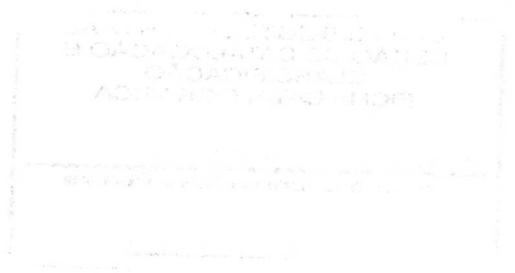


NATÁLIA RISSO FONSECA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E INOCULAÇÃO DE *Ralstonia solanacearum* EM *Eucalyptus* spp.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012



**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F676c
2012

Fonseca, Natália Risso, 1986-
Caracterização molecular e inoculação de
Ralstonia solanacearum em *Eucalyptus* spp. / Natália Risso
Fonseca. – Viçosa, MG, 2012.
viii, 43f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Ralstonia solanacearum*. 2. Murcha-bacteriana.
3. Eucalipto. 4. Eucalipto - Inoculação. 5. Variação
(Genética). 6. Eucalipto - Resistência a doenças e pragas -
Aspectos genéticos. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

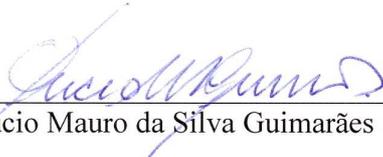
CDD 22. ed. 579.332

NATÁLIA RISSO FONSECA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E INOCULAÇÃO DE *Ralstonia solanacearum* EM *Eucalyptus* spp.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de julho de 2012.


Lúcio Mauro da Silva Guimarães


Luís Cláudio Vieira da Cunha
(Coorientador)


Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Ao meu pai Irineu Natalino Fonseca e

À minha mãe Leonice Risso Fonseca

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar e proteger meu caminho.

Aos meus pais Irineu Natalino Fonseca e Leonice Risso Fonseca por todo o amor e carinho, além da instrução, incentivo e apoio aos meus estudos.

A toda minha família pelo amor, união e ensinamentos transmitidos.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade.

À Fapemig, ao CNPq e às empresas florestais/SIF pelo apoio financeiro para o desenvolvimento das pesquisas.

Às empresas AMCEL, CMPC e Fibria pelo apoio logístico e financeiro para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Acelino Couto Alfenas pela oportunidade, incentivo e confiança em meu trabalho.

Ao DS. Lúcio M. S. Guimarães por toda a ajuda prestada, pela paciência, amizade, por acompanhar todas as etapas deste trabalho e pela participação na banca.

Ao Dr. Carlos Alberto Lopes pela coorientação, disponibilidade e incentivo. Ao professor Luis Cláudio Vieira da Cunha pela coorientação.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Patologia Florestal - PATOMOL pelo companheirismo, pela disposição em ajudar e por fazer os dias de trabalho agradáveis e produtivos. Em especial agradeço ao Ramom por toda a ajuda, prestabilidade e paciência ao longo desses anos, e à Pollyane pela ajuda na execução desse trabalho.

À Cíntia Silva, Flora Villar, Daniele Arriel, Marcela Galo, Bárbara Elias, Camila Santana e Camila Moreira pela amizade e pelos conselhos nos momentos de ansiedade e incertezas.

Ao Pedro por todo amor, carinho e companheirismo, essenciais nesse último ano.

À minha república e a todas às meninas que se tornaram minha família em Viçosa, por toda a amizade, carinho e companheirismo.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Obrigada!

BIOGRAFIA

Natália Risso Fonseca nasceu na cidade de São José dos Campos, no Estado de São Paulo, no dia 19 de junho de 1986.

Em 2003 concluiu o ensino médio na Escola Estadual Prof^o Estevam Ferri na própria cidade natal. No ano de 2005 ingressou no curso de Engenharia Florestal na Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa, Minas Gerais, sendo que o mesmo foi concluído ao final do ano de 2009.

Em maio de 2007 ingressou no Laboratório de Patologia Florestal, onde iniciou sua Iniciação Científica através do Projeto “Etiologia de doenças bacterianas do eucalipto e avaliação de resistência”. Em agosto de 2010 iniciou o curso de mestrado em Fitopatologia sob orientação do Professor Acelino Couto Alfenas no Laboratório de Patologia Florestal/Bioagro do Departamento de Fitopatologia da UFV.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
ARTIGO 1 - Caracterização molecular de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> de <i>Eucalyptus</i> spp.	4
RESUMO	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAL E MÉTODOS	8
Isolados	8
Preservação das culturas bacterianas	8
Extração de DNA genômico	8
Amplificação por PCR para confirmação da identidade de <i>R. solanacearum</i>	10
Classificação em filotipo	10
Classificação em sequevar	11
Classificação em clones por ERIC-PCR.....	12
RESULTADOS	13
Confirmação da identidade de <i>R. solanacearum</i> por PCR	13
Classificação em filotipo	14
Classificação em sequevar	14
Classificação em clones por ERIC-PCR.....	15
DISCUSSÃO	18
ANEXOS	27
ARTIGO 2 - Resistência de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. à murcha-de-Ralstonia causada por <i>Ralstonia solanacearum</i>	28
RESUMO	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
1. Métodos de inoculação	31
2. Resistência de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. à murcha-de-Ralstonia.....	33
RESULTADOS	34
1. Métodos de inoculação	34
2. Resistência de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. à murcha-de-Ralstonia.....	34
DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS	40
CONCLUSÕES GERAIS	43

RESUMO

FONSECA, Natália Risso Fonseca, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Caracterização molecular e inoculação de *Ralstonia solanacearum* em *Eucalyptus* spp.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Coorientadores: Carlos Alberto Lopes e Luís Cláudio Vieira da Cunha.

A murcha-de-Ralstonia do eucalipto, causada por *Ralstonia solanacearum*, constitui potencialmente, uma das principais doenças da cultura. Devido à sua ampla variabilidade, atualmente *R. solanacearum* é considerada um “complexo de espécies”, subdividida em quatro níveis taxonômicos: espécie, filotipo, sequevar e clone. Com o intuito de entender a variabilidade entre isolados de *R. solanacearum* provenientes de eucalipto e desenvolver um protocolo de inoculação e avaliação da resistência de clones de eucalipto à murcha-de-Ralstonia realizou-se este trabalho. Ele foi dividido em dois artigos: (i) Caracterização molecular de isolados de *Ralstonia solanacearum* de *Eucalyptus* spp. e (ii) Método de inoculação e avaliação de resistência de clones de *Eucalyptus* spp. à murcha-de-Ralstonia causada por *Ralstonia solanacearum*. No artigo 1, foram analisados 19 isolados de *R. solanacearum* obtidos de eucalipto de diferentes regiões do Brasil quanto à nova classificação (filotipo e sequevar) e quanto à variabilidade genética. Um produto de 372 pb gerado pela amplificação por PCR-multiplex, utilizando *primers* Nmult, permitiu identificar todos os isolados analisados no filotipo II. Dezoito isolados foram agrupados no subclado IIA e apenas um no IIB. A árvore filogenética gerada a partir das sequências do gene da endoglucanase (*egl*) confirmou a classificação dos isolados no filotipo II e os separou em sequevares. Os isolados AMC22, IBSBF2568 e IBSBF2576 agruparam-se em um único clado, assim como os isolados UFV18 e UFV20, com 89% e 78% de probabilidade *posteriori*, respectivamente, compondo dois novos possíveis sequevares, ainda não definidos. Foram identificados também isolados pertencentes ao sequevar 41 (100% de probabilidade) e 37 (88% de probabilidade). Entretanto, a maioria dos isolados não se enquadraram em nenhum sequevar descrito, nem formaram clados definidos. O resultado da análise de fragmentos amplificados pela técnica de ERIC-PCR indicou grande diversidade genética entre os isolados avaliados neste trabalho, havendo, em geral, uma alta correlação entre a origem geográfica dos isolados e a similaridade entre eles. No

artigo 2, avaliaram-se três métodos de inoculação e a resistência de clones de *Eucalyptus* spp. à murcha-de-Ralstonia: (i) infestação do solo com *R. solanacearum*; (ii) imersão de raízes seccionadas em suspensão bacteriana; e (iii) injeção de suspensão bacteriana na base do caule. O método de inoculação de injeção de suspensão bacteriana na base do caule destacou-se como o mais eficiente para inoculações de *R. solanacearum* em eucalipto. De 21 clones avaliados quanto à resistência à murcha-de-Ralstonia por esse método, apenas quatro foram classificados como resistentes por não apresentarem sintomas de murcha e exsudação bacteriana até 30 dias após a inoculação.

ABSTRACT

FONSECA, Natália Risso Fonseca, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Molecular characterization and inoculation of *Ralstonia solanacearum* in *Eucalyptus* spp.** Adviser: Acelino Couto Alfenas. Co-advisers: Carlos Alberto Lopes and Luís Cláudio Vieira da Cunha.

The Ralstonia wilt of eucalyptus, caused by *Ralstonia solanacearum*, is potentially one of the major disease of culture. Because of its high genetic and phenotypic variability, currently *R. solanacearum* is considered a "species complex", subdivided into four taxonomic levels: species, filotipo, sequevar and clone. In order to understand the variability among isolates of *R. solanacearum* from eucalyptus and develop a protocol for inoculation and screening of resistant clones of eucalyptus to Ralstonia wilt this work was performed. The work was divided into two articles: (i) Molecular characterization of isolates of *Ralstonia solanacearum* in *Eucalyptus* spp. and (ii) Method of inoculation and evaluation of resistant clones of *Eucalyptus* spp. to Ralstonia wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. In Article 1, 19 isolates were analyzed from different regions of eucalyptus in Brazil based on new classification (filotipo and sequevar) and its genetic variability. A product of 372 bp generated by multiplex-PCR amplification using primers Nmult permitted the identification of all isolates analyzed as pertaining to filotipo II. Eighteen isolates were grouped in subclade IIA and just one isolate in IIB. The phylogenetic tree generated from the endoglucanase (*egl*) gene sequences confirmed the classification of the isolates in filotipo II and separated them into sequevars. The strains AMC22, IBSBF2568 and IBSBF2576 were grouped into a single clade, as well as isolates UFV18 and UFV20, with 89% and 78% posterior probability, respectively, forming two new possible sequevars not defined yet. We also identified isolates belonging to sequevar 41 (100% probability) and 37 (88% probability). However, most of the isolates did not fit in any of previously described sequevar, or formed defined clades. The analysis of results of obtained fragments amplified by ERIC-PCR technique suggested a great genetic diversity among the isolates analyzed in this work. In addition, a high correlation between the geographical origin of isolates and the similarity showed by them was observed. In Article 2, three methods of inoculation and resistant of

Eucalyptus spp. clones to Ralstonia wilt was evaluated: (i) soil infestation with *R. solanacearum*, (ii) dipping of sectioned roots in bacterial suspension, and (iii) injection of a bacterial suspension in the base of the stem. The injection method of a bacterial suspension at the stem base was the most efficient inoculation method of *R. solanacearum* on eucalyptus. Four, out of 21 clones tested for Ralstonia wilt resistance by this method, were classified as resistant by not showing symptoms of wilt and bacterial exudation up to 30 days after inoculation.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a cultura do eucalipto é de grande importância econômica, ambiental e social, ocupando uma área plantada de aproximadamente 4.750.000 ha (ABRAF, 2011). Adicionalmente, a eucaliptocultura está em franca expansão na maioria dos estados brasileiros com tradição na silvicultura, ou em estados considerados como novas fronteiras, com crescimento médio no país de 7,1% ao ano entre 2004-2009 (ABRAF, 2011). Todavia, o avanço das áreas plantadas com espécies e, ou clones sem o prévio conhecimento da resistência a doenças e o plantio de extensas áreas com um mesmo clone/genótipo criam condições favoráveis à ocorrência de epidemias, cujos agentes etiológicos encontravam-se endemicamente presentes ou foram acidentalmente introduzidos nessas regiões (Alfenas *et al.*, 2009). Além de fungos, principal grupo de fitopatógenos da cultura do eucalipto, fitobactérias como *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia psidii* e *Xanthomonas axonopodis* foram relatadas como importantes agentes causais de doenças do eucalipto no Brasil (Alfenas *et al.*, 2009).

A murcha-de-Ralstonia no eucalipto, causada por *R. solanacearum*, foi reportada no Brasil, pela primeira vez, no início da década de 1980, no município de Prata, Minas Gerais, em plantios de *E. grandis* (Sudo *et al.*, 1983). Em 2005, ao se computar apenas a perda de mudas e propágulos na fase de multiplicação, essa doença resultou em elevadas perdas econômicas em viveiros de eucalipto nos Estados da Bahia, do Espírito Santo, do Maranhão, de Minas Gerais e do Pará, totalizando um prejuízo estimado em, no mínimo, R\$ 6 milhões (= US\$ 2,7 milhões) (Alfenas *et al.*, 2006). No entanto, ao considerar o preço real de minicepas clonais, este valor sobe para aproximadamente R\$ 49 milhões (= US\$ 27 milhões) (Alfenas *et al.*, 2009). Atualmente, a murcha-de-Ralstonia constitui, potencialmente, uma das principais doenças da cultura, principalmente, em virtude de sua natureza sistêmica, dos danos causados, da alta variabilidade do patógeno e de características do patossistema que dificultam o seu controle. *Ralstonia solanacearum* é capaz de sobreviver no solo e, potencialmente em restos de cultura de eucalipto, podendo ser disseminada no campo por mudas infectadas e no viveiro durante o preparo de miniestacas resultando em eficiente disseminação da bactéria.

No minijardim clonal, a doença caracteriza-se por necrose foliar, escurecimento anelar ou completo do lenho, murcha e morte de minicepas. Os sintomas na parte aérea são similares à morte gradual de minicepas submetidas a podas drásticas ou com sistema radicular malformado. Na fase de enraizamento, miniestacas infectadas podem apresentar arroxamento das nervuras do limbo foliar e podridão. No campo, a doença caracteriza-se por bronzeamento e necrose foliar, desfolha basal, ascendente escurecimento interno do lenho e morte da planta, geralmente a partir do quarto mês após o plantio (Alfenas *et al.*, 2006). A murcha-de-Ralstonia pode, ainda, reduzir o índice de sobrevivência das plantas no campo e contribuir para aumentar a mato-competição. As plantas infectadas geralmente apresentam redução acentuada no desenvolvimento, bem como alterações indesejáveis na qualidade da madeira.

Esta dissertação foi dividida em dois artigos a serem submetidos na “Tropical Plant Pathology”. No artigo 1, objetivou-se caracterizar por meio de técnicas moleculares os isolados de *R. solanacearum* de eucalipto, coletados no Brasil, quanto ao filotipo, sequevar e linhagens clonais. No artigo 2, objetivou-se desenvolver um protocolo de inoculação e avaliação da resistência em clones de eucalipto à murcha-de-Ralstonia; e também selecionar genótipos de *Eucalyptus* spp. resistentes.

Espera-se que as informações geradas neste estudo possam contribuir significativamente para o controle desta importante doença. Ademais, a caracterização dos isolados do patógeno que infectam *Eucalyptus* spp. por meio de técnicas moleculares modernas, em filotipos, sequevares e clones, conforme proposta recente e bem aceita na comunidade científica (Fegan & Prior, 2005), permitirá entender melhor a variabilidade do patógeno no Brasil e suas consequências para o manejo da murcha-de-Ralstonia.

REFERÊNCIAS

- ABRAF Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (2011). Anuário Estatístico da ABRAF 2011, ano base 2010. Brasília, 130p.
- Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA (2006) *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. Fitopatologia Brasileira 31:357-366.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e doenças do eucalipto. 2ª Ed. Editora UFV. Viçosa, MG. 500 p.
- Fegan M, Prior P (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (Eds.) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS. St. Paul. p. 449-461.
- Sudo S, Oliveira GHN, Pereira AC (1983) Eucalipto (*Eucalyptus* sp) e Bracatinga (*Mimosa escabrela*), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. Fitopatologia Brasileira 8:631.

ARTIGO 1 - Caracterização molecular de isolados de *Ralstonia solanacearum* de *Eucalyptus* spp.

Natália R. Fonseca¹, Lúcio M. da S. Guimarães¹, Pollyane S. Hermenegildo¹, Ramon U. Teixeira¹, Carlos A. Lopes² & Acelino C. Alfenas¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ²Embrapa Hortaliças, Caixa Postal 218, 70359-970, Brasília, Distrito Federal, Brasil. aalfenas@ufv.br

RESUMO

Dentre os patógenos bacterianos do eucalipto no Brasil, *Ralstonia solanacearum* é considerado um dos mais importantes, em razão das características do patógeno e dos prejuízos causados por este na cultura nos últimos anos. Em razão da importância desse fitopatógeno para a cultura, este trabalho objetivou realizar uma caracterização molecular de diferentes isolados do Brasil provenientes de plantas de eucalipto infectadas. Foram analisadas 19 culturas bacterianas isoladas de eucalipto de diferentes regiões do Brasil. Um produto de 372 pb gerado pela amplificação por PCR-multiplex, utilizando *primers* Nmult permitiu identificar todos os isolados analisados como pertencentes ao filotipo II. Dezoito isolados foram agrupados no subclado IIA e apenas um no IIB. A árvore filogenética gerada a partir das sequências do gene da endoglucanase (*egl*) confirmou a classificação dos isolados no filotipo II e separou os isolados em distintos sequevares. Os isolados AMC22, IBSBF2568 e IBSBF2576 se agruparam em um único clado, assim como os isolados UFV18 e UFV20, com 89% e 78% de probabilidade *posteriori*, respectivamente, compondo dois novos possíveis sequevares, ainda não definidos. Foram identificados também isolados pertencentes ao sequevar 41 (100% de probabilidade) e 37 (88% de probabilidade). Entretanto, a maioria dos isolados não se enquadraram em nenhum sequevar já descrito, assim como também não formaram clados. O resultado da análise de fragmentos amplificados pela técnica de ERIC-PCR indicou grande diversidade genética entre os isolados avaliados nesse trabalho, havendo, no geral, uma alta correlação entre a origem geográfica dos isolados e a similaridade apresentada entre eles.

INTRODUÇÃO

Ralstonia solanacearum é uma das fitobactérias mais importantes do mundo, capaz de causar doença em mais de 450 espécies de plantas de diferentes famílias botânicas (Xu *et al.*, 2009). Essa bactéria tem sido considerada um “complexo de espécies” devido à significativa variabilidade genética dentro da espécie (Fegan & Prior, 2005), excepcional diversidade entre as estirpes em relação a gama de hospedeiros, virulência, relações epidemiológicas, propriedades fisiológicas e ampla distribuição geográfica (Hayward, 1994). É uma bactéria Gram-negativa, aeróbica estrita, bastonetiforme, habitante do solo, com um ou mais flagelos polares, pertencente à subdivisão β -proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae (Euzéby, 2009).

Ralstonia solanacearum foi descrita pela primeira vez por Smith, em 1896, como *Bacillus solanacearum*. Em 1914, o mesmo autor reclassificou-a como *Pseudomonas solanacearum*. Já em 1992, a bactéria foi reclassificada como *Burkholderia solanacearum* (Smith) por Yabuuchi *et al.* (1992). No entanto, três anos depois, a espécie foi novamente reclassificada como um novo gênero, denominado *Ralstonia* [(Smith, 1896) comb. nov. Yabuuchi *et al.* (1995)] (Yabuuchi *et al.*, 1995).

Historicamente, os isolados de *R. solanacearum* são classificados em cinco raças (R), com base na relação de hospedeiros (Buddenhagen *et al.*, 1962) e cinco biovars (bv), de acordo com a capacidade de oxidar determinados açúcares e álcoois (maltose, lactose, celobiose, manitol, dulcitol e sorbitol) como fontes de carbono (Hayward, 1991). A R1 infecta solanáceas e outros hospedeiros e inclui os bv 1, 3 e 4; a R2 infecta banana, outras musáceas e heliocônias e também inclui os bv 1, 3 e 4; a R3 infecta principalmente batata e gerânio, e inclui o bv 2; a R4 infecta gengibre e inclui os bv 3 e 4; enquanto a R5 que infecta a amoreira e contém apenas o bv 5. Posteriormente, a bv 2 foi dividida em 2A (A de Andino) e 2N ou 2T (T de Tropical) (Hayward, 1991).

Embora ambas as classificações fenotípica e bioquímica ainda sejam amplamente utilizadas e tenham se mostrado útil no passado, elas possuem as seguintes desvantagens: são demoradas, incapazes de definir estirpes em um nível sub-específico; além de não terem ligações com a origem geográfica das espécies

(Gillings *et al.*, 1994; Villa *et al.*, 2005). Em face disso, classificações baseadas em abordagens moleculares têm sido desenvolvidas para melhorar a compreensão da diversidade infra-subespecífica de *R. solanacearum* (Seal *et al.*, 1992; Taghavi *et al.*, 1996; Fegan *et al.*, 1998; Poussier *et al.*, 1999, 2000).

Cook *et al.* (1989) e Cook & Serqueira (1994) com base na análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (*restriction fragment length polymorphism* – RFLP), classificaram os isolados de *R. solanacearum* em 46 genótipos multilocus, separando-os em duas divisões maiores geneticamente distintas, denominadas I e II. A divisão I corresponde aos bv 3, 4 e 5, com isolados predominantemente da Austrália e Ásia, enquanto as estirpes originárias das Américas pertencem a divisão II, correspondendo aos bv 1, 2 e 2N (T) (Cook & Serqueira, 1994). Infelizmente, as sondas de RFLP utilizadas por Cook & Serqueira (1994) para genotipagem multilocus não estão mais disponíveis, o que torna esta classificação obsoleta (Xu *et al.*, 2009).

Recentemente, Fegan & Prior (2005), baseando-se em análises de sequências da região espaçadora intergênica (ITS) 16S–23S e dos genes *egl*, *hrpB* e *mutS*, propuseram uma nova classificação filogenética e hierárquica, subdividida em quatro níveis taxonômicos: espécie, filotipo, sequevar e clone. Essa nova classificação é vantajosa por ser flexível, podendo agregar novos genótipos à medida que forem descobertos, e refletir melhor a diversidade do complexo, além de explicar a origem geográfica, a disseminação da bactéria e de confirmar os estudos anteriores realizados com RFLP por Cook *et al.* (1989).

O filotipo (*cluster* gênico), o qual reflete a origem dos isolados, é identificado por PCR-multiplex baseado no tamanho da sequência na região ITS do gene 16S-23S RNA, designando grupos maiores ao nível de subespécie. O filotipo I é caracterizado pela amplificação de um fragmento de 144 pb, o filotipo II por um fragmento de 372 pb, o filotipo III por um de 91 pb e o IV por um de 213 pb. O filotipo I contém isolados originados principalmente da Ásia, equivale à divisão I (Cook & Serqueira, 1994) e inclui as estirpes pertencentes às bv 3, 4 e 5. O filotipo II inclui isolados originários da América, equivale à divisão II e inclui estirpes pertencente às bv 1, 2 e 2T. O filotipo III contém isolados da África e ilhas próximas e inclui estirpes das bv 1 e 2T. Já o filotipo IV contém isolados principalmente da Indonésia, mas também do Japão, Filipinas, Coréia e Austrália, e contém estirpes pertencentes às bv 1, 2 e 2T.

Cada filotipo pode ser subdividido em sequevares, os quais contêm isolados com similares padrões de virulência ou origem geográfica comum, sendo definidos por terem uma sequência altamente conservada do gene da endoglucanase (*egl*) (Fegan & Prior, 2005). Até o momento já foram descritos 51 sequevares (Xu *et al.*, 2009). Cada sequevar pode conter ainda diferentes linhagens clonais, que podem ser distinguidas por técnicas de *fingerprinting* genômico como REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), BOX ou ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*)-PCR.

A correta classificação taxonômica e o conhecimento da variabilidade é um fator importante para estudos de genética e epidemiologia da murcha-de-Ralstonia e, conseqüentemente, para o controle da doença. Diversos estudos (Xu *et al.*, 2009; Cellien & Prior, 2010; Xue *et al.*, 2011; Lebau *et al.*, 2011; Siri *et al.*, 2011; Santana *et al.*, 2012) têm caracterizado isolados de *R. solanacearum* a partir da classificação proposta por Fegan & Prior (2005). Entretanto, até o presente nenhum desses estudos focaram em isolados provenientes de eucalipto do Brasil. A murcha-de-Ralstonia têm causados prejuízos na cultura (Alfenas *et al.*, 2006, 2009) e tornado-se uma doença limitante para a cultura. Assim, em face ao pouco conhecimento a respeito das estirpes de *R. solanacearum* que infectam plantas de eucalipto, bem como da diversidade genética desses isolados no país, esse trabalho objetivou caracterizar isolados de *R. solanacearum* quanto a nova classificação proposta para o patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados

Foram utilizados 11 isolados, caracterizados parcialmente por Alfenas *et al.* (2006), provenientes de plantas de eucalipto infectadas de diferentes locais do Brasil (Tabela 1). Adicionalmente, foram utilizados seis isolados adquiridos da Coleção de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo (IBSBF) e dois novos isolados (AMC22 e AMC77) coletados no Amapá. Para efeito de comparação foram utilizados os isolados GMI1000, UW386 e UW443 pertencentes aos filotipos I, III e IV, respectivamente, cedidos pelo Dr. Carlos Lopes, pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPQ), Brasília-DF e o isolado IBSBF292^T, pertencente ao filotipo II, e também adquirido no IBSBF (Tabela 1).

Preservação das culturas bacterianas

A partir do crescimento em meio sólido, as culturas foram preservadas em água estéril e em glicerina (Romeiro, 2001). Para a preservação em água, foi preparada uma suspensão concentrada (aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹) de células bacterianas em água estéril a partir de culturas crescidas em placas de Petri contendo o meio 523 (Kado & Heskett, 1970) a 28 °C por 24 h (Romeiro, 2001). A suspensão foi transferida para microtubos (1,5 mL) estéreis que foram mantidos em temperatura ambiente. Para a preservação por congelamento em glicerina (Schaad *et al.*, 2001), os isolados foram repicados para microtubos estéreis (1,5 mL) contendo 0,5 mL de meio 523 líquido e mantidos por 24 h a 28 °C, em seguida foi adicionado 0,6 mL de glicerina 20 % (v/v) e os microtubos foram condicionados em ultra freezer com temperatura de -80 °C.

Extração de DNA genômico

O DNA bacteriano foi extraído utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit[®] (Promega) a partir de culturas bacterianas crescidas *overnight* em meio 523 líquido. Para isso, uma cultura isolada foi colocada em um microtubo (1,5 mL) contendo 1 mL do meio. A metodologia de extração foi realizada conforme recomendação do fabricante. Após a extração, a concentração do DNA de cada

amostra foi quantificada utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop® (Thermo Scientific) e o DNA diluído para a concentração de 10 ng μL^{-1} .

Tabela 1. Isolados de *Ralstonia solanacearum* utilizados na caracterização molecular.

Isolados de eucalipto					
Isolado	Local de origem	Hospedeiro	Biovar		Fonte/ Coletor
UFV 7	Bahia	<i>Corymbia citriodora</i>	1		Alfenas <i>et al.</i> , 2006
UFV 12	Maranhão	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Alfenas <i>et al.</i> , 2006
UFV 13	Minas Gerais	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Alfenas <i>et al.</i> , 2006
UFV 18	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Alfenas <i>et al.</i> , 2006
UFV 20	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Alfenas <i>et al.</i> , 2006
UFV 31	Minas Gerais	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Alfenas <i>et al.</i> , 2006
UFV 32	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Alfenas <i>et al.</i> , 2006
UFV 34	Pará	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Alfenas <i>et al.</i> , 2006
UFV 48	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Alfenas <i>et al.</i> , 2006
UFV 55	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Alfenas <i>et al.</i> , 2006
UFV 60	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Alfenas <i>et al.</i> , 2006
AMC 22	Amapá	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Natália Risso Fonseca
AMC 76	Amapá	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Natália Risso Fonseca
IBSBF 624	Pará	<i>Eucalyptus urophylla</i>	2T		Instituto Biológico de São Paulo – Campinas (SP)
IBSBF 625	Bahia	<i>Eucalyptus urophylla</i>	1		Instituto Biológico de São Paulo – Campinas (SP)
IBSBF 638	Pará	<i>Eucalyptus urophylla</i>	1		Instituto Biológico de São Paulo – Campinas (SP)
IBSBF 2131	Minas Gerais	<i>Eucalyptus urophylla</i>	1		Instituto Biológico de São Paulo – Campinas (SP)
IBSBF 2568	Santa Catarina	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Instituto Biológico de São Paulo – Campinas (SP)
IBSBF 2576	Santa Catarina	<i>Eucalyptus</i> sp.	1		Instituto Biológico de São Paulo – Campinas (SP)
Isolados de referência					
Isolado	Local de origem	Hospedeiro	Biovar	Filotipo	Fonte/ Coletor
GMI1000	Guiana Francesa	<i>Solanum lycopersicum</i>	3	I	Carlos Alberto Lopes – EMBRAPA Hortaliças
IBSBF 292 ^T	E.U.A	<i>Solanum lycopersicum</i>	1	II	Instituto Biológico de São Paulo – Campinas (SP)
UW386	Nigéria	<i>Solanum lycopersicum</i>	ND	III	Carlos Alberto Lopes – EMBRAPA Hortaliças
UW443	Indonésia	<i>Musa</i> sp.	ND	IV	Carlos Alberto Lopes – EMBRAPA Hortaliças

^T= Isolado tipo de *Ralstonia solanacearum*

Amplificação por PCR para confirmação da identidade de *R. solanacearum*

Para confirmar se todos os isolados pertencem ao complexo *R. solanacearum* realizou-se a amplificação por PCR de um fragmento de ~280 pb, utilizando-se os *primers* 759 e 760, específicos para a espécie (Tabela 2). A reação foi realizada em um volume final de 25 μL , contendo 2,0 μL de DNA (10 ng μL^{-1}), 5,0 μL de tampão de PCR 5X (Promega), 2,0 μL de MgCl_2 (25 mM) (Promega), 2,0 μL de dNTPs (2,5 mM), 1,5 μL de cada *primer* (10 mM) e 0,2 μL de *taq* polimerase (5 U μL^{-1}) (Promega) sendo o volume completado com água destilada ultrapura. As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti 96[®] (Life Technologies) usando um programa que consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min, anelamento a 53 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1,5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 57 °C por 30 s e extensão a 72°C por 30 s, com uma extensão final a 72 °C por 5 min. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1,4 % (p/v) em Tris Acetato EDTA (TAE), corado com Brometo de Etídio (1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e fotodocumentado em L.PIX (Loccus Biotecnologia).

Classificação em filotipo

Para a classificação dos isolados bacterianos em filotipos foi realizada uma PCR-multiplex com um conjunto de quatro *primers* específicos para cada filotipo no sentido direto (Nmult: 21:1 F, Nmult: 21:2 F, Nmult: 22: Inf e Nmult: 23: AF) e um único e conservado *primer* no sentido reverso (Nmult: 22: RR) (Tabela 2). A reação continha 2,0 μL de DNA (10 ng μL^{-1}), 5,0 μL de tampão de PCR 5X (Promega), 2,0 μL de MgCl_2 (25 mM) (Promega), 2,0 μL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 μL de cada um dos *primers* 21:1F, 21:2F, 22:InF, 23:AF (10 mM), 1,0 μL do *primer* 21:RR (10 mM) e 0,2 μL de *taq* polimerase (5 U μL^{-1}) (Promega) em um volume final de 25 μL . As PCRs foram realizadas no termociclador Veriti 96[®] (Life Technologies) em um programa que consistiu de uma desnaturação inicial a 96 °C por 3 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 59 °C por 30 s e 72 °C por 90 s, com uma extensão final a 72 °C por 10 min. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1,4 % (p/v) em Tris Acetato EDTA (TAE), corado com Brometo de Etídio (1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e fotodocumentado em L.PIX (Loccus Biotecnologia).

Tabela 2. *Primers* utilizados na caracterização molecular dos isolados de *Ralstonia solanacearum*.

Nível de identificação	Primer	Sequência	Alvo	Referência
Complexo <i>R. solanacearum</i>	759	5'-gtcgccgtcaactcactttcc-3'	16s rDNA	Opina <i>et al.</i> , 1997
	760	5'-gtcgccgtcagcaatgcggaatcg-3'		
Filotipo	Nmult: 21:1 F	5'-cgttgatgaggcgcaattt-3'	Região ITS	Fegan & Prior, 2005
	Nmult: 21:2 F	5'-aagttatggacggtggaagtc-3'		
	Nmult: 22: inf	5'-attgccaagacgagagaagta-3'		
	Nmult: 23: AF	5'-attacgagagcaatcgaaagatt-3'		
	Nmult: 22: RR	5'-tcgcttgaccctataacgagta-3'		
Sequevar	ENDO-F	5'-atgcatgccgctggcgccgc-3'	Endoglucanase (<i>egl</i>)	Ji <i>et al.</i> , 2006
	ENDO-R	5'-gcgttgcccggcacgaacacc-3'		
Clone	ERIC-1R	5'-atgtaagctctggggattcac-3'	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic</i>	Versalovic <i>et al.</i> , 1994
	ERIC-2	5'-aagtaagtgactggggtcagcg-3'		

Classificação em sequevar

Para a determinação do sequevar foi realizada uma análise filogenética a partir da sequência parcial do gene da endoglucanase (*egl*) amplificado por PCR, utilizando os *primers* Endo-F e Endo-R (Tabela 2) e posteriormente sequenciado. A reação foi realizada em volume final de 25 μ L, contendo 2,0 μ L de DNA (10 ng μ L⁻¹), 5,0 μ L de tampão de PCR 5X (Promega), 2,0 μ L de MgCl₂ (25 mM) (Promega), 2,0 μ L de dNTPs (2,5 mM), 1,5 μ L de cada *primer* (10 mM) e 0,2 μ L de *taq* DNA polimerase (5 U μ L⁻¹) (Promega) sendo o volume completado com água destilada ultrapura. A PCR foi realizada no termociclador Veriti 96[®] (Life Technologies) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 96 °C por 9 min, 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 70 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e uma extensão final de 72 °C por 10 min. Parte do produto da PCR (5 μ L) foi analisada em gel de agarose 1,4% (p/v) corado com Brometo de Etídio (1,0 μ g mL⁻¹) e, após confirmação da amplificação, o restante da reação foi purificado utilizando-se o Kit GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit[®] (GE) e o produto final sequenciado.

O sequenciamento da região amplificada na PCR foi realizado no sequenciador ABI PRISM 3100 (Applied BioSystems). Os *primers* usados para amplificação do DNA também foram utilizados no sequenciamento. As sequências de dados foram analisadas usando o Sequence Navigator version 1.0.1 (Applied BioSystems). As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1992) no software MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), seguido de ajustes manuais. Os dados obtidos através do sequenciamento foram comparadas com 36 sequências de isolados escolhido no GenBank para o gene *egl*, representando diversos sequevares já descritos na literatura (Anexo 1).

O método de Inferência Bayesiana foi utilizado para construir a árvore filogenética. A Inferência Bayesiana foi realizada utilizando o programa MrBayes 3.1.2 (*Bayesian Inference of Phylogeny*) (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). O modelo de substituição foi escolhido com base no critério de informação de Akaike (AIC) do MrModelTest 3.2 (Nylander, 2004), o qual compara cada modelo com todos os outros. A probabilidade *a posteriori* na distribuição de árvores foi criada usando algoritmo MCMC (*Metropolis-coupled Markov Chain Mont Carlo*) de duas cadeias iniciadas a partir de uma árvore ao acaso, com 10 milhões de gerações executadas, sendo descartadas as 25% das primeiras árvores. A convergência do MCMC e o tamanho efetivo da amostra foram checados usando o programa Tracer 1.4 (Rambaut & Drummond, 2007). As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas no programa FigTree 1.3.1. (<http://tree.bio.ac.uk/software>).

Classificação em clones por ERIC-PCR

A classificação dos isolados de *R. solanacearum* em linhagens clonais foi realizada a partir da análise de fragmentos amplificados pela técnica de ERIC-PCR, utilizando o *primer* ERIC-1R e ERIC-2 (Tabela 2). As reações de PCR foram conduzidas em volume total de 25 μL , contendo 2,0 μL de DNA (10 ng μL^{-1}), 5,0 μL de tampão de PCR 5X (Promega), 1,0 μL de MgCl_2 (25 mM) (Promega), 2,0 μL de dNTPs (2,5 mM), 1,5 μL de cada *primer* (10 mM) e 0,2 μL de *taq* DNA polimerase (5 U μL^{-1}) (Promega) sendo o volume completado com água destilada ultrapura. A PCR foi realizada no termociclador Veriti 96[®] (Life Technologies) com um programa que consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 7 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min e 65 °C por 8 min e uma extensão final a 65 °C por

15 min. Os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,5 % (p/v), corado com Brometo de Etídio ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e fotodocumentado em L.PIX (Loccus Biotecnologia).

Empregando o coeficiente binário de Dice (1945) foram gerados dendrogramas, baseados em fragmentos amplificados comuns e diferentes, utilizados no cálculo da matriz de similaridade, e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA- *unweighted pair group method using arithmetic averages*) utilizando o programa Bionumerics, V.5.10 (Applied Maths, St. Martens Latem, Belgium).

RESULTADOS

Confirmação da identidade de *R. solanacearum* por PCR

A partir da amplificação por PCR com os *primers* 759/760, foi gerado um fragmento de 280 pb para todos os isolados analisados neste estudo, incluindo os isolados de referência (Figura 1). O produto de 280 pb gerado nessa amplificação é específico para as espécies do complexo *R. solanacearum*, incluindo isolados de *R. solanacearum*, BDB (*Blood Disease Bacterium*) e *Pseudomonas syzygii* (Fegan & Prior, 2005). Dessa forma, se confirma a identidade dos 19 isolados obtidos de plantas de eucalipto como pertencentes ao complexo *R. solanacearum*.

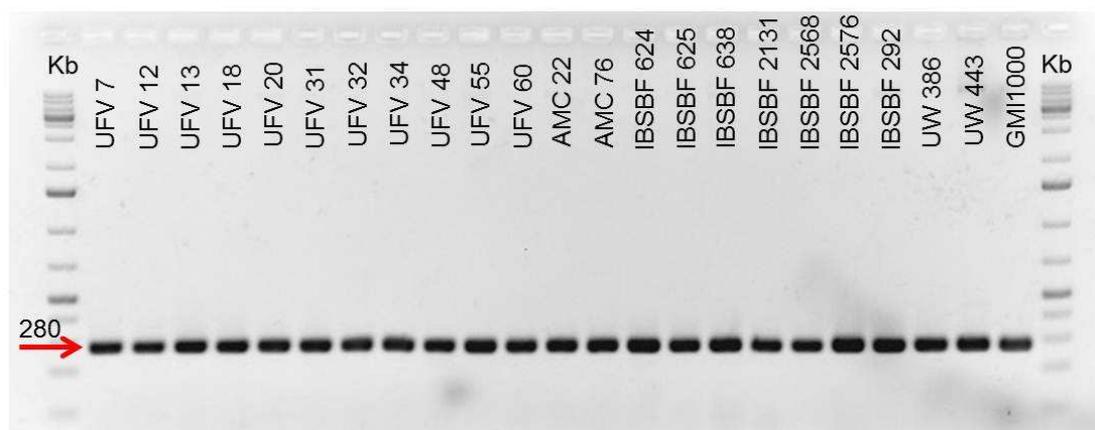


Figura 1. Produtos gerados pela amplificação por PCR com os *primers* 759/760 para a confirmação da identidade dos isolados como sendo *Ralstonia solanacearum*. Kb = marcador molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder (GeneRuler™); UFV7 a IBSBF2576 = isolados bacterianos obtidos de eucalipto; IBSBF292, UW386, UW443 e GMI1000 = isolados de *R. solanacearum* utilizados como comparadores.

Classificação em filotipo

O produto de 372 pb gerado pela amplificação por PCR-multiplex permitiu identificar todos os isolados analisados como pertencentes ao filotipo II, assim como o isolado IBSBF 292, utilizado como comparador do filotipo II. Para os outros isolados comparadores foram amplificados fragmentos de 91 pb para isolado UW386, 213 pb do isolado UW443 e de 144 pb do isolado GMI1000, confirmando como pertencentes aos filotipos III, IV e I, respectivamente (Figura 2).

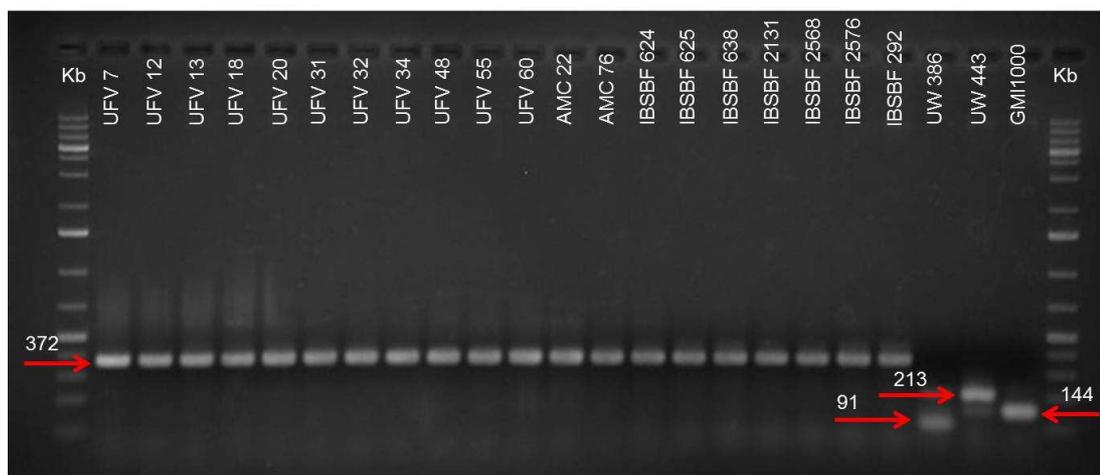


Figura 2. Produtos gerados pela amplificação por PCR-Multiplex para determinação do filotipo dos isolados. Kb = marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (GeneRuler™); UFV7 a IBSBF2576 = isolados de *Ralstonia solanacearum* oriundos de eucalipto; e isolados de *R. solanacearum* utilizados como comparadores: IBSBF292= isolado pertencente ao filotipo II; UW386 = isolado pertencente ao filotipo III; UW443 = isolado do filotipo IV; e GMI1000 = isolado do filotipo I.

Classificação em sequevar

Foram obtidas sequências parciais do gene da endoglucanase (*egl*) de aproximadamente 750 pares de bases (pb) para os 19 isolados em estudo, assim como para os comparadores. O melhor modelo evolucionário selecionado pelo MrModeltest 2.3 para Análise Bayesiana pelo AIC, foi o modelo GTR+I+G com os parâmetros I= 0.4127 e G= 1.0937. O modelo GTR (*General Time Reversible*) leva em conta uma taxa de substituição para cada par de nucleotídeos, além de levar em consideração as frequências dos quatro nucleotídeos. O parâmetro I (sítios invariáveis) representa a proporção de sítios não informativos que são considerados

na análise, enquanto a correção G (*Gamma*) permite descrever as sequências em termos de taxas de divergência diferentes, através do parâmetro alfa. De acordo com a árvore filogenética a partir da sequência do gene *egl* pela Análise Bayesiana foi possível confirmar a separação dos isolados em quatro filotipos e a formação de subclados no filotipo II, confirmando a separação do filotipo II nos subclados IIA e IIB, como descrito por Fegan & Prior (2006), além da formação de um subclado a mais, formado pelas estirpes do filotipo IIA sequer 7.

A árvore gerada agrupou os isolados deste trabalho no clado do filotipo II, sendo que com exceção do isolado IBSBF 624, os demais isolados se agruparam no subclado IIA. O isolado IBSBF 624, classificado previamente como sendo da R3/bv2 (Rodrigues, 2010), se agrupou ao subclado IIB. Esses agrupamentos foram sustentados por ramos com altos valores de probabilidade *posteriori* (Figura 3).

Classificação em clones por ERIC-PCR

Um padrão reprodutível de produtos de amplificação foi obtido, utilizando os iniciadores ERIC-PCR, com os isolados de *R. solanacearum*. Os padrões de fragmentos gerados por ERIC-PCR continha de um a dez fragmentos analisáveis, que variaram de 250 a 7000 pb. O resultado da análise de agrupamento (Figura 4) permitiu separar os isolados em diferentes linhagens clonais a partir da porcentagem de similaridade entre eles. Através da análise dos fragmentos obtidos por ERIC-PCR foi possível separar os isolados em cinco grupos maiores a partir de 28% de similaridade, denominados A, B, C, D e E (Figura 4).

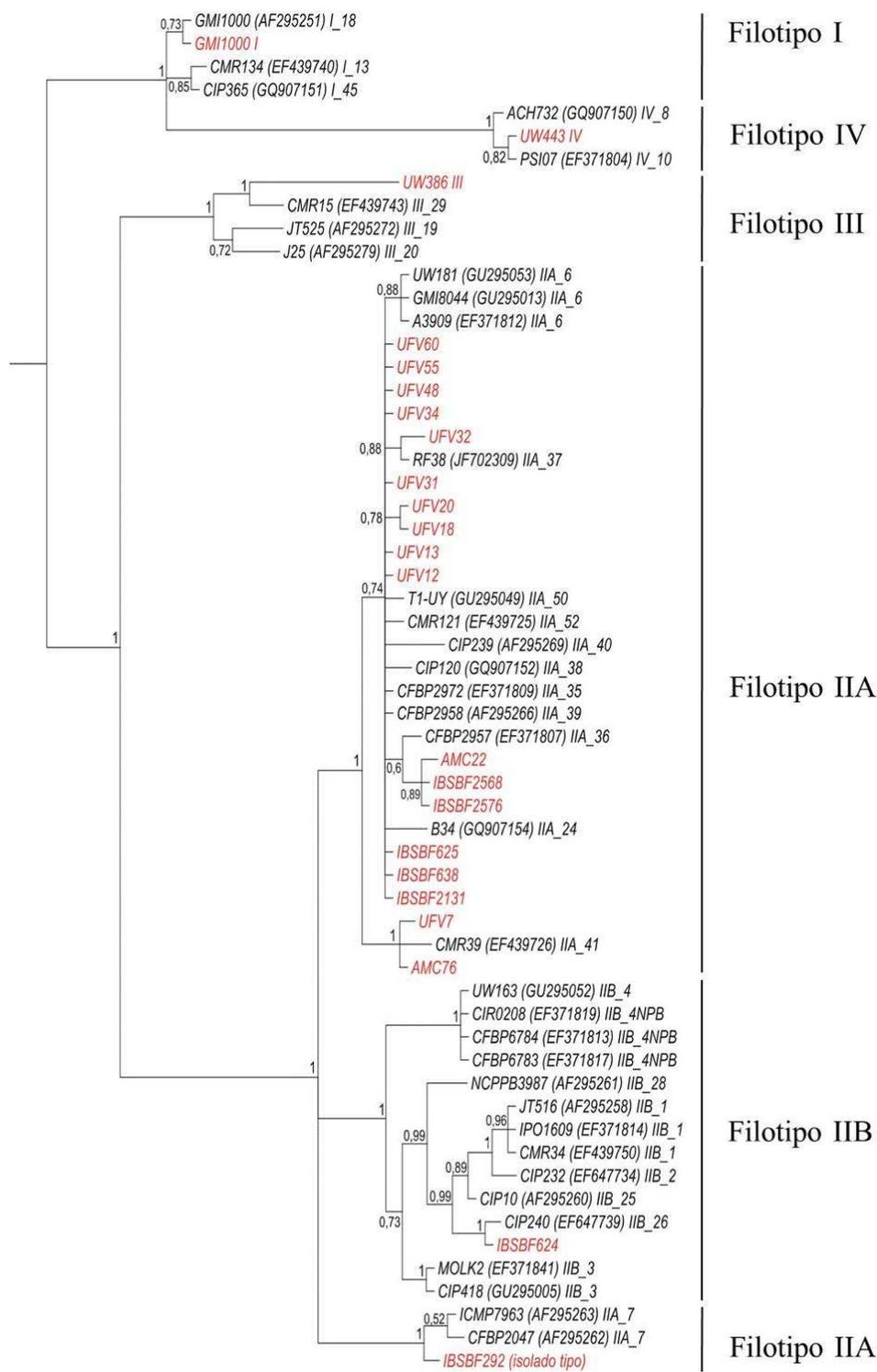


Figura 3. Árvore filogenética construída para as sequências do gene *egl* pelo método de Inferência Bayesiana. Os valores de probabilidade *posteriori* estão indicados nos ramos. O número de acesso no GenBank (entre parênteses), filotipo e sequevar estão indicados à frente do número do isolado. As barras indicam a fração de substituição por sítio. Em vermelho estão destacados os isolados de *Ralstonia solanacearum* provenientes de *Eucalyptus* e os comparadores (IBSBF292= filotipo II; UW386 = filotipo III; UW443 = filotipo IV; e GMI1000 = filotipo I), e em preto os isolados obtidos do GenBank.

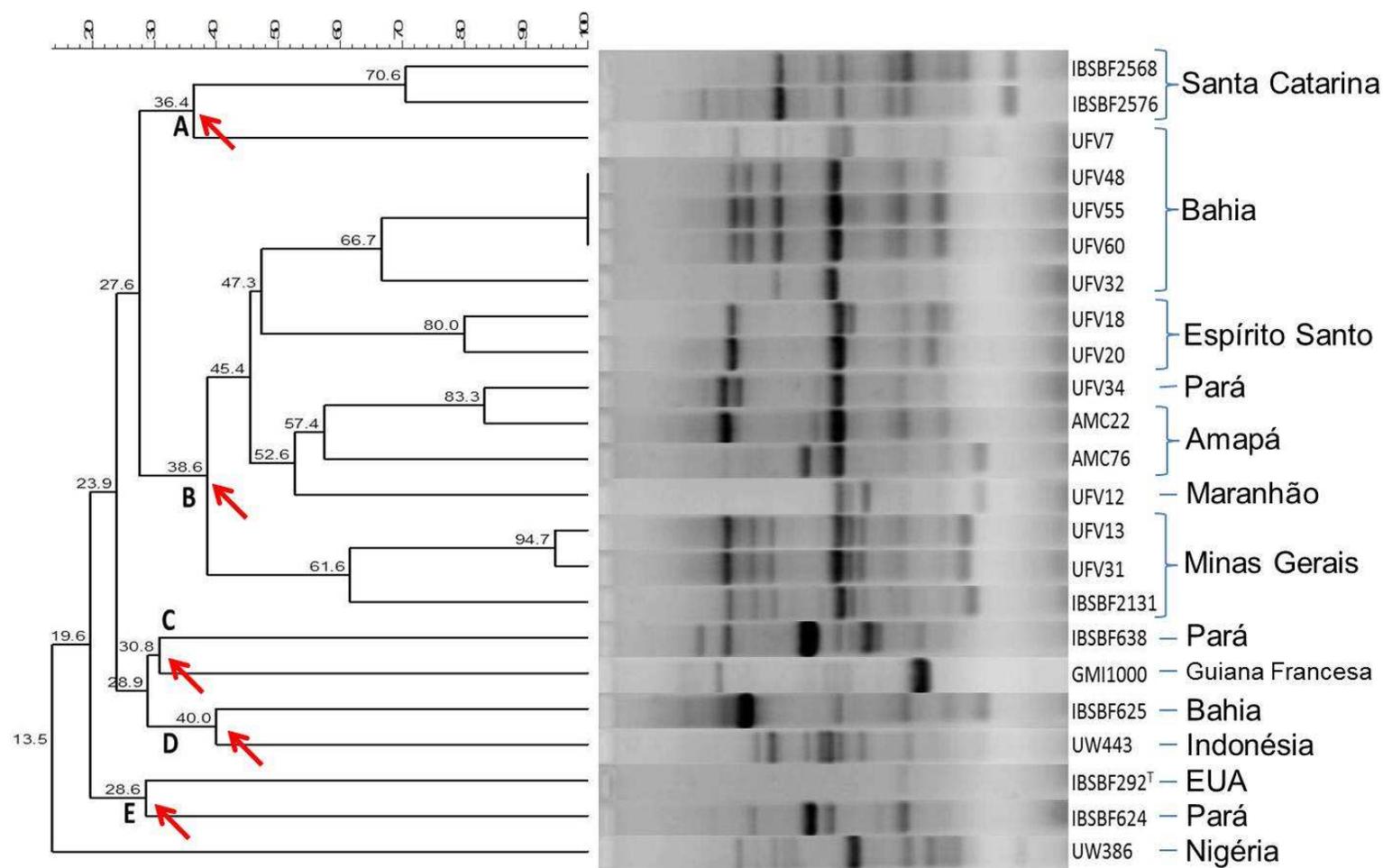


Figura 4. Dendrograma construído com os perfis de fragmentos amplificados por ERIC-PCR dos isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de eucalipto e dos comparadores (IBSBF 292, GMI1000, UW386 e UW443). As diferenças entre os perfis são indicados pela porcentagem de similaridade. O dendrograma foi baseado no coeficiente de similaridade de Dice e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA – *unweighted pair group method using arithmetic averages*).

DISCUSSÃO

Os isolados estudados neste trabalho e oriundos de plantas de eucalipto infectadas no Brasil foram todos classificados no filotipo II, equivalente aos isolados originários das Américas (Fegan & Prior, 2005). Esse filotipo equivale também à divisão II proposta por Cook *et al.* (1994) através de análises de RFLP, e que inclui isolados das bv 1, 2 e 2T, primariamente de origem americana. Além desses, o filotipo II engloba ainda isolados de batata da R3, com ampla distribuição mundial e isolados de banana da R2 (Fegan & Prior, 2005). A separação em filotipos foi ainda confirmada pela análise filogenética do gene da endoglucanase (*egl*) que apresenta variabilidade na sua sequência que permite separar eficientemente estirpes de *R. solanacearum*. Ele possui duas características importantes para esse fim: é um gene conservado, ou seja, presente em todas as estirpes testadas e tem apenas uma cópia no genoma (Fegan & Prior, 2005; Roberts *et al.*, 1988).

A árvore filogenética gerada pelo gene *egl* permitiu confirmar a separação em filotipos e o agrupamento dos isolados estudados no clado do filotipo II. Foi confirmada também a separação do filotipo II em dois subclados maiores, IIA e IIB, como descrito por Fegan & Prior (2005), em que o subclado IIA é formado de isolados de *R. solanacearum* patogênicos a solanáceas, *Musa* spp. e demais hospedeiros, enquanto o filotipo IIB englobava, principalmente, isolados da raça 3 patogênicos a batata e isolados de *R. solanacearum* da raça 2 causadores do moko da bananeira. Os resultados deste trabalho permitiram separar o filotipo II em mais um possível subclado, formado pelos isolados do filotipo IIA, sequevar 7, ICMP7963, CFBP2047 (=K60) e o isolado tipo N292. Esse resultado corrobora os estudos de Remenant *et al.* (2011) que consideram o isolado K60 uma espécie distinta das demais do filotipo IIA, propondo que o subclado a qual essa espécie pertence seja denominado filotipo IIA^T (Genin & Denny, 2012).

O agrupamento com 100% de probabilidade *posteriori* do isolado IBSBF 624 ao isolado de referência CIP240 de batata de origem brasileira, já definido como sequevar 26 (Cellier & Prior, 2010), permitiu classificar o isolado IBSBF 624 no mesmo sequevar do filotipo IIB. Estudos anteriores demonstraram que o isolado IBSBF 624 pertence a R3/ bv 2T (Rodrigues, 2010).

A murcha-de-Ralstonia no Brasil foi relatada inicialmente em 1980 no estado de Minas Gerais (Sudo *et al.*, 1983). Posteriormente, a doença foi descrita no Pará e na Bahia (Robbs *et al.*, 1988; Dianese & Takatsu, 1985) e mais recentemente no Espírito Santo, Maranhão (Alfenas *et al.*, 2006), Santa Catarina (Auer *et al.*, 2008) e em Goiás (Marques *et al.*, 2009). Com a exceção do isolado descrito por Marques *et al.* (2009) que descreveram a R3/bv2 como agente etiológico, todas as demais ocorrências da doença foram relacionadas ao bv1. Esses resultados estão de acordo com a classificação desses isolados no filotipo II, realizado neste trabalho, pois segundo Fegan & Prior (2005) o filotipo II equivale às estirpes pertencentes às bv 1, 2 e 2T.

O padrão de ramificação da árvore filogenética mostrou que dos 18 isolados de *R. solanacearum* obtidos de eucalipto que se agruparam no subclado IIA, 15 (AMC22, UFV12, UFV13, UFV18, UFV20, UFV31, UFV34, UFV48, UFV55, UFV60, IBSBF625, IBSBF638, IBSBF2131, IBSBF2568 e IBSBF2576) não se agruparam a clados de sequevares já definidos anteriormente. Dentre esses, os isolados AMC22, IBSBF2568 e IBSBF2576 agruparam-se em um clado único, sustentado por um ramo com 89% de probabilidade *posteriori*, segundo Análise Bayesiana. O mesmo ocorreu para os isolados UFV18 e UFV20, que se agruparam em um clado com 78% de probabilidade *posteriori*, enquanto os demais isolados formaram clados individuais. A classificação da maior parte dos isolados em sequevares ainda não descritos é de certa forma esperado, visto a carência de estudos com isolados brasileiros de *R. solanacearum* e, principalmente, oriundos de eucalipto.

Os isolados UFV7, AMC76 e UFV32 agruparam-se em sequevares já descritos. Os isolados UFV7 e AMC76 agruparam-se no clado contendo o isolado de tomateiro CMR39, oriundo de Camarões, classificado como sequevar 41, com 100% de probabilidade *posteriori*. O isolado UFV32 agrupou-se no clado do sequevar 37, representado pelo isolado RF38, de Trindade, com 88% de probabilidade. Dado ao aumento gradativo de movimentação de materiais propagativo entre os continentes espera-se haver mais desse tipo de situação com isolados de determinada origem geográfica infectando hospedeiros em outras regiões do mundo.

Segundo a classificação definida por Fegan & Prior (2005) aos clados de sequências individuais não tem sido concedido o estatuto de sequevar. Somente no

caso de dois ou mais isolados sequenciados terem sequências similares pode-se haver a definição de um sequevar. Portanto, os isolados AMC22, IBSBF2568 e IBSBF2576 formam um novo grupo genético, assim como os isolados UFV18 e UFV20, compondo dois novos sequevares ainda não definidos. A análise de outras regiões do genoma, como do gene *hrpB* (Poussier *et al*, 2000) e de um maior número de isolados oriundos de eucalipto podem aumentar a consistência dos dados apresentados neste trabalho.

A nova classificação de *R. solanacearum*, baseada em análises moleculares, proposta por Fegan & Prior (2005) mostrou-se simples, rápida e funcional, principalmente, quanto a separação em filotipo. Já a classificação em sequevar, apesar de demandar mais tempo, mostrou ser também eficaz. À medida que novos estudos forem sendo realizados, utilizando essa nova abordagem, em diferentes países, haverá uma melhor compreensão sobre a taxonomia de *R. solanacearum*. É provável que esses estudos culminem na divisão de *R. solanacearum* em novas espécies, como proposto, por Remenant *et al.* (2011). De acordo com esses autores, apenas isolados pertencentes aos filotipos IIA, IIA^T e IIB continuariam em *R. solanacearum*. Já os isolados do filotipo I e III formariam uma nova espécie, denominada *R. sequeirae*, enquanto os isolados do filotipo IV passariam para *R. haywardii*. Entretanto estudos de patogenicidade em distintas linhagens ainda precisam ser realizados, sobretudo na perspectiva do pós-genômica, para melhor compreender a especiação bacteriana no complexo *R. solanacearum* (Cellier & Prior, 2010).

A análise dos fragmentos obtidos por ERIC-PCR permitiu separar os isolados em cinco grupos maiores, denominados A, B, C, D e E. O grupo A envolve os isolados obtidos de eucalipto do sul do Brasil, IBSBF2568 e IBSBF2576, com 70% de similaridade entres eles. O grupo C contém apenas o isolado IBSBF638 obtido de eucalipto e próximo a ele o isolado de referência do filotipo I, GMI1000. Assim como o C, o grupo D contém também apenas um isolado de *R. solanacearum* de eucalipto, o IBSBF625, e próximo a ele, o isolado de referência do filotipo IV, UW443. No entanto, esses clados apresentaram similaridades menores que 40%. O grupo E engloba o isolado do filotipo IIB, IBSBF624 e próximo a ele o isolado tipo IBSBF292, sendo que apesar do isolado IBSBF624 ser originário do Pará, este não se agrupou ao isolado IBSBF638, de mesma origem, confirmando a divergência

encontrada na análise com o gene *egl*. O isolado UW386 foi o mais divergente dos demais, não se agrupando com nenhum dos isolados estudados, o que era esperado, visto pertencer ao filotipo III, de origem africana.

O grupo B englobou a maioria dos isolados obtidos de eucalipto. Dentro desse grupo, os isolados UFV48 UFV55 e UFV60 apresentaram 100% de similaridade entre eles, indicando tratar-se de uma mesma linhagem clonal. Outra evidência que suporta essa hipótese é a mesma origem geográfica dos três isolados, provenientes da Bahia (Alfenas *et al.*, 2006). A confirmação de que esses isolados são uma mesma linhagem clonal pode ser obtida ao se comparar os perfis moleculares desses isolados, utilizando-se outras técnicas, como REP-PCR e BOX-PCR. Outro isolado próximo a esses e também procedente do estado da Bahia, o UFV32, possui 66,7% de similaridade com os três isolados. Por outro lado, o isolado UFV7, também coletado nesse estado, não se agrupa com eles, sugerindo existência de variabilidade genética na população nessa região. Ainda no grupo B, os isolados de Minas Gerais, UFV13, UFV31 e IBSBF2131 agruparam-se em um clado com 61,6% de similaridade, sendo que os isolados UFV13 e UFV31 apresentaram similaridade de quase 95% entre eles. Já os isolados provenientes do estado do Espírito Santo, UFV18 e UFV20 agruparam-se com 80% de similaridade. Os isolados da região norte do Brasil (AMC) se encontram em um clado com 57% de similaridade e ainda se agrupam com o isolado UFV12, proveniente do estado do Maranhão, podendo-se notar maior similaridade entre isolados de regiões próximas, como é caso dos isolados do Espírito Santo se agrupando ao clado dos isolados de origem baiana.

A comparação entre os padrões de fragmentos dos DNAs genômicos amplificados pelo marcador ERIC indicou grande diversidade genética entre os isolados avaliados neste trabalho. Havendo, em geral, uma alta correlação entre a origem geográfica dos isolados e a similaridade entre eles. A ampla diversidade genética populacional de *R. solanacearum* em eucalipto obtida neste estudo constitui um dos principais desafios no desenvolvimento de estratégias de controle da doença e deve ser considerada durante o melhoramento genético do eucalipto. Estudos acerca da agressividade desses isolados frente a diferentes espécies e clones de eucalipto deverão ser realizados. Esse conhecimento, associado às análises

taxonômicas e de diversidade realizadas neste trabalho, poderão contribuir para a melhor compreensão e manejo da doença no Brasil.

REFERÊNCIAS

- Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA (2006) *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31:357-366.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e doenças do eucalipto. 2ª Ed. Editora UFV. Viçosa, MG. 500 p.
- Auer CG, Santos AF, Rodrigues Neto J (2008) Ocorrência de murcha bacteriana em plantios de *Eucalyptus grandis* no estado de Santa Catarina. *Resumos Tropical Plant Pathology* 33:370.
- Buddenhagen IW, Sequeira L, Kelman A (1962) Designations of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726 (abstract).
- Cellier G, Prior P (2010) Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology* 100(11):1250–1261.
- Cook D, Barlow E, Sequeira L (1989) Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant Microbe Interactions* 2:113-121.
- Cook D, Sequeira L (1994) Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: Hayward AC, Hartman GL (Eds.) Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford. CAB International. p. 77-93.
- Dianese JC, Takatsu A (1985) *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. *Resumos Fitopatologia Brasileira* 10:362.
- Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297-302.
- Euzéby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. France, 2009. Available at: <http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>. Accessed on June 6, 2012.
- Fegan M, Prior P (2006) Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Australasian Plant Pathology* 35:93–101.
- Fegan M, Prior P (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (Eds.) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS. St. Paul. p. 449-461.
- Fegan M, Taghavi M, Sly LI, Hayward AC (1998) Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (Eds.) Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. INRA Editions. Paris. p. 19–23.

- Genin S, Denny TP (2012) Pathogenomics of the *Ralstonia Solanacearum* Species Complex. Annual Review of Phytopathology 50:4.1–4.23
- Gillings MR, Fahy P (1994) Genomic Fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In: Hayward AC, Hartman GL (Eds.) Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford. CAB International. p. 95-112.
- Hayward AC (1994) The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward AC, Hartman GL (Eds.) Bacterial wilt – The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford: CAB International. p. 9-24.
- Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87.
- Hayward AC (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27:265-277.
- He LY, Sequeira L, Kelman A (1983) Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disease 67:1357-1361.
- Kado EI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976.
- Ji P, Allen C, Sanchez-Perez A, Yao J, Elphinstone JG, Jones JB, Momol MT (2007) New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. Plant Disease 91:195–203.
- Lebeau A, Daunay MC, Frary A, Palloix A, Wang JF, Dintinger J, Chiroleu F, Wicker E, Prior P (2011) Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: Genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. Phytopathology 101:154–165.
- Marques E, Rezende DV, Uesugi CH (2009) Primeiro relato da biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* em eucalipto no Brasil. Tropical Plant Pathology 34 (Supl.):12.
- Nylander JAA (2004) MrModeltest Version 2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Opina N, Tavner F, Holloway G, Wang J-F, Li TH, Maghirang R, Fegan M, Hayward AC, Krishnapillai V, Hong WF, Holloway BW, Timmis JN (1997) A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 5:19– 33.
- Poussier S, Trigalet-Demery D, Vanderwalle P, Goffinet B, Luisetti J, Trigalet A (2000) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. Microbiology 146:1679–1692.
- Poussier S, Vandewalle P, Luisetti J (1999) 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 65(5):2184-2194.

- Rambaut A, Drummond A J (2007). Tracer v1.4. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Remenant B, De Cambiaire JC, Cellier G, Jacobs JM, Mangenot S (2011) *Ralstonia syzygii*, the blood disease bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. PLoS ONE 6:e24356.
- Robbs CF, Cruz AP, Rodrigues Neto J (1988) Algumas estratégias do controle a murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. Jaguariúna, SP. Comunicado Técnico. n° 3. 4p.
- Roberts DP, Denny TP, Schell MA (1988) Cloning of the egl gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. Journal of Bacteriology 170:1445–1451.
- Rodrigues LMR (2010) Avaliação da agressividade e caracterização genética de linhagens de *Ralstonia solanacearum* isoladas de diferentes plantas hospedeiras. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, SP, Brasil.
- Romeiro RS (2001) Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: Romeiro RS (Ed.) Métodos em Bacteriologia de Plantas. Viçosa. Editora UFV. p. 87-96.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes Version 3.1.2: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19:1572-1574.
- Santana BG, Lopes CA, Alvarez E, Barreto CC, Allen C, Quirino BF (2012) Diversity of Brazilian biovar 2 strains of *Ralstonia solanacearum*. Journal of General Plant Pathology 78:190–200.
- Seal SE, Jackson LA, Daniels MJ (1992) Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. Applied and Environmental Microbiology 58:3759–3761.
- Siri MI, Sanabria A, Pianzola MJ (2011) Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. Plant Disease 95:1292–1301.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3ªEd. 373p.
- Sudo S, Oliveira GHN, Pereira AC (1983) Eucalipto (*Eucalyptus* sp) e Bracatinga (*Mimosa escabrela*), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. Fitopatologia Brasileira 8:631.
- Taghavi M, Hayward AC, Sly L, Fegan M (1996) Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 46:10–15.
- Tamura K, Dudley J, Nei ME, Kumar S (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.

- Thompson JD, Higgins D, Gibson TJ (1992) CLUSTAL version W: a novel multiple sequence alignment program. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680
- Versalovic J, Scheneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerprint of bacterial using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5:25-40.
- Villa JE, Tsuchiya K, Horita M, Natural M, Opina N, Hyakumachi M (2005) Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and hrpB gene sequences. *Journal of General Plant Pathology* 71:39–46.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genu, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 36:1251 – 1275.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 39:897-904.
- Xu J, Pan ZC, Prior P, Xu JS, Zhang Z, Zhang H, Zhang LQ, He LY, Feng J (2009) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European Journal of Plant Pathology* 125:641–653.
- Xue Q, Yin Y, Yang W, Heuer H, Prior P, Guo JH, Smalla K (2011) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China assessed by PCR-based fingerprints to unravel host plant- and site-dependent distribution patterns. *FEMS Microbiology Ecology* 75:507–519.

ANEXOS

Anexo 1. Relação das sequências parciais do gene da endoglucanase (*egl*) de *Ralstonia solanacearum* obtidas a partir do banco de dados GenBank e utilizadas na análise filogenética

Filotipo	Sequevar	Isolado	Acesso GenBank	Local	Hospedeiro
IIA	6	GMI8044	GU295013	Granada	<i>Musa</i> sp.
IIA	6	UW181	GU295053	Venezuela	<i>Musa</i> sp.
IIA	6	A3909	EF371812	Havaí	<i>Heliconia rostrata</i>
IIA	7	CFBP2047	AF295262	USA	<i>Solanum lycopersicum</i>
IIA	7	ICMP7963	AF295263	Quênia	<i>Solanum tuberosum</i>
IIA	24	B34	GQ907154	Brasil	<i>Musa</i> sp.
IIA	35	CFBP2972	EF371809	Martinica	<i>S. tuberosum</i>
IIA	36	CFBP2957	EF371807	Martinica	<i>S. lycopersicum</i>
IIA	37	RF38	JF702309	Trindade	<i>S. lycopersicum</i>
IIA	38	CIP120	GQ907152	Peru	<i>S. tuberosum</i>
IIA	39	CFBP2958	AF295266	Guadalupe	<i>S. lycopersicum</i>
IIA	40	CIP239	AF295269	Brasil	<i>S. tuberosum</i>
IIA	41	CMR39	EF439726	Camarões	<i>S. lycopersicum</i>
IIA	50	T1-UY	GU295049	Uruguai	<i>S. lycopersicum</i>
IIA	52	CMR121	EF439725	Camarões	<i>S. lycopersicum</i>
IIIB	1	IPO1609	EF371814	Holanda	<i>S. tuberosum</i>
IIIB	1	JT516	AF295258	Reunion	<i>S. tuberosum</i>
IIIB	1	CMR34	EF439750	Camarões	<i>S. lycopersicum</i>
IIIB	2	CIP232	EF647734	Chile	<i>S. tuberosum</i>
IIIB	3	CIP418	GU295005	Indonésia	<i>Arachis hypogaea</i>
IIIB	3	MOLK2	EF371841	Filipinas	<i>Musa</i> sp.
IIIB	4	UW163	GU295052	Peru	<i>Musa</i> sp.
IIIB	25	CIP10	AF295260	Peru	<i>S. tuberosum</i>
IIIB	26	CIP240	EF647739	Brasil	<i>S. tuberosum</i>
IIIB	28	NCPBP398 7	AF295261	Brasil	<i>S. tuberosum</i>
IIIB	4NPB	CFBP6784	EF371813	Martinica	<i>Anthurium andreanum</i>
IIIB	4NPB	CFBP6783	EF371817	Martinica	<i>Heliconia caribea</i>
IIIB	4NPB	CIR0208	EF371819	Martinica	<i>A. andreanum</i>
I	13	CMR134	EF439740	Camarões	<i>Vaccinium membranaceum</i>
I	18	GMI1000	AF295251	Guiana Francesa	<i>S. lycopersicum</i>
I	45	CIP365	GQ907151	Filipinas	<i>S. tuberosum</i>
III	19	JT525	AF295272	Reunion	<i>Perlagonium asperum</i>
III	20	J25	AF295279	Quênia	<i>S. tuberosum</i>
III	29	CMR15	EF439743	Camarões	<i>S. lycopersicum</i>
IV	10	PSI07	EF371804	Indonésia	<i>S. lycopersicum</i>
IV	8	ACH732	GQ907150	Austrália	<i>S. lycopersicum</i>

ARTIGO 2 - Método de inoculação e avaliação de resistência de clones de *Eucalyptus* spp. à murcha-de-Ralstonia causada por *Ralstonia solanacearum*.

Natália R. Fonseca¹, Lúcio M. da S. Guimarães¹, Ramon U. Teixeira¹, Pollyane S. Hermenegildo¹, Leonardo S. S. Oliveira¹, Carlos A. Lopes² & Acelino C. Alfenas¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ²Embrapa Hortaliças, Caixa Postal 218, 70359-970, Brasília, Distrito Federal, Brasil. aalfenas@ufv.br

RESUMO

A variabilidade quanto à intensidade da murcha-de-Ralstonia, causada por *Ralstonia solanacearum*, no campo em diferentes espécies, procedências ou clones indica que seu controle pode ser realizado mediante plantio de materiais resistentes, selecionados por inoculação artificial sob condições controladas para evitar a seleção de plantas suscetíveis, escapes à infecção. No entanto, é fundamental dispor de um protocolo de inoculação eficaz, objeto deste trabalho. Foram avaliados três métodos de inoculação: (i) infestação do solo com suspensão bacteriana, (ii) imersão de raízes seccionadas em suspensão bacteriana e (iii) injeção de suspensão bacteriana na base do caule. O método de inoculação por injeção de suspensão bacteriana na base do caule destacou-se como o mais eficiente para inoculações de *R. solanacearum* em eucalipto, podendo-se diferenciar clones resistentes dos suscetíveis em um período de avaliação de 30 dias. Em seguida utilizou-se o método de inoculação escolhido para a seleção de clones de *Eucalyptus* spp. resistentes à doença. De 21 clones avaliados, quatro foram resistentes por não apresentarem nenhuma planta com sintomas de murcha e exsudação de pus bacteriano até 30 após a inoculação. Outros quatro clones apesar de também não apresentarem sintomas de murcha, apresentaram exsudação bacteriana em pelo menos uma das plantas inoculadas, sendo considerados suscetíveis. Os demais clones foram considerados altamente suscetíveis por apresentarem plantas com sintomas de murcha e exsudação de pus.

INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas, os plantios de eucalipto têm sido principalmente clonais, devido à uniformidade da matéria-prima e possibilidade de multiplicação dos genótipos resistentes e mais produtivos (Fonseca *et al.*, 2010). No sistema atual de produção de mudas clonais de eucalipto, a coleta intensiva de brotações para estaquia e a realização de podas drásticas em minicepas induzem a morte de raízes, o que resulta na sua debilitação fisiológica e, por consequência, favorece a infecção de patógenos em cepas clonais (Alfenas *et al.*, 2006). Dentre esses, destaca-se *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) comb. nov. Yabuuchi *et al.* (1995), agente etiológico da murcha-de-Ralstonia.

A murcha-de-Ralstonia foi relatada, pela primeira vez em eucalipto, no início da década de 1980 em Minas Gerais (Sudo *et al.*, 1983). Posteriormente, a doença foi constatada na Bahia (Dianese & Takatsu, 1985), no Pará (Robbs *et al.*, 1988), Espírito Santo, Maranhão (Alfenas *et al.*, 2009), em Santa Catarina (Auer *et al.*, 2008) e Goiás (Marques *et al.*, 2009). Em 2005, a murcha-de-Ralstonia, provocou elevadas perdas em diversos viveiros clonais de eucalipto do Brasil, totalizando um prejuízo estimado em, no mínimo, R\$ 49 milhões (= US\$ 27 milhões) (Alfenas *et al.*, 2009). Além do Brasil, a doença foi relatada na China (Wu & Liang, 1988a), Taiwan (Wang, 1992), Austrália (Askiew *et al.*, 1994), Venezuela (Ciesla *et al.*, 1996), Tailândia (Pongpanich, 2000) e Vietnã (Thu *et al.*, 2000). Na África, a doença já foi detectada em plantios de eucalipto na África do Sul (Coutinho *et al.*, 2000), Uganda (Roux *et al.*, 2001), e República Democrática do Congo (Fouché-Weich *et al.*, 2006).

Em minijardim clonal, a doença caracteriza-se por necrose foliar, escurecimento anelar ou completo do lenho, murcha e morte de minicepas. Os sintomas na parte aérea são similares à morte gradual de minicepas submetidas a podas drásticas ou com sistema radicular malformado. Na fase de enraizamento, miniestacas infectadas podem apresentar arroxamento das nervuras do limbo foliar e podridão. No campo, a doença caracteriza-se por bronzeamento, murcha, necrose foliar, desfolha basal ascendente, escurecimento interno do lenho e morte da planta, geralmente a partir do quarto mês após o plantio (Alfenas *et al.*, 2006). Plantações de eucalipto são mais suscetíveis à murcha-de-Ralstonia nos primeiros dois anos de idade (Ran *et al.* 2005a, b). No passado, a incidência de *R. solanacearum* no campo

era observada principalmente nos primeiros plantios de eucalipto realizados em áreas recém desmatadas (Dianese, 1986) sendo que a infecção pode ser latente de modo que a doença somente se expresse sob condições de ambiente favoráveis e, ou em plantas debilitadas fisiologicamente (Ferreira, 1997; Hayward, 1991). Atualmente, a doença tem sido observada em áreas antes usadas para pastagem ou eucalipto (Alfenas, A.C., informação pessoal).

A variação do nível de resistência entre procedências de *Eucalyptus* spp. foi observada inicialmente em condições de campo (Wu & Liang, 1988; Dianese *et al.*, 1990). Estudos prévios para desenvolver métodos de inoculação artificial de *R. solanacearum* em eucalipto (Dianese & Takatsu, 1985; Cruz & Dianese, 1986; Dianese *et al.*, 1990; Dianese & Dristig, 1993; Coutinho *et al.*, 2000) raramente permitiram a reprodução dos sintomas da doença. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de inoculação e avaliação da resistência de *Eucalyptus* spp. à murcha-de-Ralstonia causada por *R. solanacearum* em condições controladas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Métodos de inoculação

Visando a identificação do melhor método de inoculação de *R. solanacearum* em eucalipto foram avaliados três métodos: (i) infestação do solo com suspensão bacteriana, (ii) imersão das raízes em suspensão bacteriana e (iii) injeção de suspensão bacteriana na base do caule. Em todos os ensaios empregou-se o isolado UFV 32 de *R. solanacearum*, obtido de *E. grandis*, proveniente da região de Eunápolis, Bahia (Alfenas *et al.*, 2006), e caracterizado, previamente, como pertencente ao biovar 1, raça 1 (Oliveira *et al.*, 2007) e Fílotipo IIA (Cap. 1).

Para avaliação da eficácia do método, utilizaram-se 18 plantas do clone 1183 (*E. urophylla*), que em ensaios preliminares mostrou-se suscetível a *R. solanacearum* (dados não mostrados). Com a exceção do método de imersão das raízes, mudas com 90 dias de idade, foram transplantadas para vasos de 2 L de capacidade, contendo substrato MecPlant[®] complementado com 6 Kg m⁻³ de superfosfato simples e 3 Kg m⁻³ de Osmocote[®] (19-6-10) e inoculadas 20 dias após o transplântio. Como comparador suscetível utilizou-se o tomate cv. Moneymarker (*Solanum lycopersicum*).

Método 1: Infestação do solo com *R. solanacearum*

Antes das inoculações, colônias do isolado UFV 32 foram semeadas em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo o meio de Kelman (1954) e em seguida incubadas a 28 °C. Após 48 h, colônias lisas, fluidas, de bordos brancos e centro vermelho foram transferidas para novas placas de Petri contendo o meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) e incubadas por 24 h a 28 °C. Após incubação, adicionou-se uma solução de cloreto de sódio [NaCl 0,85% (p/v)] às placas de Petri e as colônias bacterianas foram removidas do meio por raspagem com alça de Drigalski. A concentração de inóculo na suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotometria ($A_{540} = 1,0$; aproximadamente 1×10^9 UFC mL⁻¹) (Marques, 2012). Para infestação do solo foram adicionados 100 mL da suspensão bacteriana ao redor do coleto de cada planta. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 28 °C com fotoperíodo de 12 h com intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mole s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Método 2: Imersão de raízes seccionadas em suspensão bacteriana

Foi utilizada uma suspensão bacteriana preparada como descrito no Método 1. Com o auxílio de uma tesoura foi cortado 1/3 do sistema radicular das mudas de eucalipto antes do transplântio, seguindo-se da imersão das raízes na suspensão bacteriana por 10 min. Após a imersão, as plantas foram transplantadas para vasos de 2 L. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 28 °C com fotoperíodo de 12 h com intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mole s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Método 3: Injeção de suspensão bacteriana na base do caule

Foi utilizada uma suspensão bacteriana preparada como descrito no Método 1. Com o auxílio de um bisturi, foi feito um corte superficial longitudinal de, aproximadamente, 1 cm de comprimento, no caule das plantas a cerca de 3 cm acima do coleto. Em seguida, foi colocado abaixo do corte um pedaço de algodão umedecido em água estéril envolto no caule, para evitar a perda de inóculo, e depositados 0,5 mL da suspensão bacteriana no ferimento. Após a inoculação, o ferimento, assim como o algodão, foi coberto com filme de PVC para evitar contaminação com outros fitopatógenos, além de proporcionar uma câmara úmida. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 28 °C com fotoperíodo de 12 h com intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mole s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Delineamento experimental

Para cada método testado utilizaram-se seis mudas clonais em delineamento de inteiramente casualizado, sendo cinco inoculadas e uma planta como testemunha. Na testemunha, utilizou-se solução de cloreto de sódio [NaCl 0,85% (p/v)] no lugar da suspensão bacteriana, para cada metodologia testada. O experimento foi repetido uma vez no tempo.

Avaliação

As plantas foram avaliadas diariamente quanto aos sintomas de murcha e, aos 30 dias após a inoculação, quanto à incidência da doença e exsudação bacteriana. Para avaliação de exsudação bacteriana, cinco fragmentos de tecido do caule, retirados cerca 2 cm acima ao ponto de inoculação, foram depositados em lâmina

microscópica contendo uma gota de água e analisados em microscópio de luz a 100X.

2. Resistência de clones de *Eucalyptus* spp. à murcha-de-Ralstonia

Avaliou-se a resistência à murcha-de-Ralstonia em 21 clones comerciais de *Eucalyptus* spp., sendo inoculadas 5 mudas de cada clone. Anteriormente à inoculação, mudas com 90 dias de idade, de cada clone, foram transplantadas para vasos de 2 L de capacidade, contendo substrato MecPlant[®] complementado com 6 Kg m⁻³ de fosfato supersimples e 3 Kg m⁻³ de Osmocote[®] (19-6-10) e inoculadas 20 dias após o transplântio.

Inoculação e delineamento experimental

O método de inoculação foi o mesmo descrito no Método 3, item 1, inclusive o isolado e a forma de preparo de inóculo. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 h a 40 micromoles de fótons s⁻¹ m⁻². O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com cinco plantas (réplicas) inoculadas por clone e uma planta utilizada como testemunha. Para a testemunha foi empregada solução de cloreto de sódio [NaCl 0,85% (p/v)] no lugar da suspensão bacteriana.

Avaliação

As plantas foram avaliadas 30 dias após a inoculação quanto à ocorrência de sintomas de murcha e exsudação de pus bacteriano em copo e em gota d'água. Para avaliação de exsudação bacteriana, cinco fragmentos de tecido do caule, retirados cerca 2 cm acima ao ponto de inoculação, foram depositados em lâmina microscópica contendo uma gota de água e analisados em microscópio de luz a 100X. Foram considerados resistentes os clones que não apresentaram sintomas e sinais da doença até 30 dias após a inoculação. Considerou-se suscetível o clone que apresentou, em pelo menos uma das réplicas inoculadas, exsudação bacteriana. Os clones que apresentaram exsudação acompanhada de sintomas de murcha foram classificados como altamente suscetíveis.

RESULTADOS

1. Métodos de inoculação

Dentre os métodos de inoculação testados, o método de “injeção de suspensão bacteriana na base do caule” foi o único que induziu sintoma de murcha, característico da doença nas mudas inoculadas do clone 1183 (Tabela 1). Além do sintoma de murcha, seguido de morte, observou-se a exsudação de pus bacteriano em gota d’água em todas as cinco réplicas inoculadas. Nas plantas testemunhas, em que se utilizou água em vez do inóculo, não se observou sintomas ou sinais para os três métodos avaliados. Já as plantas de tomate, utilizadas como comparador suscetível apresentaram sintomas de murcha para todos os métodos avaliados.

2. Resistência de clones de *Eucalyptus* spp. à murcha-de-Ralstonia

Dos 21 clones avaliados, quatro (JAC301, TLS022, TLS504 e 34039) foram considerados resistentes por não apresentarem plantas com sintomas de murcha e exsudação de pus bacteriano. Os clones JAC468, JAC709, JAC267 e JAC452 não apresentaram sintomas de murcha, no entanto, apresentaram exsudação bacteriana em pelo menos uma das plantas inoculadas, sendo considerados suscetíveis. Os demais clones foram considerados altamente suscetíveis por apresentarem plantas inoculadas com sintomas de murcha e exsudação de pus (Tabela 2).

Tabela 1. Avaliação dos métodos de inoculação de *Ralstonia solanacearum* no clone 1183 (*Eucalyptus urophylla*) quanto à ocorrência de sintomas e sinais da doença, 30 dias após a inoculação.

Método de inoculação	Repetição	Murcha ¹⁾	Exsudação ¹⁾
Método 1 Infestação do solo com suspensão bacteriana	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
	C- ²⁾	-	-
	C+ ³⁾	+	+
Método 2 Imersão de raízes seccionadas em suspensão bacteriana	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
	C-	-	-
	C+	+	+
Método 3 Injeção de suspensão bacteriana na base do caule	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
	5	+	+
	C-	-	-
	C+	+	+

¹⁾ (-) Ausência de sintomas e, ou sinais; (+) presença de sintomas e, ou sinais.

²⁾ C- : Testemunha - uma planta do clone 1183.

³⁾ C+ : Comparador suscetível - uma muda do tomate cv. Moneymaker (*Solanum lycopersicum*).

Tabela 2. Classificação dos clones de *Eucalyptus* spp. quanto à resistência à murcha-de-Ralstonia, inoculados com o isolado UFV32 de *Ralstonia solanacearum*, baseada na ocorrência de sintomas e, ou sinais, até 30 dias após a inoculação.

Clone	Espécie	N° de plantas com sintomas e, ou sinais/ N° de plantas inoculadas		Fenótipo
		Murcha	Exsudação	
JAC301	<i>Eucalyptus</i> spp.	0/5	0/5	Resistente
TLS022	<i>Eucalyptus</i> spp.	0/5	0/5	Resistente
TLS504	<i>Eucalyptus</i> spp.	0/5	0/5	Resistente
34039	<i>E. saligna</i>	1/5	0/5	Resistente
JAC468	<i>Eucalyptus</i> spp.	0/5	1/5	Suscetível
JAC709	<i>Eucalyptus</i> spp.	0/5	1/5	Suscetível
JAC267	<i>Eucalyptus</i> spp.	0/5	1/5	Suscetível
JAC452	<i>Eucalyptus</i> spp.	0/5	4/5	Suscetível
32864	<i>E. saligna</i>	5/5	3/5	Altamente Suscetível
TLS524	<i>Eucalyptus</i> spp.	4/5	4/5	Altamente Suscetível
JAC443	<i>Eucalyptus</i> spp.	3/5	5/5	Altamente Suscetível
TLS479	<i>Eucalyptus</i> spp.	3/5	5/5	Altamente Suscetível
TLS880	<i>Eucalyptus</i> spp.	3/5	5/5	Altamente Suscetível
35878	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	3/5	5/5	Altamente Suscetível
40165	<i>E. dunnii</i>	5/5	5/5	Altamente Suscetível
37355	<i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i>	5/5	5/5	Altamente Suscetível
37254	<i>E. urophylla</i> x <i>E. globulus</i>	5/5	5/5	Altamente Suscetível
37350	<i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i>	5/5	5/5	Altamente Suscetível
37036	<i>E. urophylla</i> x <i>E. dunnii</i>	5/5	5/5	Altamente Suscetível
K1005	<i>E. dunnii</i>	5/5	5/5	Altamente Suscetível
K18	<i>E. dunnii</i>	5/5	5/5	Altamente Suscetível

DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que a injeção de suspensão bacteriana na base do caule foi o método mais favorável à infecção. Apesar de ser relativamente drástico, foi o único método que induziu a murcha das plantas, até 30 dias após a inoculação. Também foi o único em que se observou exsudação bacteriana no caule das mudas inoculadas. Apesar de *R. solanacearum* ser uma bactéria habitante do solo, com penetração tipicamente via ferimentos, o método de infestação do solo e o método de imersão de raízes seccionadas em suspensão bacteriana não induziram sintomas de murcha no período de avaliação proposto (30 dai) nas plantas de eucalipto. Provavelmente, isso foi devido ao curto espaço de tempo em que as plantas foram avaliadas. Trabalhos futuros poderão determinar se com o aumento no período de avaliação haveria a expressão de sintomas e, ou sinais da murcha-de-Ralstonia. No entanto, para a avaliação de resistência é importante que o método de inoculação empregado forneça resultados rápidos, como os que foram obtidos com o método de injeção de inóculo na base do caule.

Dentre o sintoma e sinal utilizados para avaliação das plantas inoculadas quanto à resistência à murcha-de-Ralstonia, a exsudação de pus é a mais indicada, sendo que o sintoma de murcha, apesar de mais simples e rápido, não é um indicativo seguro. A murcha pode ocorrer devido a outros fatores como, infecção da planta com outros patógenos no momento da inoculação e, ou à debilitação fisiológica da planta à alta temperatura. Neste trabalho os clones que não apresentaram exsudação de pus foram considerados resistentes à doença. De acordo com esse critério, quatro dos 21 clones avaliados foram resistentes. O clone 34039 apesar de apresentar uma das plantas inoculadas com sintoma de murcha, não apresentou exsudação bacteriana, sendo considerado resistente à doença e a murcha atribuída à debilitação fisiológica da planta à alta temperatura da câmara de crescimento. Os demais clones foram classificados em suscetíveis ou altamente suscetíveis, de acordo com o critério de classificação adotado.

A discrepância de parte dos resultados entre as réplicas de um mesmo clone pode ser explicada pelo fato de que, durante a inoculação, parte da suspensão bacteriana não penetra no caule, e dessa forma pode haver uma quantidade menor de inóculo em certas plantas, o que pode causar variação dos sintomas observados. Esse

fato pode ser contornado com a reinoculação do clone em questão utilizando um número maior de réplicas ou com a inoculação de colônias bacterianas diretamente da placa de Petri com meio de cultura sólido. Um segundo fator seria a ocorrência de mistura clonal entre as réplicas do clone avaliado.

Espécies de *Eucalyptus* diferem quanto à resposta da planta à infecção de *R. solanacearum* ao nível de espécie, da procedência e do clone avaliado (Dianese & Takatsu, 1985; Cruz & Dianese, 1986; Dianese *et al.*, 1990). Na China as espécies mais suscetíveis à murcha-de-Ralstonia são *E. tereticornis*, *E. urophylla* e *E. camaldulensis* (Wu & Liang, 1988). Além disso, Ciesla *et al.* (1996) citaram *E. grandis*, *E. pellita*, *E. saligna* e o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, como sendo suscetíveis à murcha-de-Ralstonia. Na África do Sul, a murcha só foi relatada em híbridos *E. grandis* x *E. camaldulensis* (Coutinho *et al.*, 2000). Wu & Liang (1988) indicam certas procedências de *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *Corymbia citriodora* e *E. exserta*, na China, como resistentes à infecção. Entretanto, devido à grande variabilidade da bactéria essa informação fica restrita ao país de origem.

No Brasil, onde se predomina o Filotipo IIA de *R. solanacearum* em eucalipto (Cap. 1), é fundamental que se iniciem ensaios em busca de fontes de resistência. Dianese *et al.* (1990) relatam procedências de *E. pellita*, *E. tereticornis* e *E. deglupta* como resistentes à murcha-de-Ralstonia, em condições de campo. Posteriormente, Dianese & Dristig (1993) encontraram procedências de *E. camaldulensis*, *C. citriodora*, *E. cloeziana*, *E. deanei*, *E. pellita*, *E. resinifera*, *E. tereticornis*, *E. grandis* e *C. torelliana* resistentes à murcha-de-Ralstonia, comprovando a existência de variabilidade para resistência a doença em diversas espécies de eucalipto. Os resultados encontrados neste trabalho confirmam a existência de variabilidade para resistência à murcha-de-Ralstonia. Entretanto, faz-se necessário um estudo mais amplo, envolvendo diferentes espécies e procedências, assim como diferentes isolados bacterianos, para indicarmos qual a espécie/procedência é mais indicada como fonte de resistência à doença.

Apesar do método de inoculação por injeção da suspensão bacteriana permitir a identificação rápida de genótipos resistentes à murcha-de-Ralstonia, é importante ressaltar que os resultados são conclusivos para o isolado UFV32, escolhido devido à alta agressividade apresentada por ele em avaliações anteriores (dados não apresentados), não podendo o resultado de resistência ser generalizado a outros

isolados patogênicos a eucalipto, devido a grande variabilidade encontrada no complexo de espécies *R. solanacearum* (Cap. 1). Deste modo, justifica-se o estabelecimento de programas de melhoramento para resistência à murcha-de-Ralstonia específicos para cada região, levando em consideração os isolados prevalentes em cada local, como já indicado para a cultura da batata por Lopes & Giordano (1983) e Lopes *et al.* (2004).

REFERÊNCIAS

- Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA (2006) *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31:357-366.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e doenças do eucalipto. 2ª Ed. Editora UFV. Viçosa, MG. 500 p.
- Askiew E, Tevorow PR (1994) Management of bacterial wilt of tobacco. In: Hayward, AC, Hartman GL (Eds.) *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford UK. CAB International. p. 179-198.
- Auer CG, Santos AF, Rodrigues Neto J (2008) Ocorrência de murcha bacteriana em plantios de *Eucalyptus grandis* no estado de Santa Catarina. *Resumos Tropical Plant Pathology* 33:370.
- Ciesla WM, Diekmann M, Putter CA (1996) *Eucalyptus* spp. FAO/IPGRI. Technical Guide-lines for the safe movement of germplasm. FAO/IPGRI. Rome Italy. n. 17.
- Coutinho TA, Roux J, Riedel K-H, Terblanche J, Wingfield MJ (2000) First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. *Forest Pathology* 30:205-210.
- Cruz AP, Dianese JC (1986) Tolerância à murcha bacteriana em eucalipto. *Fitopatologia Brasileira* 11:396.
- Dianese JG (1986) Problemas patológicos das florestas plantadas do Vale do Rio Jari. *Fitopatologia brasileira* 11(2):274-275.
- Dianese JC, Takatsu A (1985) *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. *Resumos Fitopatologia Brasileira* 10:362.
- Dianese JC, Dristig MCG (1993) Screening *Eucalyptus* selections for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* In: Hartman GL, Hayward AC (Eds.) *Bacterial Wilt Proceedings of an International Conference*. Kaoshiung, Taiwan. 28-31 October 1992. *ACIAR Proceedings* 45:206-210.
- Dianese JC, Dristig MCG, Cruz AP (1990) Susceptibility to wilt associated with *Pseudomonas solanacearum* among six species of *Eucalyptus* growing in equatorial Brazil. *Australasian Plant Pathology* 19:71-76.
- Ferreira FA (1997) *Enfermidades do eucalipto no Brasil*. Informe Agropecuário. EPAMIG. Belo Horizonte, MG. v.18. n. 186.
- Fonseca SM, Resende MDV de, Alfenas AC, Guimarães LMS, Assis TF, Grattapaglia D. (2010) *Manual prático de melhoramento genético de eucalipto*. Editora UFV. Viçosa, MG. v.1. 200 p.

- Fouché-Weich J, Poussier S, Trigalet Demery D, Berger D, Coutinho T (2006) Molecular identification of some African strains of *Ralstonia solanacearum* from eucalypt and potato. *Journal of General Plant Pathology* 72:369–373.
- Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29:65-87.
- Kado EI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-976.
- Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Ralstonia solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693.
- Lopes CA, Giordano LB (1990) Avaliação da resistência de oito clones e três cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) à murcha bacteriana no Brasil, safra 1986/1987. *Horticultura Brasileira* 8:14-16.
- Lopes CA, Quezado-Duval AM, Furomoto O, Buso JA, Melo PE, Souza ZS, Duarte V, Lima Neto, AF (2004) Seleção de clones de batata para resistência a murcha bacteriana. *Batata show*. ano 4, n. 10.
- Marques E, Rezende DV, Uesugi CH (2009) Primeiro relato da biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* em eucalipto no Brasil. *Tropical Plant Pathology* 34 (Supl.):12.
- Marques E (2012) Murcha bacteriana do eucalipto causada por *Ralstonia solanacearum* raça 3, biovar 2T: etiologia, influência do solo e controle. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília. Brasília, DF, Brasil.
- Oliveira LSS, Alfnas AC, Guimarães LMS, Lau D (2007) Caracterização de biovar e raça de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de plantas de *Eucalyptus* spp. In: XL Congresso Brasileiro De Fitopatologia, 40. Maringá/PR. Anais do Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia 32:S272-S272.
- Pongpanich K (2000) Eucalyptus pathology in Thailand. In: *Eucalyptus disease and their management*. Kasetsart University Bangkok. ACIAR 9441 Final Report. p. 6-8.
- Ran LX, Li ZN, Wu GJ, Van Loon LC, Bakker P (2005a) Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *European Journal of Plant Pathology* 113:59–70.
- Ran L, Liu C, Wu G, Van Loon L, Bakker P (2005b) Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. *Biological Control* 32:111–120.
- Robbs CF, Cruz AP, Rodrigues Neto J (1988) Algumas estratégias do controle a murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. Jaguariúna, SP. Comunicado Técnico. n° 3. 4p.
- Roux J, Coutinho TA, Wingfield MJ, Byabashaija DM (2001) Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda. *South African Journal of Science* 97:16–18.

- Sudo S, Oliveira GHN, Pereira AC (1983) Eucalipto (*Eucalyptus* sp) e Bracatinga (*Mimosa escabrela*), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. Fitopatologia Brasileira 8:631.
- Thu PQ, Old KM, Dudzinski MJ, Gibbs RJ (2000) Results of eucalyptus disease surveys in Vietnam. In: eucalyptus diseases and their management. Kasetsart University Bangkok. ACIAR 9441 Final Report. p 6-8.
- Wang WY (1992) Survey of *Eucalyptus* disease in Taiwan. Bulletin Taiwan Forest Research Institute 7:179-194.
- Wu QP, Liang ZC (1988) Identification and pathogenic tests of the causal organism of the bacterial wilt of *Eucalyptus*. Journal South China Agriculture University. 9:59-67.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiology and Immunology 39:897-904.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

1. Os isolados de *R. solanacearum* obtidos de *Eucalyptus* spp. no Brasil, estudados neste trabalho, pertencem ao filotipo II;
2. Foram encontrados um isolado do subclado IIB e dezoito do IIA;
3. Os isolados UFV7 e AMC76 foram classificados como sequevar 41;
4. O isolado UFV32 agrupou-se no clado do sequevar 37, representado pelo isolado RF38, de Trindade, com 88% de probabilidade;
5. Os isolados AMC22, IBSBF2568 e IBSBF2576 formaram um novo grupo genético, assim como os isolados UFV18 e UFV20, compondo dois novos sequevares ainda não definidos;
6. Os isolados UFV12, UFV13, UFV31, UFV34, UFV48, UFV55, UFV60, IBSBF625, IBSBF638 e IBSBF2131 não se agruparam a clados de sequevares já definidos anteriormente e formaram clados individuais, não podendo, portanto, ser considerados sequevares;
7. A técnica de ERIC-PCR indicou grande diversidade genética entre os isolados de *R. solanacearum* infectando o eucalipto no Brasil, havendo, em geral, uma alta correlação entre a origem geográfica dos isolados e a porcentagem de similaridade entre eles;
8. O método de inoculação de injeção de suspensão bacteriana na base do caule destacou-se como o mais eficiente para inoculações de *R. solanacearum* em eucalipto;
9. Dos 21 clones avaliados, quatro foram classificados como resistentes por não apresentarem, até 30 dias após a inoculação, sintomas de murcha e exsudação bacteriana.