguir isolados oriundos de outras localidades em países como EUA e Irã. A biovar 3, pertencente ao filotipo I, foi identificada entre isolados de plantas ornamentais nos EUA. Comparando os isolados encontrados a outros já caracterizados, foi verificada a semelhança com um isolado de Martinica, na América Central. A ocorrência deste isolado é rara nos EUA e isto pode ser atribuído à entrada do patógeno através de hospedeiros sem sintomas aparentes (Norman *et al.*, 2009). A ocorrência da biovar 2T, filotipo II em cultivos de batata fora do continente americano, foi relatada pela primeira vez (Nouri *et al.*, 2009). Ainda não se sabe como este isolado foi introduzido no país, uma vez que a batata-semente é importada da Alemanha e dos Países Baixos, locais onde não há relato desta biovar (Nouri *et al.*, 2009).

A caracterização de isolados brasileiros de *R. solanacearum* é escasso. No trabalho de Fegan & Prior (2005), apenas um isolado brasileiro oriundo de batata foi estudado, sendo caracterizado como filotipo II. Assim, o presente estudo caracterizou em filotipo II os isolados de *R. solanacearum* oriundos de tabaco no Brasil. A presença de outros filotipos no Brasil é possível, porém estirpes de *R. solanacearum* de outros hospedeiros deverão ser estudados.

#### **4.4 Diversidade genética de *Ralstonia solanacearum***

Baseado na proposta de classificação hierárquica de *R. solanacearum* sugerida por Fegan & Prior (2005), a rep-PCR é uma ferramenta capaz de detectar linhas clonais da bactéria, sendo de fácil utilização. O DNA dos isolados de *R. solanacearum* foi amplificado por PCR utilizando os oligos iniciadores para as sequências repetitivas BOX, REP e ERIC, produzindo múltiplos produtos, com tamanhos variando de 1500 a 300 pb, resultando em diferentes perfis genéticos (Figuras 4, 5 e 6).

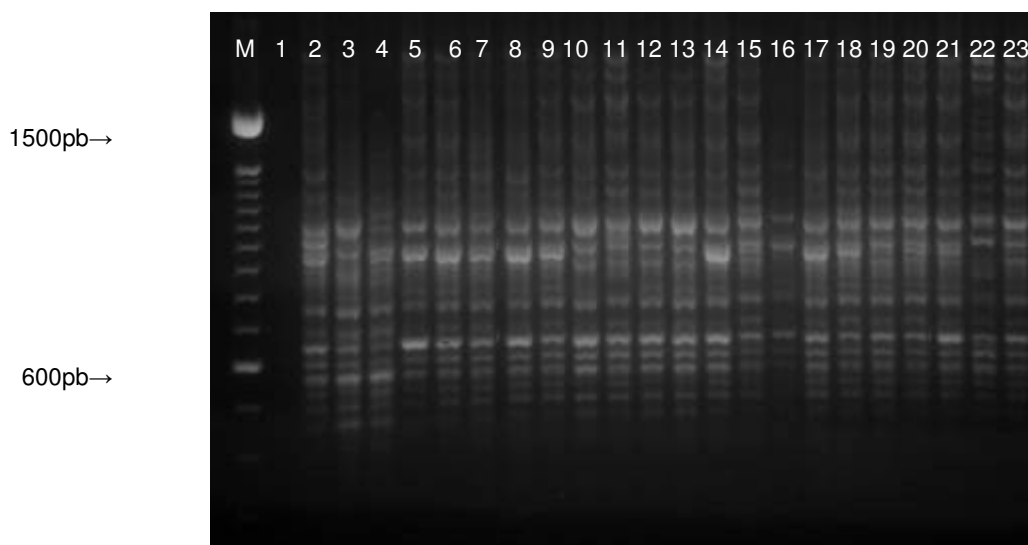


FIGURA 4. Produtos de amplificação da BOX-PCR dos isolados de *Ralstonia solanacearum*. M- marcador molecular de 100 pb (Invitrogen); 1- Controle negativo (água milli-Q); 2- 108 (RS); 3- 58 (SC); 4- 59 (SC); 5- 60 (SC); 6- 61(SC); 7- 62 (SC); 8- 63 (SC); 9- 64 (SC); 10- 7 (PR); 11- 65 (SC); 12- 8 (PR); 13- 9 (PR); 14- 66 (SC); 15- 67 (SC); 16- 68 (SC); 17- 69 (SC); 18- 10 (PR); 19- 12 (PR); 20- 13 (PR); 21- 70 (SC); 22- 71 (SC); 23- 72 (SC). Cachoeirinha, RS, 2010.

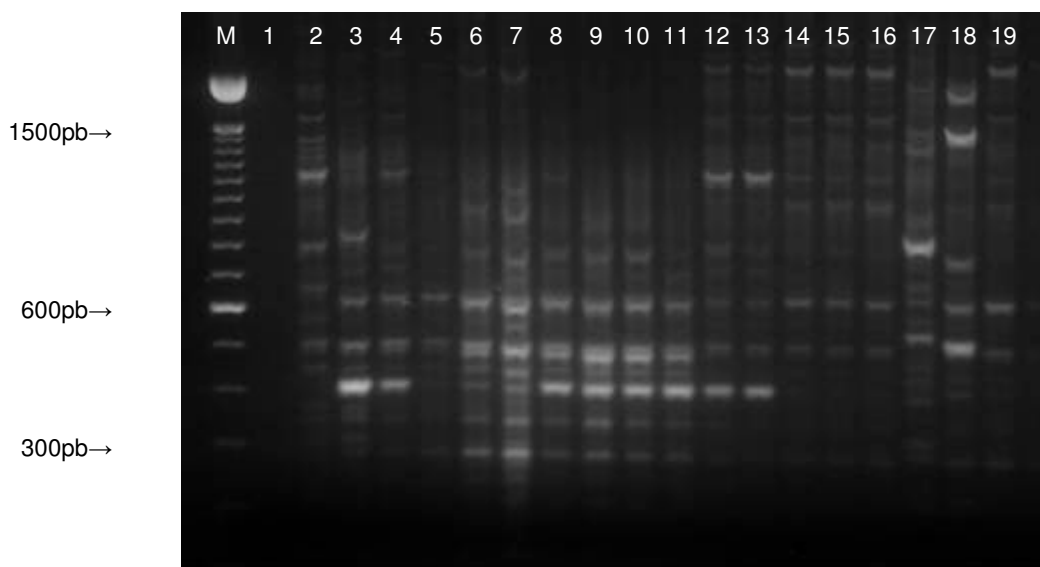


FIGURA 5. Produtos de amplificação da ERIC-PCR dos isolados de *Ralstonia solanacearum*. M- marcador molecular de 100 pb (Invitrogen); 1- Controle negativo (água milli-Q); 2- 3 (PR); 3- 65 (SC); 4- 75 (SC); 5- 14 (PR); 6- 79 (SC); 7- 80 (SC); 8- 118 (PE); 9- 119 (PE); 10- 120 (PB); 11- 114 (RS); 12- 96 (SC); 13- 97 (SC); 14- 113 (RS); 15- 85 (SC); 16- 15 (PR); 17- 82 (SC); 18- 115 (RS); 19- 7 (PR). Cachoeirinha, RS, 2010.

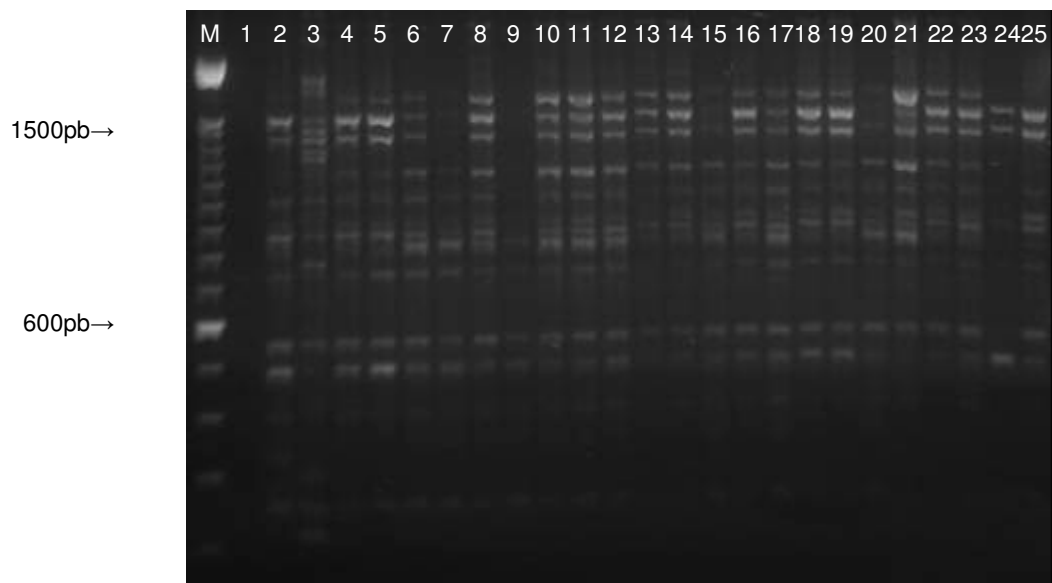


FIGURA 6. Produtos de amplificação da REP-PCR dos isolados de *Ralstonia solanacearum*. M- marcador molecular de 100 pb (Invitrogen); 1- Controle negativo (água milli-Q); 2- 34 (SC); 3- 35 (SC); 4- 36 (SC); 5- 37 (SC); 6- 38 (SC); 7- 39 (SC); 8- 40 (SC); 9- 41 (SC); 10- 42 (SC); 11- 43 (SC); 12- 44 (SC); 13- 45 (SC); 14- 46 (SC); 15- 98 (RS); 16- 99 (RS); 17- 100 (RS); 18- 101 (RS); 19- 102 (RS); 20- 103 (RS); 21- 47 (SC); 22- 62 (SC); 23- 63 (SC); 24- 64 (SC); 25- 7 (PR). Cachoeirinha, RS, 2010.

Apesar dos relatos de dificuldade de amplificação e visualização dos produtos, ora com BOX e ERIC-PCR (Martins, 2000; Costa *et al.*, 2007), ora com REP e ERIC-PCR (Costa *et al.*, 2007) isto não ocorreu neste estudo. Uma planilha binária foi construída utilizando os três elementos para a construção do dendograma, sendo: seis fragmentos de BOX (1100, 1000, 950, 900, 800 e 750 pb), 10 de REP (1500, 1350, 1250, 1150, 1050, 970, 950, 720, 580 e 500 pb) e 10 de ERIC (1100, 1050, 1000, 900, 600, 450, 400, 350, 330 e 300 pb), totalizando 26 fragmentos informativos (Apêndice 4).

Na construção individual dos dendogramas através do programa NTSYS, para as seqüências BOX, ERIC e REP, padrões similares de variabilidade foram formados entre estas seqüências. Sendo assim, os

dados foram analisados de forma conjunta e construído um único dendograma. Agrupamento deste tipo já havia sido relatado anteriormente (Norman *et al.*, 2009). Para facilitar a análise dos dados e a interpretação dos resultados, isolados com similaridade maior ou igual a 97% foram considerados linhagens clonais. As 74 linhagens clonais geradas foram representadas por um único isolados no dendograma conjunto – fragmentos informativos de BOX, ERIC e REP (Apêndice 5) – com o número de isolados representados entre parênteses, assim como as estirpes padrão e o isolado Tomate (Figura 7).

Através da análise dos fragmentos obtidos por rep-PCR, os isolados foram separados em seis grupos: A, B, C, D, E e F, a partir de 61% de similaridade (Figura 7). Dois grandes grupos foram formados, A e B, sendo que o grupo A foi representado por 47 linhagens clonais e o grupo B representado por 20. O grupo E, composto pelos isolados 41, 117, 120 e IB350, foi o que apresentou maior variação genotípica em relação aos demais, com 52% de similaridade. Os dois isolados de tomate (Tomate e IB66) não se agruparam, ficando nos grupamentos C e F, respectivamente, e isto pode ser explicado pela diferença de biovar e filotipo. O isolado 120, oriundo da Paraíba, não ficou agrupado com os demais isolados do Nordeste, ficando no grupo E juntamente com um isolado de SC, um do RS e da estirpe IB350. O dendograma formado mostrou que não houve correlação entre os isolados de tabaco estudados quanto à origem geográfica, tipo de amostra ou a época de coleta com os agrupamentos formados.



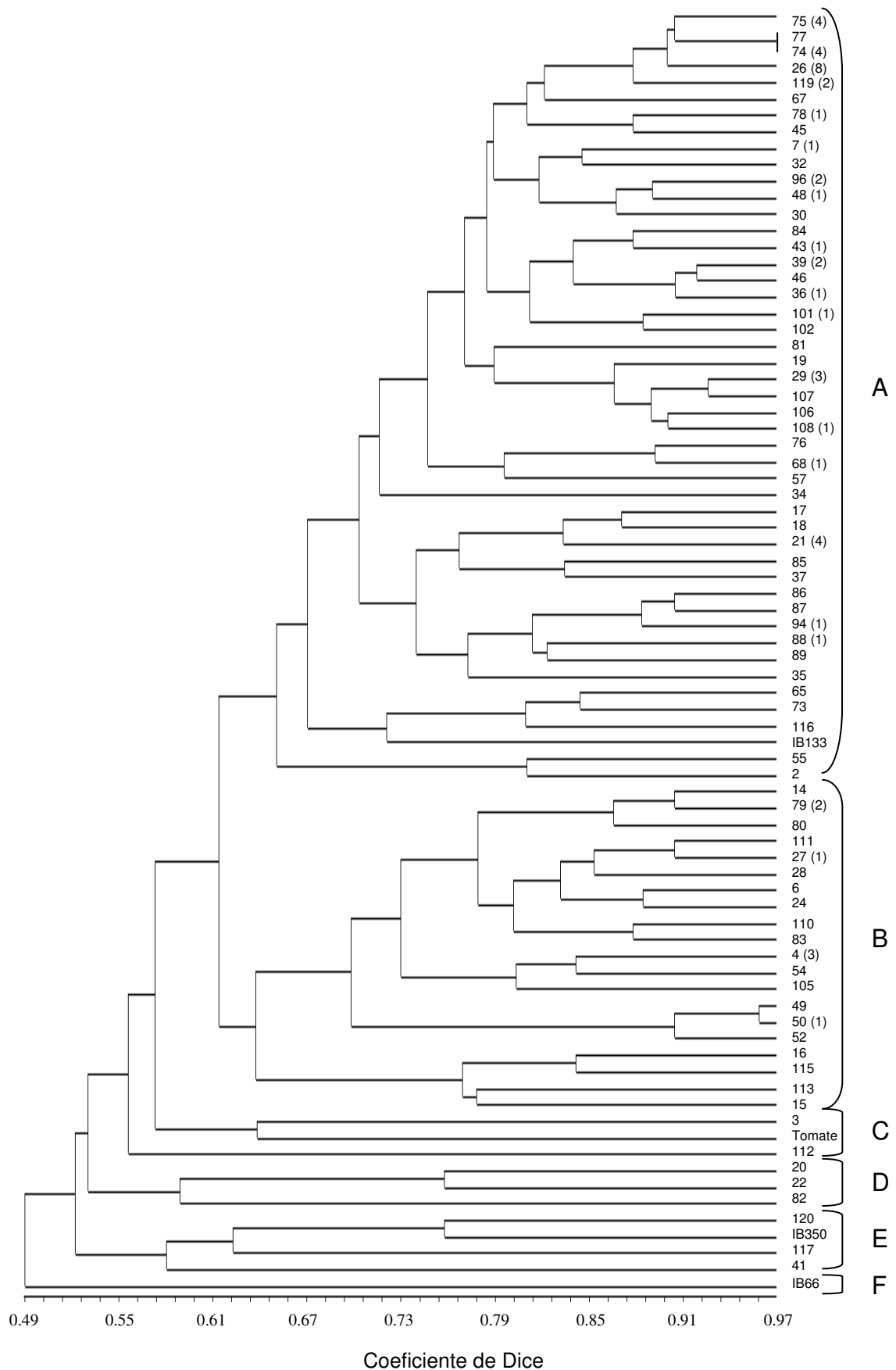


FIGURA 7. Dendrograma obtido a partir da análise de rep-PCR dos isolados de *Ralstonia solanacearum* utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e agrupamento pelo método de UPGMA. Números entre parênteses indicam o número de isolados adicionais que constituem a linhagem clonal junto ao isolado representado Cachoeirinha, RS, 2010.

Resultado semelhante foi relatado por Costa *et al.* (2007), cujo isolados de diversos hospedeiros na Amazônia foram estudados. A análise de BOX-PCR foi empregada, revelando alto grau de polimorfismo entre os isolados, sendo divididos em cinco agrupamentos, porém sem correlação com o hospedeiro, biovar, ecossistema ou local de coleta. Os isolados caracterizados como biovar 1 estavam presentes em quatro dos cinco grupos formados, e os autores atribuem isto ao fato da biovar 1 possuir maior gama de hospedeiros e ser mais competitiva no solo que outras biovars (Costa *et al.*, 2007).

A estirpe IB66, previamente caracterizada como filotipo I, ficou agrupada isoladamente no grupo F (Figura 7). Através da técnica de rep-PCR foi possível separar os isolados de tabaco do filotipo II do isolado IB66, filotipo I.

A rep-PCR tem sido empregada com sucesso em estudos de variabilidade genética de *R. solanacearum*, distinguindo isolados de diferentes origens geográficas, biovars e hospedeiras (Kumar *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2007; Horita & Tsuchiya, 2000; Horita *et al.*, 2005). Através das sequências BOX e ERIC foi possível distinguir as biovars 1 e 2 oriundas de batata no RS (Silveira *et al.*, 2005). Isolados oriundos do Japão, Indonésia, Filipinas e Peru foram separados por origem através da rep-PCR (Horita *et al.*, 2005). Isolados brasileiros também foram distinguidos de isolados da Indonésia, Costa Rica e Quênia através da REP-PCR (Martins, 2000).

O conhecimento da variabilidade populacional de *R. solanacearum* é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da

doença, particularmente pelo melhoramento genético do hospedeiro. Os resultados mostraram variabilidade entre os isolados de *R. solanacearum* oriundos de tabaco, porém sem associação à origem geográfica, tipo de amostra, época de coleta ou cultivar. Desta forma, outros métodos poderão ser empregados na busca da melhor estratégia para o desenvolvimento de novas cultivares, tais como a caracterização baseada nos genes relacionados à virulência e a patogenicidade.

#### 4.5 Titulação da virulência

Houve diferença numérica entre as  $CE_{50}$  dos isolados de *R. solanacearum* do PR, SC e RS. O isolado de SC foi o mais virulento, com menor  $CE_{50}$ , induzindo maior número de plantas murchas (Tabela 7).

TABELA 7. Logaritmo do número de células capaz de causar doença em 50% das mudas ( $CE_{50}$ ) em cada cultivar. Cachoeirinha, RS, 2010.

Isolado	Grupo rep	Origem	Burley		Virgínia	
			Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente
15	B	PR	8,7 <sup>a</sup>	8,3	9,1	8,4
70	C	SC	7,6	7,8	7,7	7,3
112	A	RS	8,4	8,2	9,4	8,8

<sup>a</sup> Número de mudas com murcha e equações utilizadas para cálculo do logaritmo descritos nos Apêndices 6 e 7.

O método da titulação da virulência mostrou-se uma ferramenta útil na comparação de isolados de *R. solanacearum*, pois a estimativa da  $CE_{50}$  produz um número que facilita a comparação entre isolados bacterianos ou entre cultivares. O agrupamento de isolados de *R. solanacearum* com diferentes níveis de virulência foi observado em um estudo conduzido na

região amazônica com 70 isolados oriundos de tomate e outros hospedeiros, através do método da distância euclidiana (Costa *et al.*, 2007). Apesar disso, na análise de BOX-PCR, estes isolados não se agruparam. No presente estudo, a caracterização tanto em biovar quanto em filotipo foram iguais para todos os isolados de tabaco, e apesar de existir variabilidade entre os isolados, também não foi observada uma correlação entre a origem geográfica, de solo ou planta, época de coleta ou cultivar.

Na Flórida, isolados *R. solanacearum* oriundos de ornamentais e vegetais foram submetidos ao teste de patogenicidade, onde ficou evidenciado que todos os isolados eram altamente virulentos ao tomate e também foram capazes de causar murcha em tabaco. Neste estudo também foi utilizada a rep-PCR, que apesar de ter separado os isolados por biovars e hospedeiros, não teve correlação com a virulência dos mesmos (Norman *et al.*, 2009).

A titulação da virulência é um método que pode ser mais explorado. Um experimento com um número de repetições adequado poderá ser realizado, permitindo então a conclusão baseada na análise estatística dos dados. Desta forma, diferenças na virulência do patógeno poderão ter maior significado para os programas de melhoramento genético de plantas.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, nas condições em que foi realizada esta pesquisa, concluiu-se:

1. A classificação em biovar e filotipo mostra que a população de *Ralstonia solanacearum* em tabaco no Brasil é homogênea;
2. Apesar da população de *R. solanacearum* em tabaco ser da mesma biovar e filotipo, a variabilidade genética pode ser detectada por rep-PCR;
3. A variabilidade genética da população de *R. solanacearum* não está associada à origem geográfica, tipo de amostra, época de coleta ou cultivar de tabaco.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFUBRA. **Associação dos Fumicultores do Brasil**. Disponível em: <http://www.afubra.com.br>. Acesso em: 25/6/2010.

ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; SARTÓRIO, R.C.; SILVA, R.R.; LAU, D.; VANETTI, C.A. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, p.357-366, 2006.

ALVAREZ, A.M. Diversity and diagnosis of *Ralstonia solanacearum*. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p.437-447.

ASSIS, S.M.P.; OLIVEIRA, I.S.; COVELLO, V.N.; REHN, K.G.; MARIANO, R.L.R. Bacterial Wilt of *Heliconia* in Pernambuco, Brazil: First report and detection by PCR in soil and rhizomes. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p.423-430.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº. 64 de 16 de fevereiro de 1993. **Norma de Identidade, Qualidade, Embalagem, Marcação e Apresentação do Tabaco Oriental**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12912>. Acesso: 17/6/2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº. 10 de 13 de abril de 2007. **Regulamento Técnico de Identidade, Qualidade, Embalagem, Marcação e Apresentação do Tabaco em Folha Curado**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17730>. Acesso em 17/6/2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº. 41 de 01 de julho de 2008. **Anexo II - Lista de Pragas Quarentenárias Presentes (A2)**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/visualizarAnexo?id=14560>. Acesso em 20/6/2010.

BRINGEL, J.M.M. **Caracterização bioquímica, patogênica e molecular de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 de batata e beringela**. 102 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Programa de Pós-graduação em

Agronomia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

BUDDENHAGEM, I.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.52, 726, 1962.

BURR, M.D.; JOSEPHSON, K.L.; PEPPER, I.L. An evaluation of ERIC-PCR an AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. **Letters of Applied Microbiology**, Cardiff, v.27, p.24-30, 1998.

CARVALHO, J.B. **Desenvolvimento e validação de qPQR para detecção de pectobactérias e *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata.** 168 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CHAMPOISEAU, P.G. ***Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2.** Disponível em: [http://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/Trainingmodules/RalstoniaR3b2 Organism Module.html](http://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/Trainingmodules/RalstoniaR3b2%20Organism%20Module.html). Acesso em: 28/5/2010.

COELHO-NETTO, R.A.; PEREIRA, B.G.; NODA, H.; BOHER, B. Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme, no Estado do Amazonas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.362-366, 2003.

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

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

COOK, D.; SIQUEIRA, L. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford: CAB International, 1994. p.77-93.

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, p.285-294, 2007.

COUTINHO, T.A. Introduction and prospectus of the survival of *Ralstonia solanacearum*. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex.** St. Paul: APS Press, 2005. p.29-38.

DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti*

isolates and other soil bacterial. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2180-2187, 1992.

DENNY, T.P. Plant Pathogenic *Ralstonia* species. In: GNANAMANICKAM, S.S. **Plant-Associated Bacteria**. Dordrecht, Springer, 2006. p.573-644.

DENNY, T.P.; HAYWARD, A.C. *Ralstonia solanacearum*. In: LABORATORY guide for the identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. St. Paul: APS Press, 2001. p.151-174.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, London, v.26, p.297-302, 1945.

DUARTE, V.; DALBOSCO, M.; TASSA, S.O.M. Identificação de isolados de *Ralstonia solanacearum* provenientes de plantas de fumo da Bahia e do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 35., 2003, Uberlândia. **Anais...** Brasília: SBF, 2003. p.239-239.

ELPHINSTONE, J.G. Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates. **Potato Research**, Veldhoven, v.39, p.403-410, 1996.

ELPHINSTONE, J.G. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. **Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p.9-27.

ELPHINSTONE, J.G.; STANFORD, H.M.; STEAD, D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers, *Sollanum dulcamar* and associated irrigation water. In: PRIOR, P.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J.G. **Bacterial wilt disease- Molecular and ecological aspects**. Heidelberg: [s.n.], 1998. p.133-139.

EPPO. **Home page**. Disponível em: <http://www.eppo.org/>. Acesso em: 2/7/2010.

ERCOLANI, G.L. Infectivity titration with bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v.22, p.35-52, 1984.

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**. St. Paul: APS Press, 2005. p.449-461.

FELIX, K.C.S. **Sobrevivência de *Ralstonia solanacearum* em tecidos infectados de pimentão e diferentes tipos de solo de Pernambuco, Brasil**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333 p.



FORTNUM, B.A. Disease Management. In: GOODEN, D.T. **South Carolina tobacco growers guide**. Clemson: Clemson University. Co-operative Extension Service, 2001. p.38-59.

FORTNUM, B.A.; KLUEPFEL, D. Mechanization has contributed to the spread of bacterial wilt on flue-cured tobacco in Southeastern USA. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. **Bacterial Wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p.51-59.

FRENCH, E.R.; ALEY, P.; TORRES, E.; NYDEGGER, U. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* in Peru and Brazil. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SIMPOSIUM, Kaosshiang, 1993. **Proceedings**. Kaosshiang: ACIAR, 1993. p.79-81.

FREY, P.; SMITH, J.J.; ALBAR, L.; PRIOR, P.; SADDLER, G.S.; TRIGALET-DEMERY, D.; TRIGALET, A. Bacteriocin typing of *Burkholderia solanacearum* race 1 of the French West Indies and correlation with genomic variation of the pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.473-479, 1996.

GENIN, S.; BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.3, n.3, p.111-118, 2002.

GILLINGS, M.R.; FAHY, P. Genomic Fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p.95-112.

GLICK, R.B. The enhancement of plant growth by free-living bacterial. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p.109-117, 1995.

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

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

HAYWARD, A.C.; SEQUEIRA, L.; FRENCH, E.R.; EL-NASHAR, H.M.; NYDEGGER, U. Tropical variant of biovar 2 of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, 608, 1992.

HORITA, M.; TSUCHIYA, K. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.91, p.399-407, 2001.

HORITA, M.; TSUCHIYA, K. Comparative analysis of Japanese and foreign strains of *Ralstonia solanacearum* based on 16S rRNA gene sequences. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.66, p.132-137, 2000.

HORITA, M.; TSUCHIYA, K.; OOSHIRO, A. Characteristics of *Ralstonia solanacearum* biovar N2 strains in Asia. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.153, p.209-213, 2005.

IVEY, M.L.L.; GARDNER, B.B.M.; OPINA, N.; MILLER, S.A. Diversity and geographic distribution of *Ralstonia solanacearum* from eggplant in Philippines. **Phytopathology**, St. Paul, v.97, p.1467-1475, 2007.

JANSE, J.D.; BELD, H.E.; ELPHINSTONE, J.G.; SIMPKINS, S.; TJOU-TAM-SIN, N.A.A.; VAERENBERGH, J. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v.86, p.147-155, 2004.

JAUNET, T.X.; WANG, J.F. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, p.320-327, 1999.

JEONG, Y.; KIM, J.; KANG, Y.; LEE, S.; HWANG, I. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. **Plant Disease**, St. Paul, v.91, p.1277-1287, 2007.

JI, P.; ALLEN, C.; SANCHEZ-PEREZ, A.; YAO, J.; ELPHINSTONE, J.G.; JONE, J.B.; MOMOL, M.T. New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v.91, p.195-203, 2007.

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

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.

KUSUMOTO, S.; TAKIKAWA, Y. Bacterial wilt of bellflower caused by *Ralstonia solanacearum* in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.71, p.158-159, 2005.

LOPES, C.A. **Murcha bacteriana ou murchadeira** - uma inimiga do tomateiro em climas quentes. Disponível em: [http://bbeletronica.cnph.embrapa.br/2009/cot/cot\\_67.pdf](http://bbeletronica.cnph.embrapa.br/2009/cot/cot_67.pdf). Acesso em: 24/5/2010.

LOPES, C.A.; NAZARENO, N.R.X.; FURIATTI, R.S. Prevalência, mas não exclusividade, da raça 3 de *Pseudomonas solanacearum* em batata no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p.312-312, 1993.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças** - diagnose e controle. Gama, DF: Embrapa-CNPB, 1997. 70 p.

LOPES, C.A.; REFSCHNEIDER, F.J.B. Manejo integrado das doenças da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, p.56-71, 1999.

LOUWS, F.J.; BELL, J.; MEDINA-MORA, C.M.; SMART, C.D.; OPGENORTH, D.; ISHIMARU, C.A.; HAUSBECK, M.K.; DE BRUIJN, F.J.; FULBRIGHT, D.W. rep-PCR-mediated genomic fingerprint: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, p.862-868, 1998.

LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; DE BRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.2286-2295, 1994.

LUCAS, G.B. Granville Wilt. In: DISEASES of Tobacco. North Carolina State College: The Scarecrow Press, 1975. p.365-382.

MACIEL, J.LN.; DUARTE, V.; SILVEIRA, J.R.P. Densidade populacional de *Ralstonia solanacearum* em cultivares de batata a campo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.19-24, 2004.

MACIEL, J.LN.; SILVEIRA, J.R.P.; VAN DER SAND, S.T.; DUARTE, V. Freqüência de biovars de *Ralstonia solanacearum* em diferentes cultivares e épocas de cultivo de batata no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.741-744, 2001.

MAHUKA, G.S.; JARA, C.; HENRIQUEZ, M.A.; CASTELLANOS, G.; CUASQUER, J. Genotypic characterization of the common bean bacterial blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by rep-PCR and PCR-RFLP of the ribosomal genes. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.154, p.35-44, 2006.

MARTINS, O.M. **Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.** 2000. 131 f. Thesis (Doctoral) - Institute of Plant Pathology and Plant Protection of the Georg-August University, Göttingen, Germany, 2000.

MEDEIROS, C.V. **Seleção artificial para resistência à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em fumo (*Nicotiana tabacum* L.).** 2005. 59 f. Dissertação(Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

MILA, M. Managing Diseases. In: FLUE-CURED Tobacco Guide 2010. North Carolina : N.C. State University, 2010. p.143-176.

NATURAL, M.P.; LANDO, L.A.D.; JOVER, E.M. Variability of the potato bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith)Yabuuchi et al., in the Philippines. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. **Bacterial Wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex.** St. Paul: APS Press, 2005. p.493-499.

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**, St. Paul, v.99, p.1070-1077, 2009.

NOURI, S.; BAHAR, M.; FEGAN, M. Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2T strains outside South America. **Plant Pathology**, Oxford, v.58, p.243-249, 2009.

OEPP/EPPO. Diagnostic protocols for regulated pests *Ralstonia solanacearum*. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, Paris, 2004. p.173-178.

OLSSON, K. Experience of brown rot caused by *Pseudomonas solanacearum* in Sweden. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, Paris, v.6, p.199-207, 1976.

POUSSIER, S.; PRIOR, P.; LUISETTI, J.; HAYWARD, C.; FEGAN, M. Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Systematic and Applied Microbiology**, Maryland Heights, v.23, n.4, p.479-486, 2000.

POUSSIER, S.; VANDEWALLE, P.; LUISETTI, J. Genetic diversity of african and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.5, p.2184-2194, 1999.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; TAKATSU, A. *Pseudomonas solanacearum* no Brasil: Aspectos macroepidemiológicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, n.2, p.213-1985.

SANCHEZ-PEREZ, A.; MEJIA, L.; FEGAN, M.; ALLEN, C. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. **Plant Pathology**, Oxford, v.57, n.320, p.331-2008.

SATOU, M.; KUBOTA, M.; NISHI, K. Measurement of horizontal and vertical movement of *Ralstonia solanacearum* in soil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.154, p.592-597, 2006.

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. **Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: American Phytopathological Society, 2001. 164 p.

SEAL, S.E.; JACKSON, L.A.; YOUNG, J.C.P.W.; DANIELS, M.J. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. **Journal of General Microbiology**, New York, v.139, p.1587-1594, 1993.

SEAL, S.E.; TAGHAVI, M.; FEGAN, N.; HAYWARD, A.C.; FEGAN, M. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. **Plant Pathology**, Oxford, v. 48, p.115-120, 1999.

SHINOHARA, R.; KANDA, A.; OHNISHI, K.; KIBA, A.; HIKICHI, Y. Contribution of folate biosynthesis to *Ralstonia solanacearum* proliferation in intercellular spaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.1, p.417-422, 2005.

SILVEIRA, J.R.P.; DUARTE, V.; MORAES, M.G. Ocorrência das biovars 1 E 2 de *Ralstonia solanacearum* em lavouras de batata no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.5, p.450-453, 2002.

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

SINDITABACO. **Área de produção de tabaco**. Disponível em: <http://www.sinditabaco.com.br/?link=setor.dados>. Acesso em: 1/7/2010.

SMITH, J.J.; OFFORD, L.C.; HOLDERNESS, M.; SADDLER, G.S. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.4263-4268, 1995.

SOARES, E.L.C.; VIGNOLI-SILVA, M.; VENDRUSCOLO, G.S.; THODE, V.A.; SILVA, J.G.; MENTZ, L.A. A família Solanaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.6, p.177-188, 2008.

STEAD, D.E. Bacterial diseases of potatoes: future problems? In: CROP PROTECTION IN NORTHERN BRITAIN, Dundee, 1996. **Proceedings...** Dundee, 1996. p.303-311.

SWANSON, J.K.; MONTES, L.; MEJIA, L.; ALLEN, C. Detection of latent infections of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 in geranium. **Plant Disease**, St. Paul, v.91, n.7, p.828-833, 2007.

TAGHAVI, M.; HAYWARD, A.C.; SLY, L.; FEGAN, M. Analisis 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**, Palo Alto, v.46, p.10-15, 1996.

TIMMS-WILSON, T.M.; BRYANT, K.; BAILEY, M.J. Strain characterization and 16S-23S probe development for differentiating geographically dispersed isolates of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.3, p.787-795, 2001.

TOMLINSON, D.L.; ELPHINSTONE, J.G.; SOLIMAN, M.Y.; HANAFY, M.S.; SHOALA, T.M.; EL-FATAH, H.A.; AGAG, S.H.; KAMAL, M.; EL-ALIEM, M.M.A.; FAWZI, F.G.; STEAD, D.E.; JANSE, J.D. Recovery of *Ralstonia solanacearum* from canal water in traditional potato-growing areas of Egypt but not from designated Pest-Free Areas (PFAs). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.125, p.589-601, 2009.

TSUCHIYA, K. Molecular biological studies of *Ralstonia solanacearum* and related plant pathogenic bacteria. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.70, p.385-387, 2004.

VAN DER WOLF, J.M.; BONANTS, P.J.; SMITH, J.J.; HAGGENAAR, M.; NIJHUIS, E.; VAN BECKHOVEN, J.R.C.M.; SADDLER, G.S.; TRIGALET, A.; FEUILLADE, R. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. **Paris:INRA**, Guadalupe, v.2, p.44-49, 1998.

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, p.25-40, 1994.

VIANA, E.C.G.M. **Estudos da sobrevivência de um isolado variante de *Pseudomonas solanacearum* em raízes de plantas cultivadas**. 1995. 61 f. Dissertação(Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 1995.

VILLA, J.E.; TSUCHIYA, K.; HORITA, M.; NATURAL, M.; OPINA, N.; HYKUMACHI, M. Analysis of Asian strains of *Ralstonia solanacearum* species complex based on 16S rDNA, endoglucanase and *hrpB* gene sequences. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.71, p.39-46, 2005.

XU, J.; PAN, Z.C.; PRIOR, P.; 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 of Plant Pathology**, Dordrecht, v.125, p.641-653, 2009.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.39, n.11, p.897-904, 1995.

YOSSEN, V.E.; MACIEL, J.L.N.; LOCH, L.C.; DUARTE, V. Titulação da virulência de estirpes de *Ralstonia solanacearum* resistentes a antibióticos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.495-497, 1998.

YU, Q.; ALVAREZ, A.M.; MOORE, P.H.; ZEE, F.; KIM, M.S.; DE SILVA, A.; HEPPELRY, P.R.; MING, R. Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum*

isolated from ginger in Hawaii. **Phytopathology**, St. Paul, v.93, p.1125-1130, 2003.

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, p.45-46, 2009.

## APÊNDICE

APÊNDICE 1. Isolados utilizados no estudo. Cachoeirinha, RS, Brasil, 2010.

Isolado	Ano	Estado	Origem da amostra	Variedade <sup>a</sup>	Grupo rep-PCR
1	2002	PR	solo	n/a	B
2	2003	PR	planta	VA	A
3	2003	PR	planta	n/i	C
4	2003	PR	planta	n/i	B
5	2003	PR	planta	n/i	B
6	2003	PR	planta	n/i	B
7	2004	PR	planta	n/i	A
8	2005	PR	solo	n/a	B
9	2005	PR	solo	n/a	B
10	2005	PR	planta	BY	A
11	2005	PR	planta	n/i	A
12	2005	PR	planta	n/i	A
13	2005	PR	planta	n/i	A
14	2005	PR	planta	BY	B
15	2008	PR	solo	n/a	B
16	2009	PR	planta	BY	B
17	2009	PR	planta	n/i	A
18	2009	PR	planta	n/i	A
19	2009	PR	solo	n/a	A
20	2009	PR	planta	n/i	D
21	2009	PR	solo	n/a	A
22	2009	PR	planta	n/i	D
23	2009	PR	solo	n/a	A
24	1988	SC	planta	n/i	B
25	1989	SC	planta	n/i	A
26	2002	SC	planta	VA	A
27	2002	SC	planta	BY	B
28	2002	SC	solo	n/a	B
29	2002	SC	planta	VA	A
30	2002	SC	planta	VA	A
31	2002	SC	planta	VA	A
32	2002	SC	planta	VA	A
33	2002	SC	planta	VA	A
34	2002	SC	planta	VA	A
35	2002	SC	planta	VA	A
36	2002	SC	planta	VA	A
37	2002	SC	planta	VA	A



continuação APÊNDICE 1. Isolados utilizados no estudo. Cachoeirinha, RS, Brasil, 2010.

<b>Isolado</b>	<b>Ano</b>	<b>Estado</b>	<b>Origem da amostra</b>	<b>Variedade<sup>a</sup></b>	<b>Grupo rep-PCR</b>
38	2002	SC	planta	VA	A
39	2002	SC	planta	VA	A
40	2002	SC	planta	VA	A
41	2002	SC	planta	VA	E
42	2002	SC	planta	VA	A
43	2002	SC	planta	VA	A
44	2002	SC	planta	VA	A
45	2002	SC	planta	VA	A
46	2002	SC	planta	VA	A
47	2003	SC	planta	n/i	A
48	2003	SC	planta	n/i	A
49	2003	SC	solo	n/a	B
50	2003	SC	solo	n/a	B
51	2003	SC	solo	n/a	B
52	2003	SC	solo	n/a	B
53	2003	SC	planta	VA	A
54	2003	SC	planta	VA	B
55	2003	SC	planta	VA	A
56	2003	SC	planta	VA	A
57	2003	SC	planta	n/i	B
58	2004	SC	planta	BY	B
59	2004	SC	planta	VA	A
60	2004	SC	planta	VA	A
61	2004	SC	planta	VA	A
62	2004	SC	planta	VA	A
63	2004	SC	planta	VA	A
64	2004	SC	planta	VA	A
65	2004	SC	planta	VA	A
66	2005	SC	planta	n/i	A
67	2005	SC	planta	n/i	A
68	2005	SC	planta	n/i	A
69	2005	SC	planta	n/i	A
70	2005	SC	planta	n/i	A
71	2005	SC	planta	n/i	A
72	2005	SC	planta	n/i	A
73	2005	SC	planta	n/i	A
74	2005	SC	planta	n/i	A
75	2005	SC	planta	n/i	A
76	2005	SC	planta	n/i	A
77	2005	SC	planta	n/i	A
78	2005	SC	solo	n/a	A
79	2006	SC	solo	n/a	B
80	2006	SC	solo	n/a	B
81	2006	SC	solo	n/a	A
82	2006	SC	solo	n/a	D
83	2008	SC	solo	n/a	B
84	2009	SC	planta	VA	A
85	2009	SC	planta	VA	A
86	2009	SC	planta	VA	A
87	2010	SC	solo	n/a	A

continuação APÊNDICE 1. Isolados utilizados no estudo. Cachoeirinha, RS, Brasil, 2010.

<b>Isolado</b>	<b>Ano</b>	<b>Estado</b>	<b>Origem da amostra</b>	<b>Variedade<sup>a</sup></b>	<b>Grupo rep-PCR</b>
88	2010	SC	planta	VA	A
89	2010	SC	solo	n/a	A
90	2010	SC	planta	VA	A
91	2010	SC	planta	VA	A
92	2010	SC	planta	VA	A
93	2010	SC	planta	n/i	A
94	2010	SC	planta	n/i	A
95	2010	SC	planta	VA	A
96	2010	SC	planta	VA	A
97	2010	SC	planta	VA	A
98	2003	RS	solo	n/a	A
99	2003	RS	planta	VA	A
100	2003	RS	planta	VA	A
101	2003	RS	planta	VA	A
102	2003	RS	solo	n/a	A
103	2003	RS	solo	n/a	A
104	2003	RS	planta	VA	A
105	2003	RS	planta	VA	B
106	2004	RS	planta	VA	A
107	2004	RS	planta	VA	A
108	2004	RS	planta	VA	A
109	2004	RS	solo	n/a	A
110	2008	RS	planta	VA	B
111	2008	RS	solo	n/a	B
112	2009	RS	planta	VA	C
113	2009	RS	solo	n/a	B
114	2009	RS	planta	n/i	A
115	2010	RS	solo	n/a	B
116	2010	RS	solo	n/a	A
117	2010	RS	solo	n/a	E
118	2009	PE	planta	OR	A
119	2009	PE	planta	OR	A
120	2009	PB	planta	OR	E
Tomate	2009	RS	planta	n/i	C
IB66		IB	Tomate	n/a	F
IB133		IB	Batata	n/a	A
IB350		IB	Batata	n/a	E

<sup>a</sup>: BY – Burley; CO – Comum; OR – Oriental; VA – Virgínia; n/a – não aplicável; n/i – não informado.

APÊNDICE 2. Estirpes padrão adquiridas da Coleção de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo. Cachoeirinha, RS, Brasil, 2010.

Estirpe	Código	Hospedeiro	Ano	Biovar
66	IB66	Tomate	1975	3
133	IB133	Batata	1978	2
350	IB350	Batata	1981	1

APÊNDICE 3. Conversão de porcentagem para probits (Finney, 1971). Cachoeirinha, RS, 2010.

P <sup>a</sup>	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,00	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
0,1	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
0,2	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
0,3	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
0,4	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
0,5	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
0,6	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
0,7	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
0,8	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
0,9	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,71	6,78	6,85	6,93

<sup>a</sup> Porcentagem

APÊNDICE 4. Planilha binária originária da rep-PCR utilizada na construção do dendograma. Cachoeirinha, RS, 2010.

Elemento	Fragmento (pb)	Isolados																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
BOX	1100	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
	1000	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	
	950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
	900	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
	800	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ERIC	1100	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
	1050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	1000	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
	900	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	600	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
	400	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	350	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	330	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
300	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
REP	1500	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	
	1350	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1250	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	1150	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
	1050	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
	970	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
	950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	720	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	580	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	500	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

continuação APÊNDICE 4. Planilha binária originária da rep-PCR utilizada na construção do dendograma. Cachoeirinha, RS, 2010.

Elemento	Fragmento (pb)	Isolados																	
		19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
BOX	1100	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
	1000	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
	950	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	900	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	800	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	750	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ERIC	1100	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
	1050	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
	900	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
	450	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	400	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	350	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0
	330	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
	300	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0
REP	1500	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	1350	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1250	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	1150	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
	1050	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
	970	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
	950	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	720	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	580	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

continuação APÊNDICE 4. Planilha binária originária da rep-PCR utilizada na construção do dendograma. Cachoeirinha, RS, 2010.

Elemento	Fragmento (pb)	Isolados																	
		37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
BOX	1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
	1000	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
	900	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	800	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	750	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ERIC	1100	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	1050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
	900	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
	400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
	350	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	330	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1
	300	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
REP	1500	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
	1350	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
	1150	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
	1050	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	970	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
	950	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	720	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	580	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	500	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1

continuação APÊNDICE 4. Planilha binária originária da rep-PCR utilizada na construção do dendograma. Cachoeirinha, RS, 2010.

Elemento	Fragmento (pb)	Isolados																	
		55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
BOX	1100	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
	1000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
	950	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
	900	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1
	800	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ERIC	1100	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
	1050	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	330	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
REP	1500	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1250	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1150	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
	970	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1
	950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	720	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	580	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	500	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1

continuação APÊNDICE 4. Planilha binária originária da rep-PCR utilizada na construção do dendograma. Cachoeirinha, RS, 2010.

Elemento	Fragmento (pb)	Isolados																	
		73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
BOX	1100	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
	1000	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
	950	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
	900	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	800	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1
ERIC	1100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1050	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	900	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
	600	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	450	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
	400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	350	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
	330	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	300	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
REP	1500	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
	1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	1250	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	1150	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1050	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	970	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0
	950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	720	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1
	580	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1



continuação APÊNDICE 4. Planilha binária originária da rep-PCR utilizada na construção do dendograma. Cachoeirinha, RS, 2010.

Elemento	Fragmento (pb)	Isolados																		
		91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	
BOX	1100	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	
	1000	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	
	900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1
	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ERIC	1100	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	
	1050	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
	1000	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
	900	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
	450	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
	400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
	350	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	
	330	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	
	300	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
REP	1500	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
	1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
	1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
	970	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
	950	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	720	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	580	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	500	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

continuação APÊNDICE 4. Planilha binária originária da rep-PCR utilizada na construção do dendograma. Cachoeirinha, RS, 2010.

Elemento	Fragmento (pb)	Isolados															
		109	110	112	111	113	114	115	116	117	118	119	120	IB66	IB133	IB350	Tomate
BOX	1100	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1000	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
	950	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
	900	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
	800	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
	750	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
ERIC	1100	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	1050	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	900	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	450	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	400	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
	350	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
	330	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
	300	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0
REP	1500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
	1250	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	1150	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	1050	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
	970	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	950	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	720	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
	580	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1
	500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0

APÊNDICE 5. Relação de isolados representados e seus representantes utilizados na construção do dendograma. Cachoeirinha, RS, 2010.

<b>Isolado representado no dendograma</b>	<b>Isolado similar</b>	<b>Similaridade (%)</b>	<b>Grupo <i>rep</i></b>
4	5, 58, 59	97	B
7	64	97	A
21	23, 90, 91, 92	97	A
26	10, 11, 40, 44, 56, 99, 103, 118	97	A
27	1	97	B
29	25, 31, 33	97	A
36	98	97	A
39	42, 38	97	A
43	100	97	A
48	53	100	A
50	51	97	B
68	71	97	A
74	12, 13, 70, 72	97	A
75	60, 61, 62, 63	97	A
78	69	97	A
79	8, 9	97	B
88	93	97	A
94	95	97	A
96	97, 47	97	A
101	104	100	A
108	109	100	A
119	66, 114	97	A

APÊNDICE 6. Número de plantas com murcha aos 15 dias após a inoculação. Cachoeirinha, RS, 2010.

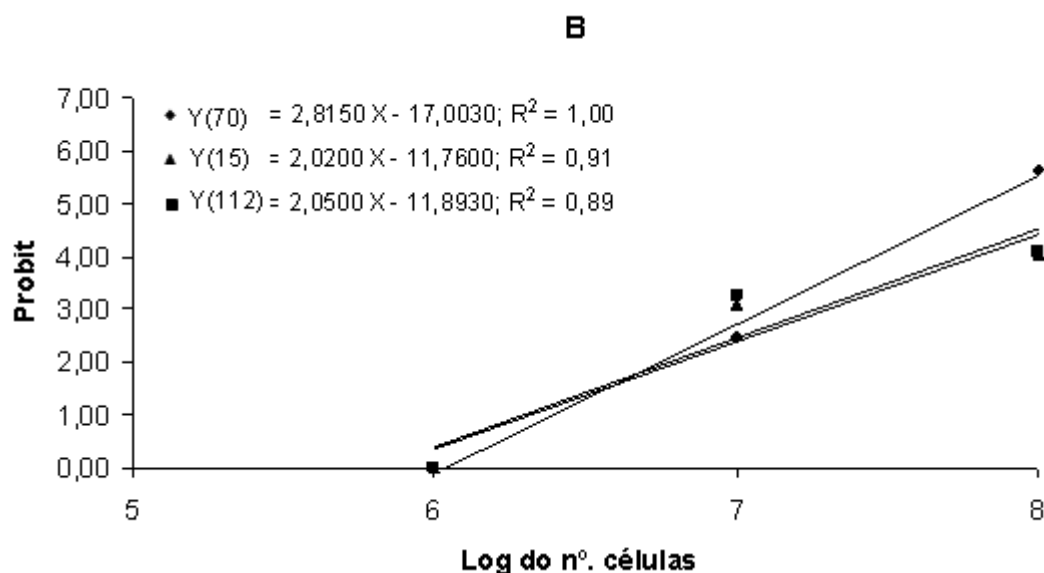
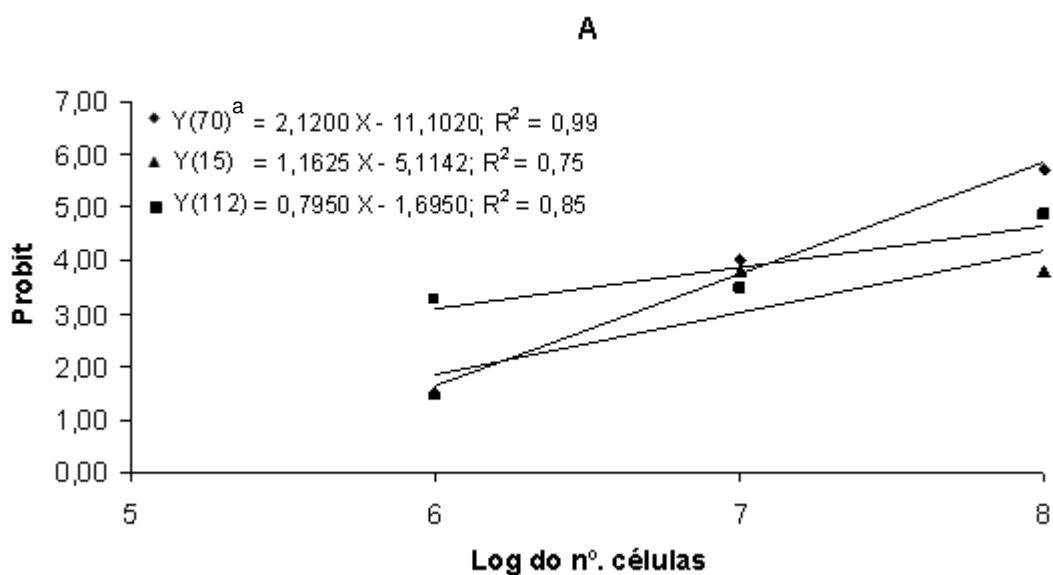
Estado	Isolado 15 (PR)					
	Diluição	10 <sup>6</sup> UFC/ mL		10 <sup>7</sup> UFC/ mL		10 <sup>8</sup> UFC/ mL
Cultivares <sup>a</sup>	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
BY suscetível	0	1	18	1	8	4
BY resistente	0	0	2	1	13	5
VA suscetível	0	1	2	8	2	66
VA resistente	0	1	5	1	9	17

Isolado 70 (SC)						
BY suscetível	1	0	21	2	30	44
BY resistente	0	0	24	0	36	38
VA suscetível	0	5	4	36	24	45
VA resistente	0	17	29	37	23	45

Isolado 112 (RS)						
BY suscetível	1	4	1	8	38	8
BY resistente	0	0	4	1	15	5
VA suscetível	0	0	0	2	2	3
VA resistente	0	0	0	0	7	12

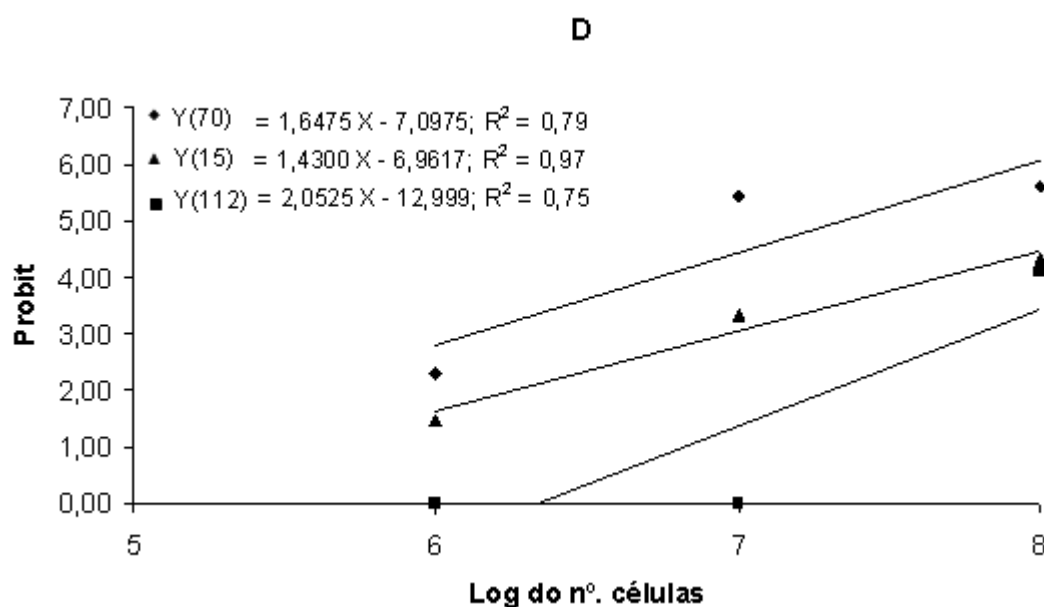
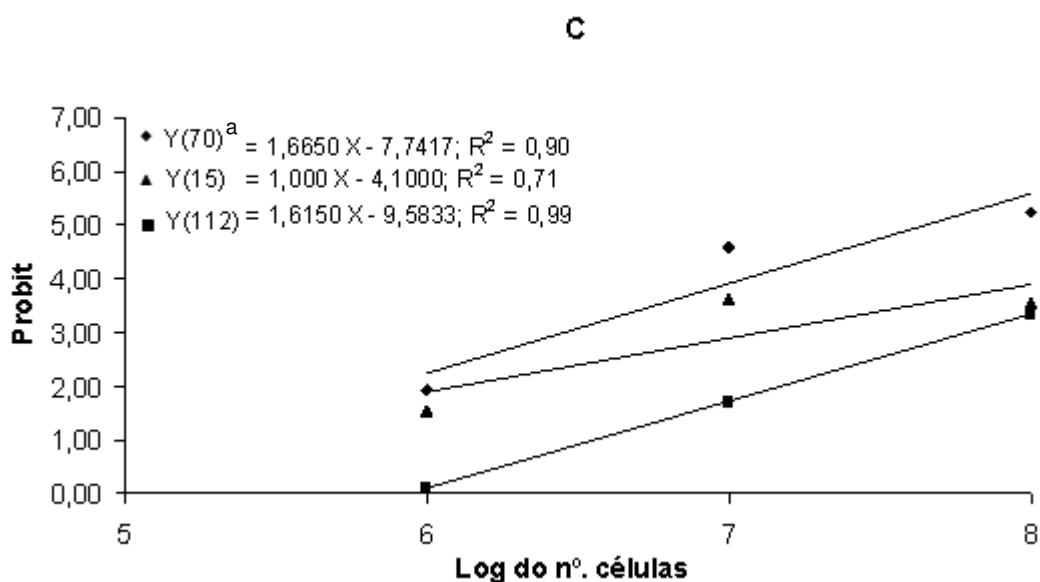
<sup>a</sup> BY – Burley; VA – Virgínia.

APÊNDICE 7. Relação entre a concentração de células de *Ralstonia solanacearum* e o número de mudas com murcha (probit) 15 dias após a inoculação. A- Burley suscetível; B- Burley resistente; Virgínia suscetível; D- Virgínia resistente. Cachoeirinha, RS, Brasil, 2010.



<sup>a</sup> Isolado representante de cada estado: 70 - SC, 15 - PR e 112 - RS.

continuação APÊNDICE 7. Relação entre a concentração de células de *Ralstonia solanacearum* e o número de mudas com murcha (probit) 15 dias após a inoculação. A- Burley suscetível; B- Burley resistente; C- Virgínia suscetível; D- Virgínia resistente. Cachoeirinha, RS, Brasil, 2010.



<sup>a</sup> Isolado representante de cada estado: 70 - SC, 15 - PR e 112 - RS.