

ALESSANDRA DE LIMA GARCIA

Diversidade populacional de *Ralstonia solanacearum* em pimentão no estado de Pernambuco e controle da murcha bacteriana

**RECIFE-PE
2011**

ALESSANDRA DE LIMA GARCIA

Diversidade populacional de *Ralstonia solanacearum* em pimentão no estado de Pernambuco e controle da murcha bacteriana

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

**RECIFE-PE
2011**

Ficha catalográfica

G216d Garcia, Alessandra de Lima
Diversidade populacional de *Ralstonia solanacearum* em
pimentão no Estado de Pernambuco e controle de murcha
bacteriana / Alessandra de Lima Garcia. -- 2011.
96 f.: il.

Orientadora: Rosa de Lima Ramos Mariano.
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife,
2011.

Referências.

1. Caracterização bioquímica 2. Caracterização molecular
3. Caracterização da virulência 4. Diversidade genotípica
5. Kild-L 6. Controle da doença I. Mariano, Rosa de Lima
Ramos, orientadora II. Título

CDD 632.32

Diversidade populacional de *Ralstonia solanacearum* em pimentão no estado de Pernambuco e controle da murcha bacteriana

ALESSANDRA DE LIMA GARCIA

Comitê de orientação:

Profa. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE) - Orientadora

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE) - Co-orientadora

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE) - Co-orientador

**RECIFE-PE
2011**

Diversidade populacional de *Ralstonia solanacearum* em pimentão no estado de Pernambuco e controle da murcha bacteriana

ALESSANDRA DE LIMA GARCIA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 25/02/2011

ORIENTADOR:

Profa. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr. Ailton Reis (CNPQ/EMBRAPA)

Dr. Adriano Márcio Freire da Silva (UFRPE)

Dr. Breno de Oliveira Souza (UFRPE)

Dra. Andrea Cristina Baltar Barros (CETENE)

RECIFE – PE
Fevereiro, 2011

"Pois o Senhor é quem dá sabedoria; de sua boca procedem o conhecimento e o discernimento "

Provérbios 2:6

*Aos meus pais, Sidnei e Adalgiza, e
minhas irmãs, Paula e Ana Carolina,
pelo amor, carinho, incentivo e
confiança em todos os momentos de
minha vida.*

DEDICO

*Aos meus familiares, por todo apoio e
amor. Ao meu noivo Felipe, presente de
Deus em minha vida, por todo amor,
compreensão, incentivo e por estar
sempre ao meu lado.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, pelo sustento, pela força e direção que me concede todos os dias.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela formação oferecida através do curso de Doutorado em Fitopatologia.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados

À Profa. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano e à Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza, pelos ensinamentos, pelos incentivos, pelo apoio e amizade.

Aos amigos do laboratório de fitobacteriologia, Aldenir, André, Cristiane, Christianno, Emerson, Greecy, Ivanise, Janaína, Kátia, Liliane, Luydson, Marco Aurélio, Mirtis, Myrzânia, Wiliam e Williams, pelos momentos maravilhosos, pelo apoio, pela ajuda e amizade que levarei comigo pra sempre.

À amiga-irmã Waléria pelos anos de amizade, cuidado e carinho.

Aos companheiros e amigos do curso, em especial, Alba Valéria, Cintia, Clêidio, Francisco, Frank, Hailson, Leonardo, Luís Gustavo, Maria, Saulo e Thiago por todo carinho e amizade.

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

Ao Eng. Agrônomo Iramar Benigno Albert Jr. por compartilhar experiências que resultaram em um artigo.

Aos meus colegas e amigos da UNAERP pelo incentivo. E a todos os demais que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
SUMÁRIO	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
Capítulo I – Introdução Geral	14
Cultura do pimentão.....	15
Murcha bacteriana	16
Características do Patógeno.....	19
Controle da Murcha Bacteriana.....	24
Referências Bibliográficas.....	29
Capítulo II - DIVERSIDADE POPULACIONAL DE <i>Ralstonia solanacearum</i> EM PIMENTÃO NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL	41
Resumo	43
Abstract	44
Introdução	45
Material e métodos	46
Isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> e cultivo.....	47
Caracterização bioquímica dos isolados.....	47
Caracterização da virulência dos isolados.....	48
Caracterização molecular dos isolados.....	49
Diversidade genotípica.....	51
Análises estatísticas.....	52
Resultados	53
Caracterização bioquímica dos isolados.....	53
Caracterização da virulência dos isolados.....	54
Caracterização molecular dos isolados.....	54
Diversidade genotípica.....	55
Discussão	58
Agradecimentos	62
Referências	63
Capítulo II - EFEITO DO KILOL-L[®] E SEUS COMPONENTES NO CONTROLE DA MURCHA BACTERIANA DO PIMENTÃO	76

Resumo	77
Abstract	78
Introdução	79
Material e Métodos	81
Isolado bacteriano.....	81
Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Ralstonia solanacearum</i> a Kilol-L [®] e seus componentes	81
Efeito <i>in vivo</i> de Kilol-L [®] e seus componentes.....	82
Resultados e Discussão	83
Agradecimentos	88
Referências	88
CONCLUSÕES GERAIS	94

RESUMO

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* tem importância mundial devido aos grandes prejuízos causados, à variada e extensa gama de hospedeiros e ao difícil controle. No Brasil, a murcha bacteriana das solanáceas ocorre principalmente nas Regiões Nordeste, Norte e Sudeste, podendo causar 100% de perdas. Em Pernambuco, a murcha bacteriana causa grandes prejuízos à cultura do pimentão nos municípios produtores das Mesorregiões do Agreste e Mata. Os objetivos deste trabalho foram: (i) analisar a diversidade bioquímica, da virulência, molecular e genotípica de 78 isolados obtidos de plantas de pimentão com murcha, em municípios produtores de Pernambuco, Brasil, identificados como *R. solanacearum* por PCR multiplex e (ii) avaliar o efeito do produto comercial Kilol-L[®] e seus componentes, ácidos ascórbico, cítrico e láctico, no controle da doença. No primeiro trabalho, na caracterização bioquímica foram determinados a biovar e o biotipo. Para o estudo da virulência, plantas de pimentão, tomate, berinjela e fumo foram inoculadas por ferimento de raízes e deposição do inóculo, analisando-se severidade, área abaixo da curva de progresso da doença e período de incubação. A caracterização molecular dos isolados foi realizada utilizando-se as técnicas de PCR-multiplex, Rep-PCR e ISSR. A diversidade genotípica foi estudada considerando o número de genótipos observados e como eles se distribuíam pela população, diferindo em riqueza, igualdade e diversidade. Nas populações estudadas foi observada a predominância (97,44%) de isolados da biovar 3, biotipo 8 e filotipo I, mas foram encontrados também a biovar 1, biotipos 3 e 6 e filotipo II. A análise multivariada por UPGMA, utilizando o conjunto dos dados de virulência, permitiu a separação dos isolados em 12 grupos de similaridade, indicando alta variabilidade, com isolados de diferentes áreas em um mesmo grupo. As análises de Rep-PCR, utilizando os marcadores REP e BOX, e ISSR, mostraram a existência de

similaridade entre a maioria dos isolados de *R. solanacearum*. No entanto, esses marcadores não permitiram separar os isolados por biovares, biotipos, filotipos, nem por áreas diferentes. A análise da diversidade genotípica evidenciou diversidade moderada na população total, porém alta variabilidade dos isolados de um mesmo município. No segundo trabalho, inicialmente foi avaliada a sensibilidade *in vitro* de *R. solanacearum* ao Kilol-L[®] (0,4; 0,8; 2,5; 5; 10 e 100%) e seus componentes, os ácidos ascórbico, cítrico e láctico (0,25; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10%). Após teste de fitotoxidez em plantas de pimentão ‘Atlantis’, as concentrações Kilol-L[®] 0,8% e ácidos ascórbico, cítrico e láctico a 1% foram selecionadas e testadas para redução da severidade da murcha bacteriana, aplicadas por pulverização da parte aérea ou pela imersão de raízes de plantas com 21 dias. *Ralstonia solanacearum* isolado CGH41 foi inoculado por ferimento de raízes e deposição do inóculo. A análise dos halos de inibição mostrou alta sensibilidade do patógeno ao ácido láctico 10% e média sensibilidade ao ácido láctico 5 e 2,5 %, ácidos ascórbico e cítrico 10% e Kilol-L[®] 100%. A imersão de raízes em ácido láctico 1% proporcionou 100% de controle da murcha bacteriana em pimentão, embora sem diferir estatisticamente dos ácidos ascórbico e cítrico 1%. O método de aplicação pela imersão de raízes diferiu da pulverização da parte aérea para a maioria dos tratamentos. O único efeito do Kilol-L[®] foi elevar o período de incubação, no método de pulverização.

Palavras-chave: biotipo, biovar, *Capsicum annuum*, caracterização da virulência, caracterização molecular, diversidade genotípica, filotipo, murcha bacteriana, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico, controle de doença.

ABSTRACT

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is important worldwide mainly due to the great losses it causes in a large and diverse host range and its difficult control. In Brazil, bacterial wilt in solanaceous mainly occurs in Northeastern, North and Southeastern regions and may cause 100% losses. In the state of Pernambuco, bacterial wilt may be destructive to bell pepper in the producing counties of Mesorregiões Agreste and Mata. This work aimed: (i) to analyze 78 bacterial strains obtained from wilted bell pepper plants at producing counties of the state of Pernambuco, Brasil identified as *R. solanacearum* by multiplex PCR with reference to biochemical, virulence, molecular and genotypic diversity, and (ii) to evaluated the commercial disinfectant product Kilol-L[®] and its components, the ascorbic, citric and lactic acids for disease control. In the first paper the biochemical analysis characterized biovars and biotypes. The virulence studies included analysis of disease severity, area under disease progress curve and incubation period after inoculation of bell pepper, tomato, eggplant and tobacco plants by root wounding and inoculum drenching. The molecular characterization was performed by multiplex PCR, Rep-PCR and ISSR. The genotypic diversity was studied considering the number of observed genotypes and how they distributed by population differing in richness, evenness and diversity. There was predominance (97.44%) of strains belonging to biovar 3, biotype 8 and phylotype I, but also were found biovar 1, biotypes 3 and 6, and phylotype II. The multivariate analysis performed with UPGMA and using the pool of the virulence data permitted the separation of *R. solanacearum* strains in 12 similarity groups, pointing out high variability, with strains of different areas in the same group. The Rep-PCR with REP and BOX markers and ISSR showed similarity among most of the *R. solanacearum* strains, although they did not separate strains belonging to biovars, biotypes, phylotypes, or from distinct areas. The genotypic

diversity analysis evidenced moderate diversity in the total population but high variability among strains from the same county. In the second paper, initially it was evaluated *in vitro* the sensitivity of *R. solanacearum* to Kilol-L[®] (0.4, 0.8, 2.5, 5, 10 and 100%) and its components the ascorbic, citric and lactic acids (0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10%). After the phytotoxicity test in bell pepper cv. Atlantis, the concentrations Kilol-L[®] 0.8% and ascorbic, citric and lactic acids 1% were selected and tested for bacterial wilt severity reduction, by spraying of shoots or immersion of roots both using 21days-old plants. *Ralstonia solanacearum* strain CGH41 was inoculated by wounding roots and pouring inoculum. According to the analysis of the inhibition halos *R. solanacearum* showed high sensitivity to lactic acid 10% and medium sensitivity to lactic acid 5 and 2.5 %, ascorbic and citric acids 10% and Kilol-L[®] 100%. The immersion of roots in lactic acid 1% controlled bell pepper bacterial wilt by 100% however without difference from ascorbic and citric acids 1%. The method of root immersion differed from the shoot spray for most of the treatments. The unique significant effect of Kilol-L[®] was to elevate de incubation period when applied by shoot spraying.

Key words: biotype, biovar, *Capsicum annuum*, virulence characterization, molecular characterization, genotypic diversity, phylotype, bacterial wilt, ascorbic acid, citric acid, lactic acid, disease control.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

A CULTURA DO PIMENTÃO

O pimentão pertence à divisão Spermatophyta; Sub-divisão Angiosperma; Sub-classe Malvales-Tubiflorae; Ordem Solanales; Família Solanaceae; Gênero *Capsicum*; Espécie *Capsicum annuum* L. (CASALI; COUTO, 1984). É uma hortaliça que apresenta grande importância socioeconômica no Brasil, sendo uma das mais produzidas, comercializadas e apreciadas, estando entre as dez mais cultivadas. O pimentão é uma planta arbustiva, com raízes que atingem até 1m de profundidade, porém com pouco desenvolvimento lateral (FILGUEIRA, 2000). Na natureza é uma planta perene, porém quando cultivada se comporta como anual, de clima temperado, não tolerante ao frio e geadas, preferindo temperaturas mais altas. A época de plantio depende do clima regional, influenciado pela altitude e latitude (FILGUEIRA, 2003).

A região tropical do continente americano é o provável centro de origem do gênero *Capsicum*, região que compreende o México, a América Central e a América do Sul (TIVELLI, 1998). Também se encontra várias formas silvestres do norte do Chile até o sul dos Estados Unidos, sendo que o Brasil seria um importante centro de origem das espécies domesticadas (SIVIERO; GALLERANI, 1992).

No Brasil, cerca de 13.000 hectares são cultivados com o pimentão, com uma produção aproximadamente de 350.000 toneladas do fruto por ano (LOPES; ÁVILA, 2003). É cultivado em todos os estados do Brasil, porém a maior produção encontra-se nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, que plantam, em conjunto, aproximadamente 6.000 hectares, alcançando uma produção de 160 mil toneladas (HENZ et al., 2007).

O maior consumo de pimentão no Brasil ainda é do fruto verde, porém também são comercializados os frutos de coloração vermelha, amarela, laranja, creme e roxo. Entretanto, a busca por variedades de frutos amarelos continua crescente (FRIZZONE,

2001). Além da coloração, o fruto pode variar também na forma, podendo apresentar forma de baga oca, alongada ou cúbica.

Além do pimentão, no Brasil também são cultivados diferentes tipos de pimentas, compreendendo quatro espécies domesticadas, *C. annuum* L. (jalapeño), *C. baccatum* L. (dedo-de-moça), *C. frutescens* L. (malagueta e tabasco) e *C. chinense* Jacquin (de-cheiro, bode, cumari-do-Pará). Este gênero é muito apreciado não somente *in natura*, mas também na forma de conservas, temperos e molhos (AZEVEDO et al., 2006).

Segundo SECEX-MDIC (2011), a exportação das hortaliças do gênero *Capsicum* no ano de 2008 foi de aproximadamente 5.300 toneladas, enquanto a importação foi de 1.000 toneladas. O mercado externo é extremamente exigente quanto à qualidade do produto, e apesar desse crescimento do mercado de pimentão, os problemas fitossanitários continuam sendo um fator de perda para o cultivo. Isso gera custos com a utilização de produtos agrotóxicos, que giram em torno de R\$ 2.450,00 e R\$2.900,00 por hectare no cultivo em campo e em telado, respectivamente (EMATER-DF, 2010).

Apesar de diversos cuidados e inclusão de novas tecnologias ao sistema de produção da cultura, os problemas fitossanitários ainda representam um sério entrave à produtividade e um risco potencial de perdas para o produtor. Durante o cultivo, diversas pragas e doenças são observadas tanto em cultivo protegido como em campo aberto, principalmente as viroses, a murcha bacteriana, a murcha de *Phytophthora*, o oídio, a antracnose, os ácaros e trips (AZEVEDO et al., 2006).

MURCHA BACTERIANA

A murcha bacteriana é uma doença de grande importância mundial, por estar associada a um grande número de plantas hospedeiras e pelo agente causal, a bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., atuar no sistema vascular e ser habitante do solo dificultando o controle, ocasionando assim grande prejuízo econômico (LOPES; REISFSCHNEIDER, 1999). Foi primeiramente relatada por Erwin F. Smith, em 1896, nos Estados Unidos da América, colonizando a batata, o tomate e a berinjela (HAYWARD, 1994). No Brasil, a doença foi encontrada em fumo e batata, no ano de 1922, no estado do Rio Grande do Sul, por Von Parseval (TAKATSU; LOPES 1997).

Depois do primeiro relato da bacteriose, um grande número de estudos mostrou a ampla distribuição do patógeno, onde já foram descritas mais de 450 plantas hospedeiras, que estão distribuídas em cerca de 54 famílias botânicas (WICKER, 2007). Dentre essas, encontram-se espécies economicamente importantes pertencentes à família das solanáceas, como batata (*Solanum tuberosum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (BRINGEL, 2002). Espécies de outras famílias também são severamente afetadas como banana (*Musa* sp.), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (TAKATSU; LOPES, 1997).

A murcha bacteriana no Brasil tem ocorrido principalmente nas regiões Nordeste, Norte (COSTA; FERREIRA; LOPES, 2007) e em alguns pólos de produção de terras baixas na região Sudeste (BERIAM, 2007), principalmente devido à temperatura e umidade muito altas. Nessas regiões, a perda na produção de solanáceas é muito elevada, pode chegar a 100% e condenar o campo, principalmente em plantios sucessivos, devido à capacidade da bactéria de sobreviver no solo por longo período de tempo (LOPES; DUVAL, 2007).

No estado de Pernambuco, o primeiro relato desta doença em pimentão ocorreu em 1987 (MARIANO; CABRAL; SILVA, 1988; MARIANO et al., 1989), e sua importância tem aumentado recentemente. Provavelmente devido ao aumento do uso de cultivares híbridas pelos produtores, principalmente nos municípios de Camocim de São Félix, São Joaquim do Monte, Sairé e Bonito.

A expressão dos sintomas da murcha bacteriana varia de acordo com o hospedeiro, isolado e condições ambientais. No pimentão, os sintomas da doença ocorrem como murcha das folhas, começando pelas folhas mais novas e progredindo para as mais velhas, levando à morte da planta, sem alteração na coloração, semelhante ao que ocorre na deficiência hídrica. Internamente, observa-se escurecimento do sistema vascular e o corte transversal do caule de planta infectada revela a exsudação de fio leitoso de células bacterianas, visível em água límpida (MOMOL et al., 2008).

O sintoma de murcha observado nessa doença é resultante de fatores relacionados à bactéria, como a obstrução dos vasos do xilema pelas células bacterianas e pela produção de exopolissacarídeo (EPS). A planta também responde à colonização, formando tiloses, dificultando assim a passagem de água, resultando em um desequilíbrio hídrico e consequente murcha, sendo este considerado o principal fator de virulência deste patógeno (HIKICHI et al., 2007). O desequilíbrio dos hormônios vegetais auxina e etileno também estão relacionados com sintomas da doença como a redução do crescimento da planta e formação de raízes adventícias (BUDDENHAGEN; KELMAN, 1964). A bactéria geralmente penetra nas plantas hospedeiras através das raízes, por ferimentos ou pelas aberturas naturais, num período de aproximadamente quatro horas. Após dois ou três dias coloniza os espaços intercelulares do córtex da raiz, invade o xilema e então coloniza os tecidos aéreos da planta (SAILE et al., 1997).

A disseminação de *R. solanacearum* a longa distância ocorre, principalmente, através de material vegetal infectado (HAYWARD, 1991). A utilização de ferramentas e máquinas agrícolas contaminadas nas práticas culturais e no movimento de solo pode ser importante fator para a introdução da doença em novas áreas (HAYWARD, 1994). Outros aspectos ainda precisam ser estudados e esclarecidos como a disseminação através de sementes, solo, água de irrigação, restos de cultura, infecções latentes, hospedeiros alternativos e plantas invasoras (COUTINHO, 2005).

CARACTERÍSTICAS DO PATÓGENO

O gênero *Ralstonia* está classificado no reino Procariotae, divisão Bacteria, classe Proteobacteria, sub-classe β -Proteobacteria, ordem Pseudomonadales, família Pseudomonadaceae (KRIEG; HOLT, 1984).

Espécies desse gênero são habitantes do solo, Gram-negativas, aeróbicas, não formadoras de esporos, têm forma de bastonetes, retos ou levemente curvos, nunca helicoidais, medem 0,5-1,0 x 1,5-3,0 μm , móveis por meio de 1-4 flagelos. Em meio ágar, contendo tirosina, produzem pigmentos marrons. Não produzem pigmentos fluorescentes. Algumas espécies incluindo *R. solanacearum* acumulam poli- β -hidróxido-butirato como reserva de carbono (MEHAN et al., 1994). Comumente este gênero pode reduzir nitrato a nitrito produzindo gás. Realizam fraca hidrólise da gelatina, mas não hidrolisam o amido, nem utilizam arginina ou betaina como fonte de carbono. Apresentam bom crescimento em temperatura entre 25 a 35°C, variando de acordo com os isolados (MEHAN et al., 1994).

Devido à sua variabilidade e adaptação a uma grande gama de hospedeiros e condições climáticas, *R. solanacearum* foi classificada a nível infraespecífico em cinco raças (HE et al., 1983) e seis biovars (HAYWARD, 1964). As raças são definidas pela gama de hospedeiros. Na raça 1 são classificados os isolados que colonizam o maior

número de culturas, que abrange a família das solanáceas (batata, tomate, pimentão, berinjela, fumo) e outras plantas, como amendoim, bananeira ornamental (*Musa* sp.), oliva (*Olea* sp.), ave do paraíso (*Strelitzia reginae* Banks) e em algumas regiões a helicônia (*Heliconia* spp.). Já na raça 2 encontram-se os isolados que afetam a bananeira triplóide (banana comestível e banana subgrupo Terra ou “plátano”) e helicônias (HAYWARD, 1994), enquanto na raça 3 são encontrados isolados que colonizam especificamente a batata e ocasionalmente tomate, mas não colonizam outras culturas (BUDDENHAGEN; SEQUEIRA; KELMAN, 1962). A raça 4 infecta o gengibre e a 5, a amoreira (*Morus nigra* L.) (HAYWARD, 1994).

A classificação de acordo com a biovar é definida através da utilização de açúcares e alcoóis como única fonte de carbono e formação de ácidos a partir destes carboidratos, ou também através da redução de nitrato a nitrito, sendo classificados em biovars 1, 2, 3, 4 e 5 (HAYWARD, 1964). No caso da biovar 2, a adição dos carboidratos trealose e inositol, revelou a existência de novos fenótipos. Isolados que infectam batata, e utilizam inositol, mas não a trealose, encontrados especialmente no Chile e na Colômbia, foram denominados como 2A (Andino). Já a biovar 2T (Tropical) ou N2, compreende os isolados que consomem ambos os substratos, encontrados em terras mais baixas, principalmente no Peru e no Brasil (HAYWARD, 1994).

Segundo Hayward (1991), os isolados das biovars 1 e 2 são as mais amplamente distribuídas, sendo que a biovar 1 predomina nas regiões de clima quente, enquanto a biovar 2 predomina em regiões de clima temperado. A biovar 3 está mais adaptada às regiões quentes dos trópicos. Reifschneider e Takatsu (1985), através de levantamentos no Brasil, relataram a existência da biovar 1 em todas as regiões do país, já que a biovar 2 predomina nas regiões de climas amenos do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e a biovar 3 predomina nas regiões Norte e Nordeste, de clima mais quente.

Com o advento das técnicas moleculares, a taxonomia infraespecífica de *R. solanacearum* sofreu um processo de revisão que tem permitido o estudo do relacionamento filogenético, evolutivo e da variabilidade dessa bactéria (SILVEIRA et al., 2005). Técnicas que formam “fingerprint” genético como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) e Rep-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic), que amplificam regiões repetitivas do material genético vêm sendo utilizadas.

Cook et al. (1989, 1991) e Gillings e Fahy (1994) usando RFLP puderam definir 33 grupos ou genótipos de *R. solanacearum*, cujas relações evidenciaram a existência de duas divisões geneticamente distintas (I e II) fortemente relacionadas com a origem geográfica dos isolados, sendo a divisão I originária da Ásia e a divisão II das Américas. Na divisão I, as biovars 3, 4 e 5 correspondem à raça 1, isolados provenientes principalmente da Ásia. Na divisão II, a biovar 1 correlaciona-se com as raças 1 e 2 enquanto a biovar 2 (exceto biovar N2) corresponde à raça 3, provenientes principalmente das Américas (GILLINGS; FAHY, 1994; COOK; SEQUEIRA, 1994; FEGAN; PRIOR, 2005).

Pesquisas posteriores que utilizam técnicas como Rep-PCR, passaram a ser empregadas na separação dos grupos de *R. solanacearum* em linhagens clonais (HORITA; TSUCHIYA, 2001; IVEY et al., 2007). Silveira et al. (2005) usaram o Rep-PCR (ERIC-PCR e BOX-PCR) e diferenciaram claramente as biovars 1 e 2 de batata, contudo ambas não detectaram variabilidade entre isolados da biovar 2 e apenas o BOX-PCR detectou variabilidade entre isolados da biovar 1. O mesmo também já havia sido observado por Smith et al. (1995) e Van Der Wolf et al. (1998). A amplificação por PCR utilizando 64 isolados de *R. solanacearum* em estudo realizado por Costa, Ferreira e Lopes (2007), só foi possível utilizando o primer BOX. Onde foi observada a

formação de cinco grupos ao nível de 23% pela similaridade, separando isolados da biovar N2 em um grupo distinto das biovars 1 e 3, mostrando a homogeneidade da biovar N2. Não observaram correlação entre o perfil genômico, local de coleta e ecossistema de origem dos isolados estudados.

Por outro lado, Jaunet e Wang (1999), em estudo com a raça 1 proveniente de tomate, verificaram que apesar da alta variabilidade genotípica e agressividade dos isolados, não existe relação entre as duas características e concluíram que análise de populações baseando-se apenas em marcadores neutros não é suficiente para compreender completamente a diversidade de *R. solanacearum*.

Outras técnicas também têm sido utilizadas para esclarecer a filogenia desta espécie, como o sequenciamento da região ITS (16S-23S rRNA), do gene *hrpB* e do gene da endoglucanase (FEGAN; PRIOR, 2005). Atualmente, *R. solanacearum* é considerada um complexo de espécies, sendo classificada em filotipos (I-IV), sequevares (1-51), linhagens clonais (Tabela 1) e biotipos (Tabela 2).

Tabela 1. Esquema de classificação hierárquica para *Ralstonia solanacearum* proposto por Fegan e Prior (2005).

Nível Taxonômico	Equivalência taxonômica	Nomenclatura	Modo de identificação
Espécie	Espécie	Complexo <i>R. solanacearum</i>	PCR Primers
Filotipo	Subespécie	Filotipos I, II, III e IV	PCR multiplex baseada na região ITS
Sequevar	Grupos infra-subespecíficos	Sequevares 1-23	Sequenciamento do gene de endoglucanase
Clone	Linhagens clonais	-	Métodos de Fingerprinting (RAPD, AFLP, PFGE)

A classificação por filotipo é baseada no sequenciamento da região ITS, onde o filotipo I equivale a divisão I de Cook et al. (1989) e biovars 3, 4 e 5, provenientes

principalmente da Ásia. Filotipo II corresponde à divisão II, que inclui as biovars 1, 2 e N2, provenientes principalmente das Américas. No filotipo II também se classifica a raça 3 da batata mundialmente distribuída e isolados da raça 2 de banana. O filotipo III é constituído por isolados oriundos principalmente da África e ilhas vizinhas, com isolados que pertencem as biovars 1 e N2. O filotipo IV contém isolados das biovars 1, 2 e N2, provenientes principalmente da Indonésia, porém tem sido encontrado também na Austrália e Japão. Este filotipo IV também contém duas bactérias muito próximas a *R. solanacearum*, *R. syzygii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al., agente causal da “doença de Sumatra do cravo-da-índia” em Java e Sumatra e “blood disease bacterium” (BDB) que ocorre na Indonésia, as quais fazem parte do mesmo complexo (FEGAN; PRIOR, 2005).

Através do sequenciamento do gene *hrpB* e do gene da endoglucanase foi possível separar cada filotipo em sequevares, sendo cada sequevar, identificado como um grupo de isolados com uma sequência altamente conservada. Um sequevar pode ser definido apenas se dois ou mais isolados sequenciados tiverem sequências similares. Até agora já foram identificados 51 sequevares (XU et al., 2009).

Porém a técnica de PCR ainda não está acessível a todos os laboratórios de diagnose. Portanto, um esquema de identificação fenotípica tem sido estabelecido, que correlaciona biotipos com filotipos e sequevares (Tabela 2). A classificação por biotipo leva em consideração a utilização de maltose, manitol, malonato, trealose, inositol e hipurato (FEGAN; PRIOR, 2005).

Por ser uma espécie com grande diversidade infraespecífica, a caracterização dos isolados predominantes em áreas produtoras no estado de Pernambuco, irá possibilitar que o manejo da doença seja corretamente direcionado. Pesquisas com diversidade de *R. solanacearum* no estado de Pernambuco foram realizadas apenas com isolados

provenientes de tomateiro. Silveira et al. (1998) estudando isolados de *R. solanacearum* de tomateiro, do município de Camocim de São Félix, observaram uma predominância de 78% de isolados da biovar 3. Através das variáveis índice de murcha, Período de Incubação (PI) e Período Latente (PL₅₀), separaram 28 isolados das biovars 1 e 3 em cinco grupos de similaridade confirmando a variabilidade dos mesmos, mas não conseguiram correlacionar virulência com a biovar. A presença destas duas biovars de isolados proveniente de tomateiro neste município havia sido previamente descrita por Mariano et al. (1997).

Tabela 2. Correlação entre perfis de biotipos e filotipos/sequevares do complexo *Ralstonia solanacearum* (FEGAN; PRIOR, 2005)

Biotipo	Substrato ¹						Filotipo/ Sequevar
	Maltose	Manitol	Malonato	Trealose	Inositol	Hipurato	
1	+	-	+	-	-*	+	II/1e 2
2	+	-	+	+	+	+	II/NA
3	-	-	-	-	+	+++	II/3
4	-	-	-	-	-	+	II/4
5	-	-	+	-*	+	+	II/5
6	-	-	-	-	-	-	II/6
7	-	-	-	-	+	+	II/7
8	+/-	+	-	-	+	-	I/12-18
9	+	-	-	+	-	-	III/22
10	-	-	-	+	+	-	III/NA
11	+	-	-	+/-	+	+	III/8e 9

¹Substratos esterilizados por filtração e testados a 1% (p:v) no meio mínimo de Ayers (Schaad et al., 2001) com indicador de pH, com incubação a 28°C durante 14 dias.

²NA = não aplicável, * = alcalinização, - = sem acidificação, + = com acidificação, +++ = isolados considerados positivos para o hipurato, se o meio tornar-se azul escuro.

CONTROLE DA MURCHA BACTERIANA

Atualmente muitos são os fatores que dificultam o controle da murcha-bacteriana, como a ampla gama de hospedeiros, a alta variabilidade genética da *R. solanacearum* e a sua capacidade de sobreviver no solo por longos períodos a grandes profundidades. A bactéria também possui uma fase epifítica ou residente, em hospedeiros assintomáticos

ou alternativos, os quais são uma importante fonte de inóculo para renovação da população no solo (HAYWARD, 1991; COUTINHO, 2005). Estes fatores acabam tornando o controle químico inviável e antieconômico (LOPES, 1994).

A utilização de medidas baseadas em evasão e exclusão ainda é a melhor alternativa para o controle da murcha bacteriana, tais como evitar locais com histórico da doença, usar sementes e mudas saudáveis, não plantar em áreas mal drenadas, plantar em solos com umidade e fertilidade adequadas, entre outras. Segundo Silveira, Mariano, Michereff (1996), as principais medidas indicadas para o controle de *R. solanacearum* são ações de prevenção ou práticas culturais que visam impedir ou atrasar o surgimento do patógeno.

Takatsu e Lopes (1997) sugeriram um manejo integrado, com a aplicação de diversas medidas como rotação de culturas, plantio em áreas idôneas, resistência genética, manejo da água e solarização. Porém a eficiência deste sistema de manejo é particular para cada localidade, pois está sujeita às variações das características do patógeno, como raça e biovar (LOPES, 1994; TAKATSU; LOPES, 1997).

A utilização de variedades resistentes à murcha bacteriana ainda é difícil, devido à alta variabilidade e complexidade da espécie, e interações com fatores ambientais. Segundo Mew e Ho (1977), a resistência à murcha bacteriana de algumas cultivares de tomate é extremamente relacionada com as condições ambientais, como temperaturas elevadas e altos níveis de umidade do solo. Não existe ainda uma variedade de pimentão resistente à murcha bacteriana.

O uso da rotação de cultura no controle da murcha bacteriana apresenta algumas limitações, considerando a grande gama de hospedeiros do patógeno. Em hortaliças, os melhores resultados têm sido obtidos com a rotação de culturas com gramíneas, como

milho, arroz, sorgo, cana-de-açúcar e pastagem (TAKATSU; LOPES, 1997; KUROZAWA; PAVAN, 2005).

A solarização é uma técnica que tem se mostrado efetiva no controle de patógenos habitantes do solo e no controle das plantas invasoras, sendo que também têm a vantagem de ser simples, de baixo custo, e não envolve o uso de produtos químicos (GHINI, 2001). Vários experimentos tem comprovado a eficiência da solarização na redução da população de *R. solanacearum* no solo e no controle da murcha bacteriana (CHELEMI; OLSON, 1994; CAVALCANTE, 1999; PATRÍCIO et al., 2005).

No Brasil, não existem agrotóxicos (fungicidas ou antibióticos) registrados para o controle da murcha bacteriana em diferentes hospedeiros. O controle químico pode ser dificultado pela localização da bactéria na planta, ficando protegida no interior do xilema, ou mesmo em grandes profundidades no solo (KUROZAWA; PAVAN, 2005; LOPES, 1994). O fumigante Brometo de metila em combinação com a Cloropicrina foi usado com sucesso durante décadas para reduzir populações de *R. solanacearum* no solo. No entanto, devido ao efeito destrutivo na camada de ozônio do planeta, teve o seu uso restrito baseado no Protocolo de Montreal, pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (ROSSKOPF et al., 2005). Por isso é extremamente importante e urgente que novos produtos e medidas para o manejo da murcha bacteriana em campo sejam identificados (PARET et al., 2010).

Novas alternativas de controle têm surgido com a utilização de produtos naturais, que aumentam a produção de alimentos com melhor qualidade e reduzem o uso de agrotóxicos. Esta agricultura alternativa envolve o uso de extratos de plantas e óleos essenciais com propriedades antimicrobianas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003; LOGUERCIO et al., 2005; SILVA et al., 2006).

Kilol-L[®] é um produto de ação higienizante, formulado para utilização em ambientes e superfícies de agroindústrias, composto pelos ácidos ascórbico (1%), cítrico (0,475%) e láctico (0,475%), naturalmente estabilizados (QUINABRA 2007). Esta formulação tem sido relatada pelo fabricante como eficiente contra bactérias e fungos diversos. Apesar do Kilol-L[®] não ser um produto indicado para o uso agrícola, a sua eficiência é citada no controle dos gêneros *Xanthomonas*, *Erwinia* e *Pseudomonas* (MOLINA, 2001), bem como tem sido utilizado no controle da murcha bacteriana em tomateiro por alguns produtores das Mesorregiões do Agreste e Mata de Pernambuco (Eng. Agrônomo Iramar Benigno Albert Jr., comunicação pessoal). No entanto, não existem trabalhos que demonstrem sua ação no controle de bactérias fitopatogênicas. Com relação a doenças fúngicas, o Kilol LDF100[®] não foi eficiente no controle da antracnose do maracujazeiro, quando comparado com os fungicidas sulfato de cobre, enxofre coloidal 80%, calda bordalesa e mancozeb, apesar de ter promovido o crescimento das plantas (VEGA, 1998).

Os mesmos componentes do Kilol-L[®] também são usados na composição de produtos indutores de resistência como o Ecolife[®] que vem sendo testado tanto *in vitro* como *in vivo* na proteção de algumas plantas contra patógenos. O uso do Ecolife[®] tem se mostrado efetivo no controle de *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Vauterin et al (CAVALCANTI et al., 2006) e *X. axonopodis* pv. *manihotis* Dye (MOTOYAMA et al., 2003). Motoyama et al. (2003) avaliaram a ação de extrato cítrico (Ecolife 40[®]) no crescimento de *R. solanacearum* e *X. axonopodis* pv. *manihotis* e verificaram que nas concentrações 0,1 e 0,5% os halos de inibição do crescimento foram de 2,5; 6,9 e 2,4; 8,2 mm, respectivamente.

Outros produtos, como sanitizantes e extratos vegetais, também têm sido testados para inibição do crescimento de *R. solanacearum*. O sanitizante cloreto de

dodecil dimetil amônio, na concentração de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inibiu o crescimento deste patógeno com formação de halos de 2,19 cm (ALVES et al., 2010). Yao et al. (2010) avaliaram a capacidade do desinfestante dióxido de cloro (ClO_2) nas concentrações 0,13; 1,3 e 13 mg L^{-1} , no controle de dois isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al. e dois isolados de *R. solanacearum* em água de irrigação. Os autores observaram que as concentrações de 1,3 e 13 mg L^{-1} foram significativamente eficientes, atingindo 100% do controle da *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e de 99% da *R. solanacearum*, sendo esses resultados constantes mesmo com a variação do pH entre 5 e 9.

Extratos de *Tagetes* spp. contendo tiofenos foram capazes de inibir o crescimento de *R. solanacearum in vitro* e impedir o desenvolvimento da murcha em plantas de fumo (TERBLANCHE; VILLIERS, 1998). Paret et al. (2010) testando óleos essenciais de Palmarosa (*Cymbopogon martinii* Roxb. Wats.), capim-limão (*C. citratus* (DC.) Stapf) e eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) no controle de *R. solanacearum* raça 4, em meio de cultura SMSA (KANG; CHUNG; YU, 2004) verificaram que não houve crescimento bacteriano nas amostras com óleo de palmarosa em todas as concentrações e com óleo de capim-limão nas concentrações 0,07 e 0,14%, após 48 h de incubação. Já o óleo de eucalipto não foi eficiente em inibir o crescimento em meio de cultura da bactéria. Em teste de fumigação, misturando os óleos ao solo infestado, 7 dias antes do transplante em vasos, verificaram a redução da incidência de 100% da murcha bacteriana em gengibre por ambos óleos nas concentrações de 0,07 e 0,14% em relação a testemunha.

Considerando o difícil controle da murcha bacteriana, os objetivos desta pesquisa foram analisar a diversidade bioquímica, de virulência, molecular e genotípica de populações de *R. solanacearum* obtidas de plantas de pimentão com sintomas da

doença em áreas de plantio das mesorregiões do Agreste e Mata de Pernambuco; e avaliar o efeito do produto comercial Kilol-L[®] e seus componentes, ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido láctico, no manejo da doença. Os resultados obtidos darão suporte à adoção de estratégias adequadas de manejo integrado da murcha bacteriana em municípios produtores de Pernambuco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A. O.; OLIVEIRA, M. M. S.; SANTOS, L. A.; SOUZA, L. J. N.; SILVEIRA, E.L.; MARIANO, R. L. R. Efeito do cloreto de dodecil dimetil amônio na inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum*. **Anais da X jornada de ensino, pesquisa e extensão**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, cd-rom, 2010.

AZEVEDO, C. P.; CAFÉ FILHO, A. C.; HENZ, G. P.; REIS, A. **Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. 4 p. (Embrapa Comunicado Técnico, 35).

BERIAM, L. O. S. Doenças bacterianas em hortaliças. **Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 81-84, 2007.

BRINGEL, J. M. M. **Caracterização bioquímica, patogênica e molecular de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 de batata e berinjela**. 2002, 103 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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

BUDDENHAGEN, I. W.; KELMAN, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Lancaster, v. 2, p. 203-230, 1964.

CASALI, V. W. D.; COUTO, F. A. A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, n. 113, p. 8-10, 1984.

CAVALCANTE, M. J. B.; RITZINGER, C. H. S. P.; BERGO, C. Uso da solarização do solo no controle da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) no cultivo de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) em Vila Extrema-RO. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, suplemento, v. 24, p. 248, 1999.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; ZACARONI, A. B.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; COSTA, J. C.; SOUZA, R. M. Acibenzolar-Smetil e Ecolife na indução de resistência e respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-380, 2006.

CHELEMI, D. O.; OLSON, S. M. Effects of soil solarization and fumigation on survival of soilborne pathogens of tomato in Northern Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 12, p. 1167-1172, 1994.

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

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

COOK, D.; SEQUEIRA, L. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p. 77-93.

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

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

EMATER-DF: **Empresa de assistência técnica e extensão rural do distrito federal vinculada à secretaria de estado de agricultura, pecuária e abastecimento do**

Distrito Federal. 2010. Disponível em: <<http://www.emater.df.gov.br/sites/200/229/00000776.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

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

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura:** agrotecnologia moderna na produção de hortaliças. 1ª. ed. Viçosa: Editora UFV, 2000. 402p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, berinjela e jiló.** Viçosa: Editora UFLA, 2003, 332p.

FRIZZONE, J. A.; GONÇALVES, A. C. A.; REZENDE, R. Produtividade do pimentão amarelo, *Capsicum annuum* L., cultivado em ambiente protegido, em função do potencial mátrico de água no solo. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 5, p. 1111-1116, 2001.

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

GHINI R. 2001. Alternativas para substituir o brometo de metila na agricultura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 1, p. 162.

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

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

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

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

HENZ, G. P.; COSTA, C. S. R.; CARVALHO, S.; BANCI, C. A. **Como cultivar pimentão: alta produtividade**. Brasília: Revista Cultivar, 2007. 7p. (Caderno técnico, n. 42).

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

HORITA, M.; TSUCHIYA, K. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 4, p. 399-407, 2001.

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

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

JAUNET, T. X.; WANG, J. F. Variation in genotype and aggressiveness diversity of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. **Phytopathology**, Saint

Paul, v. 89, n. 3, p. 320-327, 1999.

KANG, Y. G.; CHUNG, Y. H.; YU, Y. H. Relationship between the Population of *Ralstonia solanacearum* in Soil and the Incidence of Bacterial Wilt in the Naturally Infested Tobacco Fields. **Plant Pathology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 289-292, 2004.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 787p.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. Doenças das solanáceas. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds). **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**. Vol. 2. 3ª ed. Editora Ceres, São Paulo – SP. 2005, p. 589-596.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

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

LOPES, C. A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Manejo integrado das doenças da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, p. 56-60, 1999.

LOPES C. A.; DUVAL A. M. Q. Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças. In: ZAMBOLIM L; LOPES C. A.; PICANÇO M. C.; COSTA H.(Eds.). **Manejo Integrado de Doenças e Pragas: Hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2007, 502p.

LOPES, C. A.; ÁVILA, C. A. **Doenças do Pimentão: diagnose e controle**. Brasília:Embrapa Hortaliças, 2003, 96p.

MARIANO, R. L. R.; CABRAL, G. B.; SILVA, M. S. S. G. Levantamento das fitobacterioses do Estado de Pernambuco em 1987. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 130, 1988.

MARIANO, R. L. R.; MELO, R. A. G.; HOLANDA, V. T.; CABRAL, G. B.; SILVA, M. S. S. G. Levantamento das fitobacterioses do Estado de Pernambuco no biênio 1987-1988. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, p. 158, 1989.

MARIANO, R. L. R., SILVEIRA, E. B.; MICHEREFF, S. J. Studies on tomato bacterial diseases in Pernambuco, Brazil. **Proceedings of the Internacional Symposium on Tropical Tomato Disease**. Alexandria Internacional Society of Horticultural Science, p. 156-159, 1997.

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

MEW, T. W.; HO, W. C. Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 7, p. 909-911, 1977.

MOLINA, N. Uso de extractos botánicos en control de plagas y enfermedades. **Manejo Integrado de Plagas**, Costa Rica, n. 59, p. 76-77, 2001.

MOMOL, T.; PRADHANANG, P.; LOPES, C. A. **Bacterial Wilt of Pepper**. EDIS: University of Florida IFAS Extension, pp189, 2008. Web Site: <http://edis.ifas.ufl.edu>.

MOTOYAMA, M. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FIORI A. C. G.; SCAPIM C. A. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 5, n. 2, p. 509-512, 2003.

PARET, M. L.; CABOS, R.; KRATKY, B. A.; ALVAREZ, A. M. Effect of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* race 4 and bacterial wilt of edible ginger. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 5, p. 521-527, 2010.

PATRÍCIO, F. R. A.; ALMEIDA, I. M. G.; SANTOS, A. S.; CABRAL, O.; TESSARIOLI NETO, J.; SINIGAGLIA, C.; BERIAM, L. O. S.; RODRIGUES NETO, J. Avaliação da solarização do solo para o controle de *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 475-481, 2005.

QUINABRA. **Comunicado Técnico**, Kilo-L higienizante. Edição 2007.

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

ROSSKOPF, E. N.; CHELLEMI, D. O.; KOKALIS-BURELLE, N.; CHURCH, G. T. **Alternatives to methyl bromide**: A Florida perspective. APSnet feature story June 2005. On line publication.

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

SCHAAD, N. W., JONES, J. B., CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: American Phytopathological Society. 3rd. Ed. 2001, 373p.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de Plantas medicinais no controle de doenças de plantas. In: XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2003, Uberlândia. **Anais**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2003. p. S54 – S56.

SECEX MDIC. **Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior**. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em: 04 de jan. de 2011.

SILVA, M. B.; ROSA, M. B.; BRASILEIRO, B. G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C. A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos vegetais de plantas para o controle de plantas. In: VENZON, M.; PAULA JUNIOR, T. J.; PALLINI A. (Eds.) **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2006. p. 221-246.

SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Variability of *Ralstonia solanacearum* populations causing wilt on tomato in Agreste of Pernambuco, Brazil. **Bacterial Wilt Newsletter**, n. 15, p. 8-10, 1998.

SILVEIRA, J. R. P.; DUARTE, V.; MORAES, M. G.; OLIVEIRA, A. M. R.; BARNI, V.; MACIEL, J. L. N. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de

plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-Rep e RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 615-622, 2005.

SILVEIRA, N. S. S. D.; MARIANO, R. D. L. R.; MICHEREFF, S. J. *Pseudomonas solanacearum* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 22, p. 97-111, 1996.

SIVIERO, R.; GALLERANI, M. La coltivazione de peperone. **Verona: L' Informatore Agrario**, 1992, 217p.

SMITH, J. J.; OFFORD, L. C.; HOLDERNESS, M.; SADDLER, G. S. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 12, p. 4263-4268, 1995.

TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 3, p. 170-177, 1997.

TERBLANCHE, J.; VILLIERS, D. A. The suppression of *Ralstonia solanacearum* by marigolds. In: PRIOR, C. A.; ELPHINSTONE, J. G. (Eds.) **Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects**. Berlin: Spring-Verlag, 1998, p. 325-331.

TIVELLI, S. W. A cultura do pimentão. In: GOTO, R. TIVELLI, S. W. (org). **Produção de Hortaliças em Ambiente Protegido: condições subtropicais**. São Paulo: Editora UNESP, 1998. p. 225-226.

VAN DER WOLF, J. M.; BONANTS, P. J.; SMITH, J. J.; HAGENNAAR, M.; NIJHUIS, E.; VAN BECKHOVEN, J. R. C. M.; SADDLER, G. S.; TRIGALET, A.; FEUILLADE, R. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. In PRIOR, P.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. (Eds.) **Bacterial Wilt Disease: molecular and ecological aspects**. Berlin: Springer – Verlag, INRA Reports, 1998, p. 44-49.

VEGA, S. J. M. **Estudio epidemiológico y evaluación de fungicidas contra la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) del maracuyá para agricultura orgánica en Olancho**, Honduras. 65f. Monografía (Engenharia Agronomica) Universidade Zamorano, Departamento de Protección Vegetal. 1998.

WICKER, E.; GRASSART, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M.; PRIOR, P. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 6790-6801, 2007.

XU, J. O.; PAN, Z. C.; XU, J. S.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, L. Q.; HE, L. Y.; FENG, J. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, p. 641–653, 2009.

YAO, K. S.; HSIEH, Y. H.; CHANG, Y. J.; CHANG, C. Y.; CHENG, T. C.; LIAO, H. L. Inactivation effect of chlorine dioxide on phytopathogenic bacteria in irrigation water. **Journal Environmental Engineering and Management**, Taipei, v. 20, n. 3, p. 157-160, 2010.

CAPÍTULO II

DIVERSIDADE POPULACIONAL DE *Ralstonia solanacearum* EM
PIMENTÃO NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

1 **Diversidade populacional de *Ralstonia solanacearum* em pimentão no**
2 **estado de Pernambuco, Brasil**

3

4 **Alessandra de Lima Garcia¹, Waléria Guerreiro Lima¹, Elineide Barbosa de Souza²,**
5 **Sami Jorge Michereff¹ e Rosa de Lima Ramos Mariano^{1*}**

6

7

8 ¹ Fitossanidade, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
9 Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

10 ² Microbiologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
11 Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

12

13 *Autor para correspondência: rrbac@gmail.com.br;

14

15

16

17

18

19

20

21

22 **RESUMO**

23 Foi analisada a diversidade bioquímica, de virulência, molecular e genotípica de 77
24 isolados obtidos de plantas de pimentão com murcha, na mesorregiões do Agreste e da
25 Mata do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil e identificados como *R. solanacearum*
26 por PCR multiplex. Na caracterização bioquímica foram determinados a biovar e o biotipo.
27 Para o estudo da virulência, plantas de pimentão, tomate e berinjela foram inoculadas por
28 ferimento de raízes e deposição do inóculo, analisando-se período de incubação,
29 severidade e área abaixo da curva de progresso da doença. A caracterização molecular dos
30 isolados foi realizada utilizando as técnicas de PCR-multiplex, Rep-PCR e ISSR. A
31 diversidade genotípica foi estudada considerando o número de genótipos observados e
32 como eles se distribuíam pelas populações, diferindo em riqueza, igualdade e diversidade.
33 Foi observada a predominância (97,44%) de isolados da biovar 3, biotipo 8 e filotipo I,
34 mas foram encontrados também a biovar 1, biotipos 3 e 6 e filotipo II. A análise
35 multivariada por UPGMA, utilizando o conjunto dos dados de virulência, permitiu a
36 separação dos isolados em 11 grupos de similaridade, com isolados de diferentes áreas de
37 coleta em um mesmo grupo. As análises de Rep-PCR, utilizando os marcadores REP e
38 BOX, e ISSR, mostraram a existência de similaridade entre a maioria dos isolados de *R.*
39 *solanacearum*. No entanto, esses marcadores não permitiram separar os isolados por
40 biovars, biotipos, filotipos ou áreas. A análise da diversidade genotípica evidenciou
41 diversidade moderada na população total, porém alta variabilidade dos isolados de um
42 mesmo município.

43

44 **Palavras-chave:** *Capsicum annuum*, caracterização da virulência, caracterização
45 molecular, diversidade genotípica, murcha bacteriana.

46

47 **ABSTRACT**

48 Seventy-seven bacterial strains obtained from wilted bell pepper plants from the Agreste
49 and Mata mesoregions of the state of Pernambuco, located in northeastern Brazil, were
50 identified as *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR. The strains were analyzed to
51 characterize their biochemical, physiological, virulence, molecular and genotypic
52 diversities. The biovars and biotypes were determined from the biochemical
53 characterization. For the study of virulence, bell pepper, eggplant and tomato plants were
54 inoculated by wounding the roots and depositing the inoculum, and the period of
55 incubation, severity and area under the disease progress curve were analyzed. A molecular
56 characterization of strains was performed, using multiplex PCR, Rep PCR and ISSR
57 techniques. Genotypic diversity was assessed, considering the number of genotypes
58 observed and how they were distributed in the populations, differing in terms of richness,
59 evenness and diversity. Strains of biovar 3, biotype 8 and phylotype I were predominant
60 (97.44%), but biovar 1, biotypes 3 and 6 and phylotype II were also present. Multivariate
61 analysis by UPGMA, using the virulence data set, enabled separation of the strains into 11
62 similarity groups, with strains from different sampling areas in the same group. The Rep
63 PCR analyses, using REP and BOX markers and ISSR, showed similarities among the
64 majority of the *R. solanacearum* strains. However, these markers did not allow for the
65 separation of strains by biovars, biotypes, phylotypes or areas. The analysis of genotypic
66 diversity revealed moderate diversity in the overall population but high variability in the
67 strains from the same municipality.

68

69 **Keywords** bacterial wilt · *Capsicum annuum* · genotypic diversity · molecular
70 characterization · virulence characterization

71

72 INTRODUÇÃO

73 *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. causa murcha bacteriana em mais
74 de 450 espécies de plantas hospedeiras, que estão distribuídas em cerca de 54 famílias
75 botânicas (Wicker et al. 2007). Esta bactéria é considerada um dos patógenos de plantas
76 mais destrutivos nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas no mundo, somente ainda
77 não reportada no continente Antártico (Grover et al. 2006).

78 No Brasil, *R. solanacearum* foi assinalada inicialmente em fumo (*Nicotiana*
79 *tabacum* L.) e batata (*Solanum tuberosum* L.), no ano de 1922, no estado do Rio Grande do
80 Sul (Takatsu e Lopes 1997). A murcha bacteriana em pimentão (*Capsicum annuum* L.)
81 ocorre na maioria dos estados brasileiros, sendo mais importante nas principais áreas de
82 produção na Região Nordeste e nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (Lopes e
83 Quezado-Soares 1997; Malavolta et al. 2008). No estado de Pernambuco, apesar de existir a
84 longo tempo, sua importância tem aumentado recentemente, provavelmente devido ao
85 aumento do uso de cultivares híbridas pelos produtores, principalmente nos municípios de
86 Camocim de São Félix, São Joaquim do Monte, Sairé e Bonito.

87 A expressão dos sintomas da murcha bacteriana varia conforme o hospedeiro, o
88 isolado e as condições ambientais. Em pimentão, os sintomas da doença ocorrem
89 inicialmente com murcha das folhas mais novas que progride para as mais velhas, levando
90 à morte da planta, sem alteração na coloração verde. Internamente, observa-se
91 escurecimento do sistema vascular e o corte transversal de planta infectada revela a
92 exsudação de fio leitoso de células bacterianas em água límpida (Lopes e Quezado-Soares
93 1997; Momol et al. 2008).

94 Devido à sua variabilidade e adaptação a uma grande gama de hospedeiros e
95 condições climáticas, *R. solanacearum* foi classificada a nível infraespecífico em cinco
96 raças (He et al. 1983) e seis biovars (Hayward 1964). No entanto, com o advento das

97 técnicas moleculares, a taxonomia infraespecífica de *R. solanacearum* sofreu um processo
98 de revisão que tem permitido o estudo do relacionamento filogenético, evolutivo e da
99 variabilidade dessa bactéria (Silveira et al. 2005). Técnicas que formam “fingerprint”
100 genético como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e RAPD (Random
101 Amplification of Polymorphic DNA) e que amplificam regiões repetitivas do material
102 genético, Rep-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic), foram as primeiras a serem
103 utilizadas. Cook et al. (1991) e Gillings e Fahy (1994) usando RFLP puderam definir 33
104 grupos ou genótipos de *R. solanacearum*, cujas relações evidenciaram a existência de duas
105 divisões geneticamente distintas (I e II) fortemente relacionadas com a origem geográfica
106 dos isolados, sendo a divisão I, originária da Australásia e a divisão II das Américas.

107 Atualmente, *R. solanacearum* é considerada um complexo de espécies, sendo
108 classificada em filotipos (I-IV) e sequevares (1-51) pelo sequenciamento da região ITS
109 (16S-23S rRNA) e dos genes *hrpB* e da endoglucanase, respectivamente; linhagens clonais
110 e biotipos. Existe correlação entre filotipo e biotipo, sendo este determinado pela utilização
111 de carboidratos e alcoóis (Fegan e Prior 2005).

112 Nas mesorregiões do Agreste e da Mata do estado de Pernambuco, Nordeste do
113 Brasil, a ocorrência da murcha bacteriana do pimentão tem grande importância.
114 Considerando a ausência de pesquisas sobre a variabilidade dessas populações de *R.*
115 *solanacearum* e o difícil controle da doença, o conhecimento da diversidade deste
116 patógeno é uma prioridade. Portanto este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade
117 de *R. solanacearum* com base em características bioquímicas, de virulência, moleculares e
118 genéticas.

119

120 MATERIAL E MÉTODOS

121

122 **Isolados de *Ralstonia solanacearum* e cultivo**

123 Plantas de pimentão com sintomas de murcha bacteriana foram coletadas nos
124 principais municípios produtores das mesorregiões do Agreste (Bezerros, Camocim de S.
125 Félix, Caruaru, Garanhuns e Sairé) e da Mata (Chã Grande) de Pernambuco, no período de
126 janeiro a outubro de 2008. Os isolamentos de *R. solanacearum* foram realizados conforme
127 metodologia descrita por Mariano e Silveira (2005). A identificação preliminar dos
128 isolados foi realizada pela observação das culturas em meio TZC (tetracloreto de trifenil
129 tetrazólio), no qual são formadas colônias circulares irregulares, fluidas, com consistência
130 cremosa e de coloração branca (Kelman 1954). Posteriormente, os 77 isolados obtidos
131 foram preservados em água esterilizada e por liofilização (Mariano e Silveira 2005).
132 Adicionalmente três isolados foram utilizados como padrões: FIO181C2 e RS18
133 provenientes do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas - INPA (Manaus, AM, Brasil)
134 e da Embrapa Hortaliças (Brasília, DF, Brasil), respectivamente; e o isolado tipo da espécie
135 IBSBF292 (= ICMP 1727) da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico
136 (Campinas, SP, Brasil).

137 O inóculo de *R. solanacearum* foi preparado a partir do crescimento dos isolados
138 em meio TZC por 48 h a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. As suspensões bacterianas em água
139 destilada foram ajustadas em fotocolorímetro (Analyser 500 M, São Paulo, SP, Brasil) na
140 absorvância de $A_{570} = 0,54$, que corresponde à concentração de 5×10^8 UFC mL⁻¹, de
141 acordo com equação previamente determinada.

142

143 **Caracterização bioquímica dos isolados**

144 Os 80 isolados de *R. solanacearum* foram caracterizados bioquimicamente pelos
145 seguintes testes: coloração de Gram, solubilidade em hidróxido de potássio, oxidase,
146 catalase, hidrólise do amido, hidrólise da gelatina, atividade de esterase (hidrólise do

147 Tween), redução do nitrato, crescimento em meio contendo 2% de cloreto de sódio e
148 hipersensibilidade em folhas de fumo, como descrito por Coelho Netto et al. (2003). Para
149 determinação da biovar foi utilizado meio mínimo ou basal contendo 1% das fontes de
150 carbono: maltose, lactose, celobiose, manitol, sorbitol e dulcitol. Para determinação do
151 biotipo foi usado meio mínimo de Ayers contendo 1% dos carboidratos: malonato,
152 trealose, inositol e hipurato. Nos dois meios, os carboidratos foram esterilizados por
153 filtração. Após a inoculação, as culturas foram incubadas por 14 dias a 28°C (Fegan e Prior
154 2005). Os testes bioquímicos foram repetidos duas vezes.

155

156 **Caracterização da virulência**

157 Foram inoculados em plantas de pimentão (cv. Atlantis), tomate (cv. Santa Clara) e
158 berinjela (cv. Florida Market) os 80 isolados de *R. solanacearum*. Todas as espécies foram
159 semeadas e cultivadas em vasos plásticos com capacidade para 500 g, contendo solo
160 natural:substrato Basaplant[®] (Base Agro Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil)
161 (1:3, v:v) até os 21 dias. As plântulas foram inoculadas individualmente, fazendo-se com
162 auxílio de um bisturi inserido no substrato, corte em formato de meia lua no sistema
163 radicular, no qual foram depositados 15 mL da suspensão bacteriana (Coelho Netto et al.
164 2003). As testemunhas foram tratadas apenas com água destilada esterilizada. As plantas
165 foram irrigadas conforme necessário e mantidas em casa de vegetação onde a temperatura
166 variou entre 20 e 44°C e a umidade relativa entre 30 e 89%. A avaliação foi realizada
167 diariamente, durante 15 dias, determinando-se: a) período de incubação (PI), determinado
168 pelo número de dias entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença; b)
169 severidade (SEV) avaliada com auxílio de escala de notas descritiva de 0 a 4 (Nielsen e
170 Haynes 1960), onde: 0 = ausência de sintomas, 1 = plantas com 1/3 das folhas murchas, 2
171 = plantas com 2/3 das folhas murchas, 3 = plantas totalmente murchas e 4 = plantas

172 mortas; c) área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), calculada pela
173 expressão: $AACPD = [\sum (y_i + y_{i+1}) / 2 \cdot d_{ii}] / n$, onde y_i e y_{i+1} são os valores da severidade
174 observados nas avaliações consecutivas, d_{ii} é o intervalo entre as avaliações e n é a duração
175 do período de avaliação (Fry 1978).

176 Para cada tipo de hospedeiro, o delineamento experimental foi inteiramente
177 casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída de uma planta por
178 vaso.

179

180 **Caracterização molecular dos isolados**

181 Para a caracterização molecular dos isolados, inicialmente foi realizada a extração
182 do DNA genômico total de culturas com 48-72 h crescidas em NYDA (Ágar nutritivo-
183 extrato de levedura-dextrose) de acordo com Silveira et al. (2005). A concentração dos
184 DNAs foi estimada através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, juntamente com
185 marcador Low DNA Mass Ladder (InvitrogenTM, Carlsbad, CA, EUA) visualizando-se
186 através de fotodocumentador (Vilber Lourmat DP-CF-011.C, Eberhardzell, Baden-
187 Württemberg, Alemanha). A concentração foi ajustada para 20 ng μL^{-1} e armazenada a
188 4°C, até o momento da utilização.

189 A confirmação da espécie e dos filotipos foi realizada utilizando PCR multiplex,
190 baseado na sequência da região ITS. Para confirmação da espécie foi utilizado o par de
191 primers 759/760 (Bioneer Corporation, Taejon, Coréia do Sul) que produz uma banda de
192 280 pb para *R. solanacearum*, BDB (Blood Disease Bacterium) e *Ralstonia syzygii* (Roberts
193 et al.) Vanechoutte et al. Para a identificação dos filotipos foram usados quatro primers
194 Nmult21:1F, Nmult21:2F, Nmult23:AF, Nmult22:InF, um primer reverso espécie específico
195 Nmult22:RR. Essa reação produz fragmentos de 144 pb em isolados pertencentes ao
196 filotipo I, fragmento de 372 pb para o filotipo II, fragmento de 91 pb para o filotipo III e

197 fragmento amplificado de 213 pb para o filotipo IV (Fegan e Prior 2005). A reação de
198 amplificação foi realizada em termociclador (PTC-100, MJ-Research. Inc., Watertown,
199 EUA) com programa composto por desnaturação inicial a 96°C por 5 min, 30 ciclos de
200 94°C por 15 s, 59°C por 30 s e 72°C por 30s e uma extensão final de 72°C por 10 min. Os
201 produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5%, visualizados e
202 fotodocumentados após coloração com SyBRGold (InvitrogenTM, Carlsbad, CA, EUA). Os
203 tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação com o marcador
204 molecular 100 pb DNA Ladder (InvitrogenTM).

205 A caracterização molecular dos isolados de *R. solanacearum* foi realizada pelas
206 técnicas de Amplificação de Sequências baseadas na Repetitividade do DNA (Rep-PCR) e
207 pela técnica de amplificação ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Na Rep-PCR dos
208 isolados de *R. solanacearum* com os marcadores BOX-A1R (5' CTA CGG CAA GGC
209 GAC GCT GAC 3'), REP 1-I (5' III CGI CGI CAT CIG GC 3') e REP2-I (5' ICG ITT
210 ATC IGG CCT AC 3') foi utilizado o protocolo descrito por Louws et al. (1994). A
211 reação de amplificação com volume final de 15 µl foi composta de 1X de tampão da *taq*
212 polimerase (500mM KCl, 100 mM Tris HCl), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2
213 µM do primer e 1U de *taq* polimerase. A reação foi realizada em termociclador com o
214 programa: desnaturação inicial a 95° C por 8 min, 30 ciclos de 94° C por 1 min, 52° C por
215 1 min (BOX-A1R) ou 40° C (REP2-I) e 65° C por 8 min e uma extensão final de 65° C por
216 15 min. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5%, visualizados e
217 fotodocumentados após coloração com SyBRGold. Os tamanhos dos fragmentos
218 amplificados foram estimados por comparação com o marcador molecular 100 pb DNA
219 Ladder. As imagens dos géis foram analisadas quanto à presença (1) ou ausência (0) de
220 bandas e os padrões atribuídos foram analisados no software NTSYS-PC (v. 2.1) (Exeter
221 Software, Setaukaat, NY, EUA).

222 Setenta isolados foram caracterizados pela técnica de ISSR. Para isso três primers
223 foram utilizados: GTG5 (5'GTG GTG GTG GTG GTG3'), GACA (5'GAC AGA CAG
224 ACA GAC A3') e 820 (5'GTG TGT GTG TGT GTG TC3') (InvitrogenTM). A PCR foi
225 realizada em termociclador com o programa: desnaturação inicial 95° C por 5 min, 30
226 ciclos de 94° C por 30s, 45°C (820) ou 52° C (GTG5 e GACA) por 45 s, 72° C por 2 min e
227 uma extensão final de 72° C por 7 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de
228 agarose 1,5%, visualizados e fotodocumentados após coloração com SyBRGold. Os
229 tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação com o marcador
230 molecular 100 pb DNA Ladder. As imagens dos géis foram analisadas quanto à presença
231 ou ausência de bandas e os padrões atribuídos foram analisados no software NTSYS-PC
232 (v. 2.1).

233

234 **Diversidade genotípica**

235 A diversidade genotípica da população de isolados de *R. solanacearum* das
236 mesorregiões do Agreste e Mata de Pernambuco e de cada município amostrado (Bezerros,
237 Camocim de S. Félix, Caruaru, Chã Grande, Garanhuns e Sairé) foi estudada utilizando os
238 padrões de bandas obtidos através do Rep-PCR, marcadores REP e BOX, sendo avaliado o
239 número de genótipos observados e como eles se distribuíram pela população, diferindo em
240 riqueza, igualdade e diversidade (Grünwald et al. 2003).

241 Os índices de diversidade genotípica calculados foram os de Stoddart e Taylor ($G =$
242 $1/\sum p_i^2$) e de Hill (N_1). O índice $N_1 = e^{H'}$, sendo que H' se refere ao índice de Shannon-
243 Wiener onde $H' = \{-\sum_i [p_i \times \ln(p_i)]\}$, e p_i é a frequência observada do i^{th} genótipo. N_1
244 representa o número de genótipos igualmente comuns que podem produzir a mesma
245 diversidade. Diferenças de N_1 e G entre as populações foram testadas com bootstrapping
246 usando 1.000 reamostragens com intervalo de confiança de 95% (Grünwald et al. 2003).

247 Também foram calculadas a riqueza e igualdade genotípica. A riqueza é expressa
248 pelo número de genótipos esperados na amostra e foi avaliada usando o método de
249 rarefação. Este método assume que o número esperado de genótipos em uma amostra
250 aleatória de n indivíduos, dentro de uma amostra total de N indivíduos, onde n_i
251 corresponde ao número de indivíduos por genótipo é $E(g_n)$. O valor de $E(g_n)$ baseia-se na
252 soma das probabilidades de que cada genótipo seja incluído na amostra. Para contrastar a
253 riqueza das populações dos diferentes municípios foi estimado o $N=5$, que foi o menor
254 tamanho de amostra de populações estudado. As estimativas de rarefação foram obtidas
255 após compilação do algoritmo <Rarefac.c> (Grünwald et al., 2003).

256 A igualdade (E_5) indica como o genótipo foi distribuído na amostra, sendo
257 calculada pelo índice de Ludwig e Reynolds (1988), pela fórmula $E_5 = (G-1)/(N_1-1)$. O
258 índice de igualdade é calculado com base no número de genótipos observados, riqueza e
259 valores de G e N_1 . Conforme aumenta a igualdade em uma riqueza constante, aumentam os
260 índices de G e N_1 . O índice de igualdade varia entre 0 e 1, sendo que, em uma máxima
261 igualdade $N_1=G=g=1$ (Grünwald et al. 2003).

262 Todos os índices foram calculados usando o software R 2.10.1 (Kurt Hornik,
263 Áustria).

264

265 **Análises estatísticas**

266 Os dados de caracterização da virulência foram submetidos a um procedimento
267 multivariado visando identificar os grupos de isolados pela análise de agrupamento com o
268 algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Methods with Arithmetic Mean), com o auxílio
269 do programa STATISTICA 8.0 for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Os perfis
270 obtidos na caracterização molecular foram analisados a partir da conversão dos dados de
271 restrição (ou fragmentos produzidos no Rep-PCR) em dados binários (1 = presença e 0 =

272 ausência do fragmento). Comparando-se os isolados aos pares, foram calculados os
273 coeficientes de similaridade de Jaccard, a partir do procedimento SIMQUAL do programa
274 computacional NTSYS-PC (v. 2.1). Um dendrograma foi construído usando-se o método
275 UPGMA do mesmo programa para a determinação dos grupos de similaridade.

276

277 **RESULTADOS**

278

279 **Caracterização bioquímica dos isolados**

280 Os 77 isolados obtidos de pimentão no Estado de Pernambuco, juntamente com os
281 isolados RS18, FIO181C2 e o isolado tipo IBSBF292, apresentaram resultados iguais nos
282 testes bioquímicos realizados. Todos foram Gram-negativos, formaram colônias circulares
283 irregulares, fluidas, com consistência cremosa e de coloração branca em meio TZC. Foram
284 positivos para solubilidade em hidróxido de potássio, oxidase, catalase, atividade de
285 esterase, redução do nitrato e hipersensibilidade em folhas de fumo. Neste último teste,
286 houve apenas uma exceção, o isolado CGH34 que apresentou resposta de
287 hipersensibilidade negativa. Os isolados apresentaram resultados negativos para hidrólise
288 do amido e crescimento em meio contendo 2% de cloreto de sódio e fraca hidrólise da
289 gelatina.

290 Dos 77 isolados, 75 foram identificados como pertencentes ao biovar 3,
291 similarmente ao RS18, entretanto os isolados CGM11 e CGH36, coletados no município
292 de Chã Grande, foram identificados como pertencentes ao biovar 1, juntamente com os
293 isolados FIO181C2 e IBSBF292 (Tabela 1). Setenta e seis isolados foram identificados
294 como pertencentes ao biotipo 8, assim como o RS18. No entanto, o isolado CGM11 foi
295 identificado como pertencente ao biotipo 6 e o isolado CGH36 ao biotipo 3, assim como o
296 FIO181C2 e IBSBF292.

297

298 **Caracterização da virulência dos isolados**

299 A maioria dos isolados avaliados neste estudo foram patogênicos aos hospedeiros
300 pimentão, tomate e berinjela com sintomas típicos da doença observados de 4,0 a 14,8 dias
301 em pimentão; de 2,0 a 14,5 dias em tomate e de 5,0 a 16,0 dias em berinjela (Tabela 2). A
302 severidade aos 15 dias variou de 0 a 4 para pimentão, tomate e berinjela. A área abaixo da
303 curva de progresso da doença variou de 0,4 a 39,0 em pimentão; de 1,1 a 49,5 em tomate e
304 de 0 a 29,3 em berinjela.

305 Utilizando o conjunto das variáveis avaliadas em todos os hospedeiros, ou seja,
306 período de incubação, severidade da murcha bacteriana aos 15 dias após a inoculação e
307 área abaixo da curva de progresso da doença, a análise multivariada por UPGMA, permitiu
308 a separação dos isolados de *R. solanacearum* em 11 grupos de similaridade quando
309 considerada a distância de ligação média = 16, que correspondeu a cerca de 50% da
310 distância total verificada (Figura 1). Os grupos 1 e 2 foram formados por 34 e 24 isolados,
311 os grupos 2 e 11 por dois isolados cada um, enquanto os grupos 7, 8, 9 e 10 por apenas um
312 isolado cada um. Os grupos 4, 5 e 7 foram formados por 5, 3 e 6 isolados, respectivamente.

313

314 **Caracterização molecular dos isolados**

315 Todos os isolados apresentaram banda com tamanho de aproximadamente 280 pb,
316 confirmando a espécie *R. solanacearum*. Dos 77 isolados de Pernambuco, 75 foram
317 identificados como pertencentes ao filotipo I, por apresentarem uma banda com
318 aproximadamente 144 pb (referente ao filotipo) (Figura 2). Entretanto, CGH36 e CGM11,
319 coletados no município de Chã Grande foram identificados como filotipo II, juntamente
320 com FIO181C2, e o isolado tipo IBSBF292 (Tabela1).

321 A análise de agrupamento obtida pelos dados combinados dos marcadores REP e
322 BOX permitiu a separação em quatro grupos de similaridade quando considerado o
323 coeficiente de 75% (Figura 3). O grupo I foi composto por 73 isolados, incluindo CGM11
324 e FIO181C2. O grupo II foi formado por três isolados, GH8, CGH36 e IBSBF292. O grupo
325 III foi constituído por dois isolados do município de Bezerros e o Grupo IV por dois
326 isolados do município de Chã Grande. No entanto, esses marcadores não permitiram
327 separar os isolados por biovares, biotipos, filotipos ou áreas de coleta.

328 Nas análises de ISSR, usando os primers 820, GTG5 e GACA isoladamente,
329 resultados similares ao Rep-PCR foram obtidos. Foi observada alta similaridade e não
330 separação dos isolados por biovares, biotipos, filotipos ou áreas de coleta. O primer 820 foi
331 o que evidenciou maior similaridade entre os isolados. A análise do cluster gerado com os
332 dados deste primer mostrou a existência de três grupos distintos ao nível de similaridade de
333 75%. A análise de agrupamento obtida pelos dados combinados dos primers 820, GTG5 e
334 GACA, permitiu a separação dos isolados de *R. solanacearum* em cinco grupos distintos
335 ao nível de similaridade de 75% (Figura 4). O grupo I foi formado por 28 isolados, o grupo
336 III formado por 39 isolados incluindo os isolados CGH36 e FIO181C2 e os grupos II, IV e
337 V, formados por um isolado cada, respectivamente, CGM15, CAR20 e CGM13.

338 Os dados da caracterização molecular confirmam a similaridade entre a maioria dos
339 isolados das mesorregiões Agreste e Mata de Pernambuco, também observada nos testes
340 bioquímicos. No entanto, a caracterização da virulência indicou alta variabilidade com
341 isolados de uma mesma área em diferentes grupos.

342

343 **Diversidade genotípica**

344 Foram encontrados 39 genótipos diferentes (RS1 a RS39), em uma população total
345 de 77 isolados de *R. solanacearum* proveniente das duas mesorregiões do estado de

346 Pernambuco (Tabela 3). A diversidade genotípica da população total foi de 50,65% da
347 possibilidade máxima, onde cada isolado representa um genótipo. Vinte e oito genótipos
348 apareceram apenas uma vez na população total, enquanto o genótipo mais frequente esteve
349 presente trezes vezes. Os genótipos com frequência maior que 1 foram 11. Dentre esses, o
350 genótipo RS1 foi encontrado em três municípios (Bezerros: isolados B5-4, B5-8, B5-10,
351 B5-29 e B5-30; Chã Grande: CG2-2, CG2-27, CGH20; e Garanhuns: GH3); o genótipo
352 RS6 foi encontrado em quatro municípios (Bezerros: isolados B5-21, B5-24, B5-27, B5-
353 28; Chã Grande: CGH3, CGH16, CGH26, CGH28, CGH32, CGH41; Camocim de São
354 Félix: C3-11, C6-25 e Garanhuns: GH16); e o genótipo RS10 em quatro municípios
355 (Caruaru: isolado CAR6; Chã Grande: CG2-17; Garanhuns: GH10 e GH12; e Sairé:
356 SCN21 e SCN28).

357 Os valores dos índices de diversidade de Hill (N_1) e Stoddart e Taylor's (G), que
358 comparam entre 1 e o total da amostra avaliada, evidenciaram a diversidade moderada, de
359 33,22 e 20,65% ($N_1 = 25,58$; $G = 15,90$) respectivamente, na população total das duas
360 mesorregiões (Tabela 3). No entanto, observou-se alta diversidade genotípica dentro dos
361 municípios de Sairé ($n=7$; $N_1 = 4,71$ ou 67,29%; $G = 4,45$ ou 63,57%), Camocim de São
362 Félix ($n=6$; $N_1 = 3,78$ ou 63%; $G = 3,6$ ou 60%), Caruaru ($n=15$; $N_1 = 10,98$ ou 73,2%; $G =$
363 $9,78$ ou 65,2%) e Garanhuns ($n=5$; $N_1 = 3,79$ ou 75,8%; $G = 3,57$ ou 71,4%), tendo este
364 último apresentado a maior diversidade.

365 Analisando-se a igualdade da população total dos isolados de *R. solanacearum* nas
366 duas mesorregiões verificou-se que os índices de diversidade ($G=15,90$ e $N_1=25,58$) e
367 riqueza ($g=39,0$) não foram próximos e portanto, apesar da população total ter uma
368 diversidade moderada, apresentou pouca igualdade ($G/g_{obs} = 0,408$) (Tabela 3). Na
369 avaliação por municípios observou-se que os valores de igualdade foram altos dentro de
370 cada município, entre 0,82 e 0,90 (G/g_{obs}), exceto para Bezerros e Chã Grande, com índice

371 de igualdade de $G/g_{obs} = 0,60$ e $0,66$, respectivamente. Analisando-se os intervalos de
372 confiança dos índices de diversidade, verificou-se que os isolados dos municípios de
373 Bezerros, Camocim de São Félix, Garanhuns e Sairé, não diferiram entre si, pois os
374 intervalos referentes à G se sobrepõem, o que não acontece com Caruaru, Chã Grande e
375 população total, indicando que diferem dos demais municípios.

376

377 **DISCUSSÃO**

378 Este é o primeiro estudo sobre diversidade de população de *R. solanacearum* de
379 pimentão no Brasil. As análises bioquímicas, de virulência, moleculares e genotípicas
380 realizadas provêm subsídios importantes sobre a variabilidade do patógeno nos
381 municípios produtores das mesorregiões do Agreste e da Mata de Pernambuco.

382 Os isolados obtidos de plantas com sintomas de murcha apresentaram os mesmos
383 perfís bioquímicos, corroborando com resultados observados para isolados de *R.*
384 *solanacearum* provenientes de batata (Nouri, Bahar e Fegan 2008). A ausência de reação
385 de hipersensibilidade (RH) em fumo pelo isolado CGH34 pode ter ocorrido porque, apesar
386 da RH positiva ocorrer entre associações patógeno-hospedeiro incompatíveis (Mariano e
387 Silveira 2005), há isolados que não seguem este padrão e devem ser testados em outros
388 hospedeiros. Segundo Denny & Hayward (2001), uma das características que identifica a
389 espécie *R. solanacearum* (isolados não patogênicos ao fumo) é a RH positiva. No entanto,
390 Alfenas et al. (2006) verificaram que de 49 isolados deste patógeno, provenientes de
391 viveiros de eucalipto, apenas 27 induziram RH em folhas de fumo.. Além disto, isolados de
392 *R. solanacearum* biovars 3 e 4, provenientes de diferentes hospedeiros, variaram quanto à
393 velocidade de RH em fumo (Horita e Tsuchiya 2001).

394 Alta predominância da biovar 3 e biotipo 8 de *R. solanacearum* foi observada nas
395 populações analisadas. Também Silveira et al. (1998) encontraram uma predominância de

396 78% da biovar 3 em isolados de *R. solanacearum* no município de Camocim de São Félix,
397 embora os mesmos fossem obtidos de tomate. A presença das biovars 1 e 3 neste
398 município já havia sido previamente descrita por Mariano et al. (1997) em isolados
399 provenientes de tomateiro. Considerando-se que o patógeno é habitante do solo e sua
400 disseminação não ocorre tão facilmente no mesmo ciclo de cultivo, é compreensível que a
401 predominância da biovar 3 na área tenha sido detectada desde 1997 (Mariano et al. 1997).
402 É comum a predominância de uma biovar em uma determinada área, dependendo da sua
403 fonte de inóculo inicial, modo de disseminação e clima da região. As biovars 1 e 2 são as
404 mais amplamente distribuídas; a biovar 1 predomina nas regiões de clima quente; a biovar
405 2 em regiões de clima temperado e a biovar 3 está mais adaptada às regiões quentes dos
406 trópicos (Hayward 1991). Esta última é mais versátil na adaptação em ambientes de
407 condições variadas e é menos influenciada pelos fatores edáficos (Kumar, Sarma e
408 Anandaraj 2004).

409 No Brasil, a biovar 1 de *R. solanacearum* existe em todas as regiões do país, a
410 biovar 2 predomina nas regiões de climas amenos, Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e a biovar
411 3 predomina nas regiões Norte e Nordeste, de clima mais quente (Reifschneider e Takatsu
412 1985). No Amazonas, a relação biovar-específica foi evidenciada com a maior incidência
413 de murcha bacteriana associada à biovar 1 em tomateiro e à biovar 3 em pimentas do
414 gênero *Capsicum* (Coelho Netto et al. 2003 e 2004). Já nas Filipinas, as biovars 3 e 4
415 foram predominantes em isolados de berinjela da raça 1, em diferentes províncias (Ivey et
416 al. 2007).

417 A berinjela foi o único hospedeiro que não apresentou susceptibilidade a todos os
418 isolados de *R. solanacearum*, como evidenciado pelo período de incubação de 16 dias, que
419 significa ausência de doença (Iamsupasit 1993). Embora obtidos de pimentão, os isolados
420 do patógeno foram mais virulentos ao tomate do que ao pimentão e berinjela, apresentando

421 no primeiro hospedeiro os menores períodos de incubação e maiores áreas abaixo da curva
422 de progresso da doença. No entanto, uma maior virulência de *R. solanacearum* ao
423 hospedeiro de origem foi constatada em outros estudos (Silveira et al. 2011; Coelho Netto
424 et al. 2003).

425 A distribuição dos isolados de uma mesma área de coleta em diferentes grupos de
426 similaridade pela análise multivariada por UPGMA das variáveis de virulência indicou a
427 ocorrência de alta variabilidade entre os isolados dentro das áreas, semelhante ao
428 verificado no estudo de Silveira et al. (1998). Em Pernambuco, estes autores utilizando
429 índice de murcha, período de incubação e período de latência separaram 28 isolados de *R.*
430 *solanacearum* das biovars 1 e 3 de tomate em cinco grupos de similaridade confirmando a
431 variabilidade dos mesmos, mas não conseguiram correlacionar virulência com biovar.

432 Os isolados de *R. solanacearum* classificados como biovar 3 foram identificados
433 como pertencentes ao filotipo I e os isolados da biovar 1 foram identificados como filotipo
434 II, confirmando a classificação de Fegan e Prior (2005). Também foi confirmada a relação
435 biotipo-filotipo encontrada por Fegan e Prior (2005), ratificando a possibilidade do uso
436 destes testes bioquímicos para identificação preliminar de filotipos.

437 A maioria dos isolados analisados no presente trabalho pertence ao filotipo I, o que
438 não era esperado, uma vez que ele corresponde à Divisão 1 (Cook et al. 1991) cujos
439 isolados são provenientes principalmente da Ásia. Torna-se complexo explicar a presença e
440 predominância do filotipo I em populações de *R. solanacearum* em duas solanáceas,
441 pimentão no presente trabalho e tomate por Silveira et al. (1998), nesta Região de
442 Pernambuco; bem como em pimentas no Amazonas (Coelho Netto et al. 2003 e 2004). É
443 realmente difícil desvendar com segurança quando e como estes isolados foram
444 introduzidos no Brasil. Sabe-se que a imigração asiática foi significativa e que colônias
445 japonesas de agricultores se estabeleceram em vários pontos do país, inclusive no

446 município de Bonito, próximo a Camocim de S. Félix, Pernambuco. Por outro lado, em
447 geral, a transmissão de *R. solanacearum* por sementes não é importante em pimentão, mas
448 ocorre em tomate, berinjela e amendoim (Momol et al. 2008). Interessantemente Xu et al.
449 (2009) também não conseguiram explicar como se deu, na China, a introdução de vários
450 isolados pertencentes ao filotipo I (Divisão 2, cujos isolados são provenientes
451 principalmente das Américas). Dentre estes isolados do filotipo I, oito eram de pimenta,
452 dos quais seis pertenciam à biovar 3 e dois à biovar 4.

453 O filotipo I foi detectado nas mesorregiões do Agreste e da Mata de Pernambuco,
454 caracterizadas por apresentarem clima tropical chuvoso, com verão seco. Este dado
455 concorda com o obtido por Toukam et al. (2009) que detectaram o filotipo I em regiões de
456 várzea, quentes e úmidas de Camarões.

457 Neste trabalho, a distribuição dos isolados de *R. solanacearum* de uma mesma área
458 de coleta em diferentes grupos de similaridade através do Rep-PCR e ISSR, mostrou alta
459 similaridade entre os isolados de áreas diferentes, porém não foi possível a separação de
460 isolados de biovars, biotipos ou filotipos usando estes marcadores. Estudos com isolados
461 da região amazônica brasileira utilizando o primer BOX, separaram isolados das biovars 1
462 e 3 de tomate, da biovar N2, mostrando assim a homogeneidade dessa última. Não foi
463 verificada, entretanto, correlação entre o perfil genômico, local de coleta e ecossistema de
464 origem dos isolados (Costa, Ferreira e Lopes 2007). Nas Filipinas, caracterização por
465 ERIC-PCR de *R. solanacearum* de berinjela, não evidenciou correlação entre perfís
466 genotípicos e classificação de biovar (Ivey et al. 2007). Também não foi observada
467 associação entre variabilidade genotípica e agressividade da raça 1 proveniente de tomate,
468 por Jaunet e Wang (1999), os quais concluíram que a análise de população baseando-se
469 apenas em marcadores neutros não é suficiente para explicar a diversidade de *R.*
470 *solanacearum*.

471 As análises dos índices de diversidade genotípica confirmaram a variabilidade dos
472 isolados de *R. solanacearum* dentro de cada área, porém quando se levou em consideração
473 a população total, a variabilidade encontrada foi moderada quando comparada com o
474 número total de genótipos observados e número de isolados estudados. Isto pode ser
475 verificado analisando os índices de Stoddart e Taylor's *G* e Shannon e Wiener's *H'*, pois
476 estes índices levam em consideração a riqueza (número de genótipos na população), a
477 igualdade (como o genótipo se distribui na população) e o número total da população
478 (Grünwald et al. 2003).

479 Coletta-Filho e Machado (2002) usando o mesmo índice de diversidade *G*
480 observaram a evolução e diversidade genética de populações de *Xylella fastidiosa* Wells de
481 diferentes variedades da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, levando em consideração que
482 o valor máximo de *G* é obtido quando todos os isolados mostram diferentes genótipos.
483 Pelo método de RAPD, foi verificado que a diversidade variou de 2,51 a 2,81 (3,5 a 3,9%,
484 respectivamente) enquanto usando marcadores VNTR (Variable Number of Tandem
485 Repeats) variou de 8,07 a 10,40 (11,2 a 14,4%, respectivamente), indicando baixa
486 diversidade entre os isolados.

487 O fato das populações de *R. solanacearum* analisadas neste trabalho apresentarem
488 em geral baixa a moderada diversidade, pode estar relacionado com o fluxo gênico dentro
489 dos municípios estudados, devido à disseminação do patógeno através de mudas e
490 rizosfera, ou mesmo de máquinas agrícolas que são utilizadas via aluguel entre municípios
491 e áreas. Baixa diversidade de isolados da biovar 3 provenientes de gengibre foi relatada por
492 Kumar, Sarma e Anandaraj (2004), que correlacionaram este fato tanto a pouca pressão de
493 seleção, devido à falta de cultivares resistentes a *R. solanacearum*, quanto à prevalência de
494 transmissão do patógeno pelo rizoma de um local para outro.

495 A análise das população de *R. solanacearum* obtidas de plantas de pimentão nas
496 mesorregiões do Agreste e da Mata de Pernambuco, Nordeste do Brasil, indicam
497 diversidade baixa a moderada com predominância do filotipo I, biovar 3, biotipo 8. Estas
498 informações podem direcionar futuras pesquisas visando estratégias adequadas de manejo
499 da murcha bacteriana nessa região, principalmente, melhoramento genético visando
500 resistência filotipo-específica à doença.

501

502 **AGRADECIMENTOS**

503 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela
504 concessão de bolsas de produtividade em pesquisa a Elineide Barbosa de Souza, Sami
505 Jorge Michereff e Rosa de Lima Ramos Mariano e à Coordenação de Aperfeiçoamento de
506 Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado a Alessandra de Lima Garcia.
507 À Cintia de Souza Bezerra pelo auxílio nas análises de diversidade.

508 **REFERÊNCIAS**

- 509 Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Sartório, R. C., Binoti, D. H. B., Silva, R. R., Lau, D. &
510 Vanetti, C. A. (2006). *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no
511 Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31, 357-366.
- 512 Cook, D., Barlow, E. & Sequeira, L. (1991). DNA probes as tools for the study of host-
513 pathogen evolution: the example of *Pseudomonas solanacearum*. In: Henneke, H.,
514 Verma, D.P.S. (Eds.), *Advances in molecular genetics of plant-interactions*, v.a. (pp.
515 103-108). Kluwer: The Netherlands.
- 516 Denny, T. P. & Hayward, A. C. (2001) *Ralstonia*. In: N. W. Schaad, J. B. Jones & W.
517 Chun (Eds.), *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3rd ed.
518 (pp. 151-174) Saint Paul: American Phytopathological Society.
- 519 Coelho Netto, R. A.; Pereira, B. G.; Noda, H. & Boher, B. (2003). Caracterização de
520 isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra
521 firme, no Estado do Amazonas. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 362-367.
- 522 Coelho Netto, R. A., Pereira, B. G., Noda, H. & Boher, B. (2004). Murcha bacteriana no
523 estado do Amazonas, Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 21-27.
- 524 Coletta-Filho, H. D. & Machado, M. A. (2002). Evaluation of the genetic structure of
525 *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* varieties. *Applied and*
526 *Environmental Microbiology*, 68, 3731-3736.
- 527 Costa, S. B., Ferreira, M. A. S. V. & Lopes, C. A. (2007). Diversidade patogênica e
528 molecular de *Ralstonia solanacearum* da região amazônica brasileira. *Fitopatologia*
529 *Brasileira*, 32, 285-294.
- 530 Fegan, M. & Prior, P. (2005). How complex is the *Ralstonia solanacearum* species
531 complex? In: Allen, C., Prior, P. & Hayward, A.C. (Eds.), *Bacterial wilt disease and*
532 *the Ralstonia solanacearum species complex*. (pp.449-461). St. Paul:APS Press.

533 Fry, W. E. (1978). Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide
534 effects for integrated control of potato late blight. *Phytopathology*, 68, 1650-1655.

535 Gillings, M. R. & Fahy, P. (1994). Genomic fingerprinting: Towards a unified view of the
536 *Pseudomonas solanacearum* species complex. In: A.C. Hayward & G.L. Hartman
537 (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas*
538 *solanacearum* (p. 95-112). Wallingford: CAB International.

539 Grover A., Azmi W., Gadewar, A. V., Pattanayak, D., Naik P. S., Shekhawat, G. S. &
540 Chakrabarti, S. K. (2006). Genotypic diversity in a localized population of *Ralstonia*
541 *solanacearum* as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. *Journal*
542 *of Applied Microbiology*, 101, 798-806.

543 Grünwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G. & Fry, W. E. (2003). Analysis of
544 genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93, 738-
545 746.

546 Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas*
547 *solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29, 65-87.

548 Hayward, A. C. (1964). Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied*
549 *Bacteriology*, 27, 265-277.

550 He, L.Y., Sequeira, L. & Kelman, A. (1983). Characteristics of strains of *Pseudomonas*
551 *solanacearum*. *Plant Disease*, 67, 1357-1361.

552 Horita, M. & Tsuchiya, K. (2001). Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia*
553 *solanacearum*. *Phytopathology*, 91, 399-407.

554 Iamsupasit, N., Chakraborty, S., Cameron, D. F. & Adkins, S. W. (1993). Components of
555 quantitative resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in tetraploid
556 accessions of the pasture legume *Stylosanthes hamata*. *Australian Journal of*
557 *Experimental Agriculture*, 33, 855-860.

- 558 Ivey, M. L. L., Gardner, B. B. M., Opina, N. & Miller, S. A. (2007). Diversity and
559 geographic distribution of *Ralstonia solanacearum* from eggplant in the Philippines.
560 *Phytopathology*, 97, 1467-1475.
- 561 Jaunet, T. X. & Wang, J. F. (1999). Variation in genotype and aggressiveness diversity of
562 *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology*, 89,
563 32-327.
- 564 Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to
565 colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, 44, 693-695.
- 566 Kumar, A., Sarma, Y. R. & Anandaraj, M. (2004). Evaluation of genetic diversity of
567 *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of ginger using REP-PCR and PCR-
568 RFLP. *Current Science*, 87, 1555-1561.
- 569 Lopes, C. A. & Quezado-Soares, A. M. (1997). *Doenças bacterianas das hortaliças -*
570 *Diagnose e controle*. Brasília: EMBRAPA-CNPq, (pp. 70).
- 571 Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. & Bruijn, F. J. (1994). Specific genomic
572 fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* cultivars and strains
573 generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental*
574 *Microbiology*, 60, 2286-2295.
- 575 Ludwig, J. A. & Reynolds, J. F. (1988). *Statistical ecology: A primer on methods and*
576 *computing*. (New York: John Wiley & Sons).
- 577 Mariano, R. L. R., Silveira, E. B. & Michereff, S. J. (1997). Studies on tomato bacterial
578 diseases in Pernambuco, Brazil. *Proceedings of the International Symposium on*
579 *Tropical Tomato Diseases* (pp. 156-159). Alexandria: International Society of
580 Horticultural Science.
- 581 Mariano, R. L. R. & Silveira, E. B. (Coord.) (2005). *Manual de práticas em*
582 *fitobacteriologia*. 2ª. Ed. (Recife, UFRPE)

583 Marques, A. S. A., Robbs, C. F., Boiteux, L. S. & Parente, P.M.G. (1994). *Índice de*
584 *fitobacterioses assinaladas no Brasil*. (Brasília: Embrapa/Cenargem)

585 Momol, T., Pradhanang, P. & Lopes, C. A. (2008). *Bacterial wilt of pepper*. Retrieved Dec
586 10, 2010, from EDIS: University of Florida IFAS Extension, (PP 189). Web Site:
587 <http://edis.ifas.ufl.edu>.

588 Nouri, S., Bahar, M. & Fegan, M. (2009). Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing
589 potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2T strains
590 outside South America, *Plant Pathology*, 58, 243-249.

591 Reifschneider, F. J. B. & Takatsu, A. (1985). *Pseudomonas solanacearum*. Aspectos
592 macro-epidemiológicos. *Fitopatologia Brasileira*, 10, 213.

593 Silveira, E. B.; Gomes, A. M. A.; Michereff, S. J. & Mariano, R. L. R. (1998). Variability
594 of *Ralstonia solanacearum* populations causing wilt on tomato in Agreste of
595 Pernambuco, Brazil. *Bacterial Wilt Newsletter*, 15, 8-10.

596 Silveira, E. B., Michereff, S. J., Tavares, L. A. & Mariano, R. L. R. (2011).
597 Caracterización de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* com base em
598 componentes epidemiológicos. *Interciencia*, 36, 4, 281-285.

599 Silveira, J. R. P., Duarte, V., Moraes, M. G., Oliveira, A. M. R., Barni, V. & Maciel, J. L.
600 N. (2005). Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas
601 de batata com murcha bacteriana, por PCR-Rep e RAPD. *Fitopatologia Brasileira*,
602 30, 615-622.

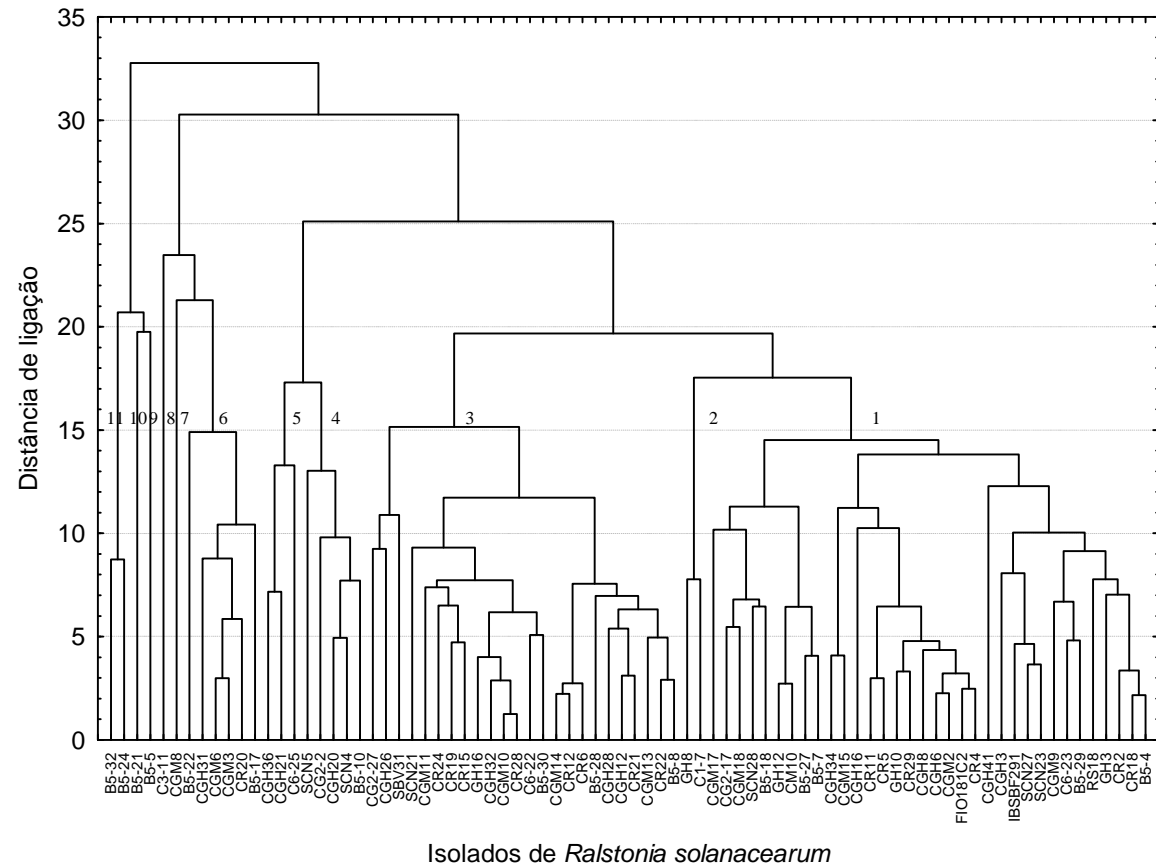
603 Takatsu, A. & Lopes, C. A. (1997). Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e
604 perspectivas de controle. *Horticultura Brasileira*, 15, 170-177.

605 Toukam, G. M. S., Cellier, G., Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C. & Prior, P.
606 (2009). Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. *Plant*
607 *Disease*, 93, 112-1130.

608 Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M. & Prior,
609 P. (2007). *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies)
610 exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 73,
611 6790-6801.

612 Xu, J., Pan, Z. C., Xu., J. S., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, L. Q., He, L. Y. & Feng, J.
613 (2009). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European*
614 *Journal of Plant Pathology*, 125, 641-653.

615



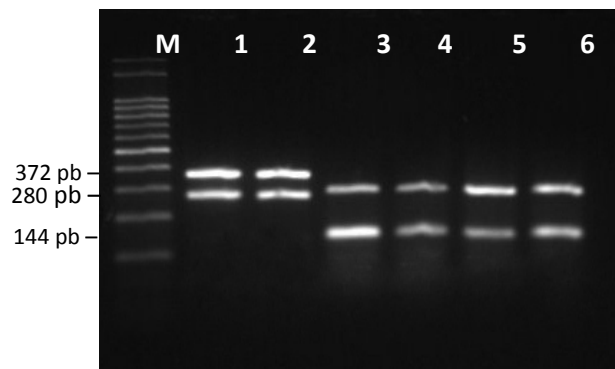
616

617 **Figura 1.** Agrupamento geral de 80 isolados de *Ralstonia solanacearum*, sendo 77 obtidos em diferentes áreas de cultivo de pimentão do estado
 618 de Pernambuco, Brasil e os isolados FIO181C2 proveniente do INPA (Manaus, AM, Brasil), RS18 proveniente da Embrapa Hortaliças
 619 (Brasília, DF, Brasil) e o isolado tipo da espécie IBSBF292 (= ICMP 1727), obtido da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto
 620 Biológico (Campinas, SP, Brasil), baseado na análise de agrupamento por UPGMA, considerando o período de incubação, a severidade da
 621 murcha bacteriana aos 15 dias após a inoculação e área abaixo da curva de progresso da doença, quando os isolados foram inoculados em
 622 pimentão, tomate e berinjela.

623

624

625



626

627 **Figura 2.** Produtos do PCR-multiplex, para identificação da espécie e filotipo de *Ralstonia*
628 *solanacearum* em gel de agarose 1,5%. Linhas: M- marcador molecular de 100 pb DNA
629 Ladder; 1- isolado tipo IBSBF292; 2- isolado FIO182C2; 3- isolado GH8; 4- isolado
630 CGH34; 5- isolado CGH41, 6- isolado CG2-27. Linhas 1 e 2 filotipo II; Linhas 3 a 6
631 filotipo I.

632

633

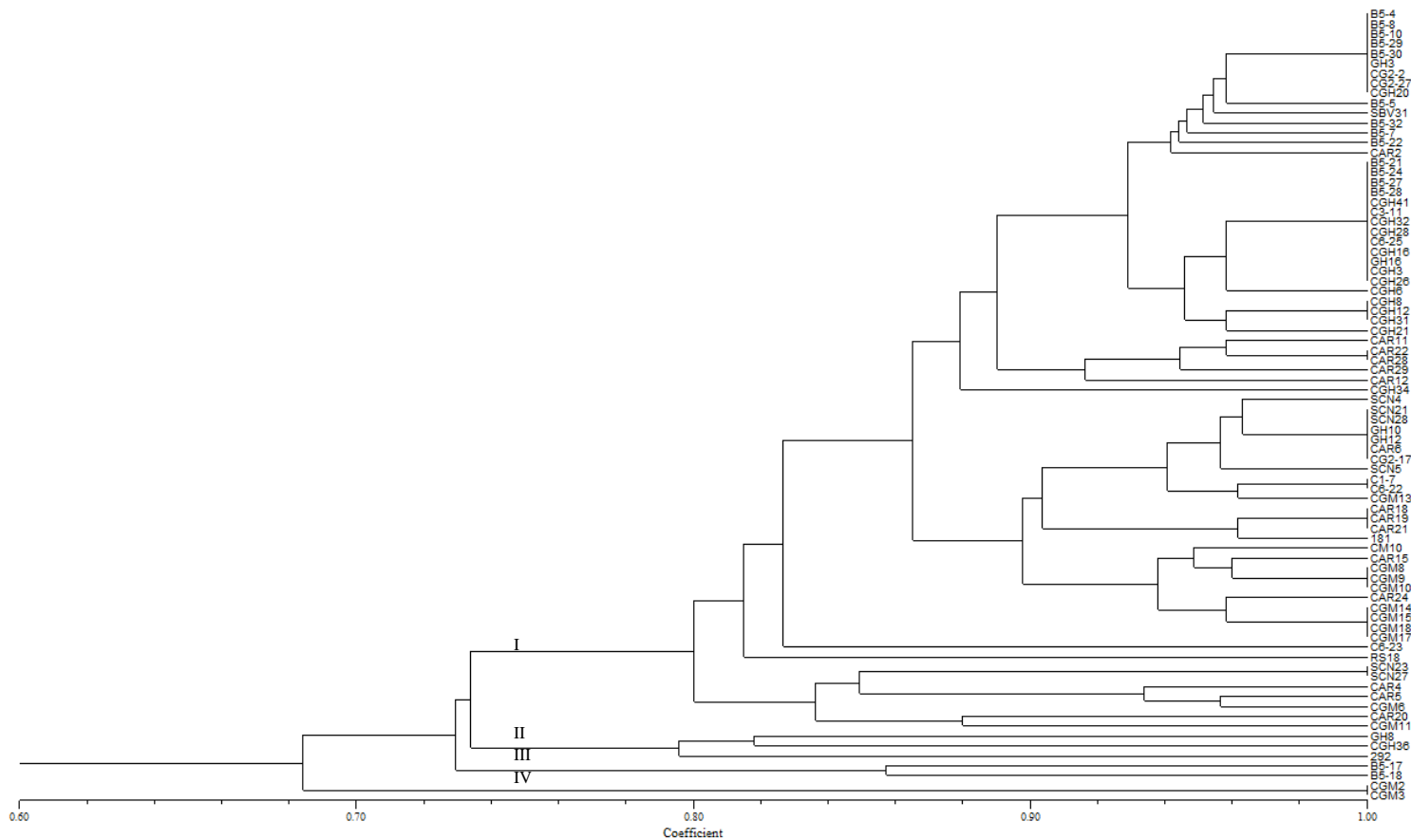
634

635

636

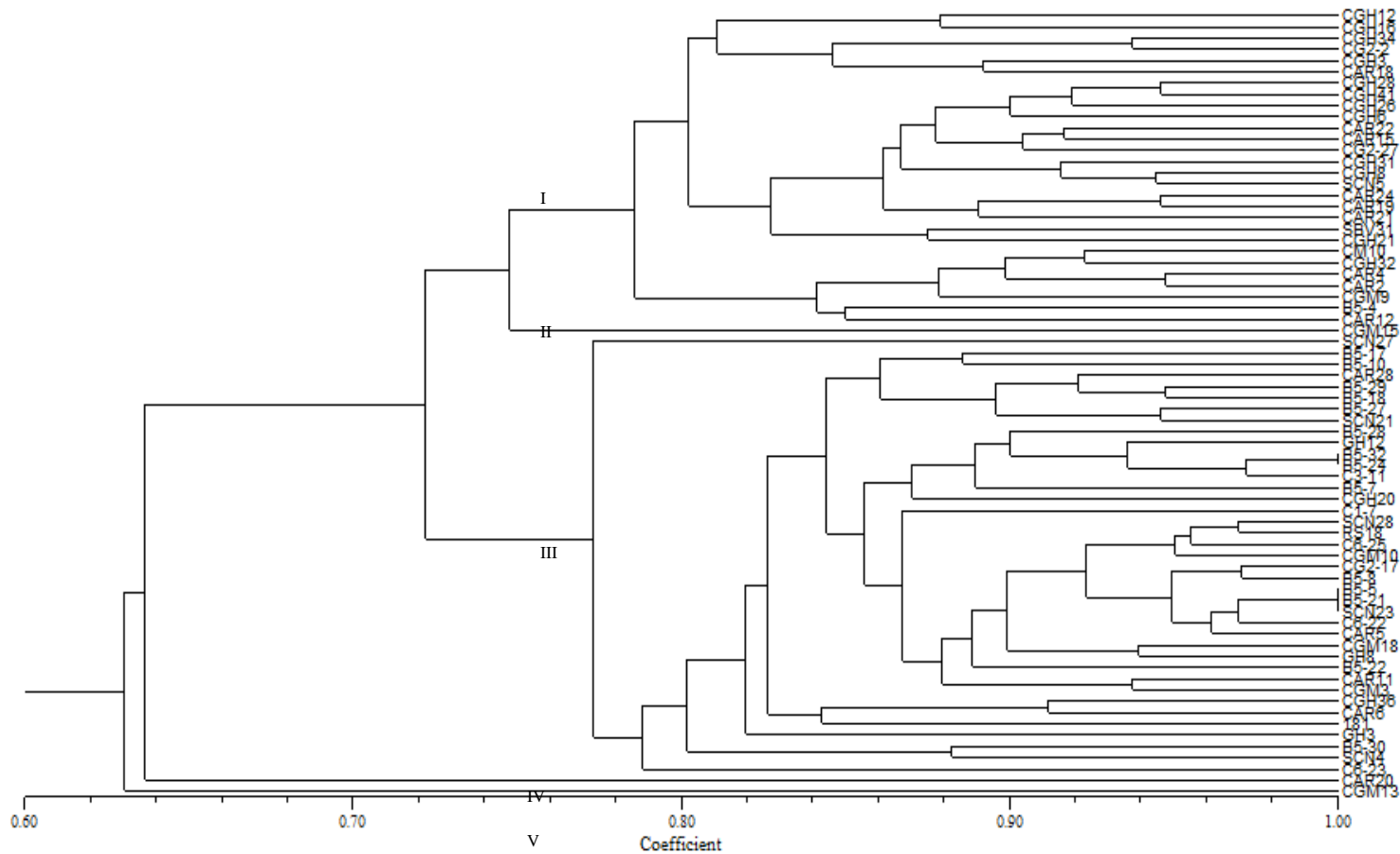
637

638



639

640 **Figura 3.** Dendrograma baseado no método UPGMA de acordo com os perfis gerados pela análise combinada de REP e BOX-
 641 PCR, mostrando a relação entre 80 isolados de *Ralstonia solanacearum*, sendo 77 obtidos em diferentes áreas de cultivo de
 642 pimentão do estado de Pernambuco, Brasil e os isolados FIO181C2 proveniente do INPA (Manaus, AM, Brasil), RS18 proveniente
 643 da Embrapa Hortaliças (Brasília, DF, Brasil) e o isolado tipo da espécie IBSBF292 (= ICMP 1727), obtido da Coleção de Culturas
 644 de Fitobactérias do Instituto Biológico (Campinas, SP, Brasil).



645

646 **Figura 4.** Dendrograma baseado no método UPGMA de acordo com os perfis gerados pela análise combinada de ISSR, mostrando
 647 a relação entre 70 isolados representativos de *Ralstonia solanacearum* obtidos em diferentes áreas de cultivo de pimentão do estado
 648 de Pernambuco, Brasil e os isolados FIO181C2 proveniente do INPA (Manaus, AM, Brasil) e RS18 proveniente da Embrapa
 649 Hortaliças (Brasília, DF, Brasil).

650 **Tabela 1.** Hospedeiro, origem geográfica, raça, biovar, biotipo e filotipo de isolados de *R.*
 651 *solanacearum* utilizados neste estudo.

Isolado ¹	Hospedeiro	Origem ²	Raça	Biovar	Biotipo	Filotipo
B5-4, B5-5, B5-7, B5-8, B5-10, B5-17, B5-18, B5-21, B5-22, B5-24, B5-27, B5-28, B5-29, B5-30 B5-32	Pimentão	Bezerros, PE	1	3	8	I
C1-7, C3-11, C6-22, C6-23, C6-25, CM10	Pimentão	Camocim de S. Félix, PE	1	3	8	I
CAR2, CAR4, CAR5, CAR6, CAR11, CAR12, CAR15, CAR18, CAR19, CAR20, CAR21, CAR22, CAR24, CAR28, CAR29	Pimentão	Caruaru, PE	1	3	8	I
CGM2, CGM3, CGM6, CGM8, CGM9, CGM10, CGM13, CGM14, CGM15, CGM17, CGM18, CGH3, CGH6, CGH8, CGH12, CGH16, CGH20, CGH21, CGH26, CGH28, CGH31, CGH32, CGH34, CGH41, CG2-2, CG2-17, CG2-27	Pimentão	Chã Grande, PE	1	3	8	I
CGM11	Pimentão	Chã Grande, PE	1	1	6	II
CGH36	Pimentão	Chã Grande, PE	1	1	3	II
GH3, GH8, GH10, GH12, GH16	Pimentão	Garanhuns, PE	1	3	8	I
SCN4, SCN5, SCN21, SCN23, SCN27, SCN28, SBV31	Pimentão	Sairé, PE	1	3	8	I
RS18	Tomate	Manaus, AM	1	3	8	I
FIO181C2	Berinjela	Parintins, AM	1	1	3	II
IBSBF292	Tomate	E.U.A	1	1	3	II

652

653 ¹ Todos os isolados foram obtidos no presente trabalho, exceto RS18, proveniente da Embrapa Hortaliças
 654 (Brasília, DF, Brasil), FIO181C2 proveniente do INPA (Manaus, AM, Brasil) e o isolado tipo da espécie
 655 IBSBF292 (= ICMP 1727), obtido da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico
 656 (Campinas, SP, Brasil).

657 ² Todos os isolados são provenientes do Brasil, exceto o isolado tipo.

658

659

660

661

662 **Tabela 2.** Caracterização da virulência de isolados de *R. solanacearum* de diferentes áreas
663 de cultivo do estado de Pernambuco, Brasil, avaliada pelos componentes, severidade da
664 murcha bacteriana aos 15 dias após a inoculação, área abaixo da curva de progresso da
665 doença e período de incubação, quando os isolados foram inoculados em pimentão, tomate,
666 berinjela e fumo (UFRPE, Recife, PE, Brasil).

ISOLADO ¹	PIMENTAO			TOMATE			BERINJELA			FUMO		
	SEV 15 ²	AACPD ³	PI ⁴	SEV 15	AACPD	PI	SEV 15	AACPD	PI	SEV 15	AACPD	PI
B5-4	2,75a ⁵	13,9a	8,5 ^a	4 a	35,25 ab	4,8 abcd	0,25 a	1,9 a	14,3 a	0,5 a	2,3 a	14,3 a
B5-5	4 a	27,0a	4,0a	4 a	36 ab	3 cd	3,75 a	26,6 a	5,5 a	0 a	0,0 a	16,0 a
B5-7	2,5 a	13,5a	9,0a	4 a	34,5 ab	5,0 abcd	2 a	12 a	10,3 a	0,75 a	4,9 a	12,0 a
B5-8	1,75 a	5,6a	12,3a	3 a	23,25 ab	5,8 abcd	0 a	0 a	16,0 a	0 a	0,0 a	16,0 a
B5-10	2,75 a	17,6a	7,5 a	4 a	24 ab	7,0 abcd	2,5 a	17,3 a	7,5 a	1,25 a	7,9 a	8,8 a
B5-17	2 a	10,5a	9,5 a	0,75 a	1,1 b	14,5 a	1,75 a	7,9 a	11,8 a	1,25 a	4,9 a	11,8 a
B5-18	1,2 a ⁵	9,4a	11,0 a	4 a	28,5 ab	6,0 abcd	1,75 a	9,4 a	9,8 a	1,75 a	7,9 a	10,3 a
B5-21	4 a	39,0 a	4,0 a	4 a	37,5 ab	4,0 abcd	2,25 a	11,6 a	9,5 a	1,5 a	8,0 a	7,5 a
B5-22	0,25 a	0,4 a	14,8 a	1,5 a	9,8 ab	10,8 abcd	2 a	9,8 a	11,3 a	0,75 a	2,6 a	15,5 a
B5-24	3,25 a	28,9 a	4,8 a	4 a	21,0 ab	7,0 abcd	3,25 a	19,1 a	8,8 a	0 a	0,0 a	16,0 a
B5-27	1,75 a	14,6 a	7,3 a	4 a	36,0 ab	5,0 abcd	2,75 a	12,4 a	7,3 a	0,5 a	2,3 a	13,8 a
B5-28	1,25 a	5,6 a	11,5 a	3,75 a	26,6 ab	5,5 abcd	1 a	4,5 a	12,3 a	0,5 a	0,8 a	15,3 a
B5-29	2,75 a	18,4 a	7,0 a	4 a	31,5 ab	5,0 abcd	1,25 a	6,4 a	12,3 a	0 a	0,0 a	16,0 a
B5-30	1 a	7,5 a	11,0 a	3 a	18,8 ab	6,8 abcd	1,5 a	3,8 a	13,3 a	0,25 a	1,9 a	15,0 a
B5-32	4 a	36,8 a	4,5 a	3 a	18,0 ab	8,0 abcd	3,25 a	19,9 a	7,5 a	0 a	0,0 a	16,0 a
SCN4	2,25 a	13,1 a	8,3 a	3,25 a	24,4 ab	7,0 abcd	3 a	21,8 a	7,5 a	0 a	0,0 a	16,0 a
SCN5	1,75 a	5,6 a	10,5 a	4 a	32,3 ab	6,0 abcd	4 a	27,0 a	5,0 a	0 a	0,0 a	16,0 a
SCN18	1,5 a	8,3 a	9,0 a	3,75 a	28,1 ab	6,0 abcd	3 a	18,8 a	9,3 a	0,75 a	2,6 a	13,3 a
SCN21	2 a	9,0 a	10,0 a	3,25 a	14,6 ab	7,3 abcd	1,75 a	8,6 a	12,0 a	0,5 a	3,8 a	12,0 a
SCN23	2,5 a	20,3 a	6,0 a	4 a	31,5 ab	5,0 abcd	0,75 a	1,1 a	14,8 a	0,75 a	6,4 a	10,3 a
SCN27	2,5 a	17,3 a	6,3 a	4 a	31,5 ab	6,0 abcd	0 a	0,0 a	16,0 a	0,75 a	4,1 a	12,3 a
SCN28	3 a	15,0 a	9,0 a	4 a	27,8 ab	5,8 abcd	2 a	10,5 a	11,0 a	1,5 a	10,5 a	8,5 a
SBV31	4 a	19,5 a	6,5 a	3 a	19,5 ab	6,5 abcd	1,75 a	10,1 a	11,5 a	2 a	9,8 a	0,0 a
C1-7	2,75 a	14,6 a	5,5 a	4 a	49,5 a	2,0 d	1,25 a	5,6 a	11,8 a	0 a	0,0 a	16,0 a
C3-11	1,25 a	7,1 a	12,8 a	1 a	3,0 b	13,8 abc	3,25 a	22,9 a	6,5 a	1,25 a	8,6 a	11,0 a
C6-22	0,5 a	3,0 a	12,8 a	3 a	18,75	7,3 abcd	2,25 a	4,9 a	13,0 a	1 a	5,3 a	10,3 a
C6-23	2,5 a	15,8 a	7,0 a	4 a	33,0 ab	5,8 abcd	2 a	9,0 a	9,8 a	0,25 a	1,1 a	14,5 a
C6-25	0,5 a	1,5 a	14,5 a	2,25 a	16,1 ab	10,0 abcd	4 a	29,3 a	5,5 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CM10	2,5 a	12,0 a	9,3 a	4 a	36,8 ab	4,8 abcd	3,25 a	16,9 a	9,8 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CAR2	2,5 a	15,8 a	7,3 a	4 a	36,8 ab	5,0 abcd	1,25 a	3,4 a	12,3 a	0,75 a	7,1 a	8,0 a
CAR4	2 a	7,5 a	11,0 a	4 a	36,8 ab	5,0 abcd	0 a	0,0 a	16,0 a	0,75 a	7,9 a	8,3 a
CAR5	1,75 a	8,6 a	9,8 a	4 a	39,0 ab	4,3 abcd	0 a	0,0 a	16,0 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CAR6	1,5 a	8,3 a	11,0 a	4 a	31,5 ab	5,3 abcd	0,25 a	0,4 a	15,8 a	1 a	9,8 a	8,5 a
CAR11	1,75 a	10,1 a	7,3 a	4 a	39,0 ab	4,3 abcd	0,25 a	0,4 a	15,5 a	0 a	0,0 a	14,0 a
CAR12	1,75 a	8,6 a	10,8 a	4 a	29,3 ab	6,5 abcd	0,5 a	0,8 a	15,0 a	0,75 a	7,9 a	10,3 a
CAR15	2 a	10,5 a	9,8 a	3,5 a	17,3 ab	7,0 abcd	0 a	0,0 a	16,0 a	1,25 a	9,4 a	16,0 a
CAR18	2,75 a	14,6 a	7,3 a	4 a	36,8 ab	4,5 abcd	0,5 a	2,3 a	14,5 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CAR19	3 a	10,5 a	11,0 a	2 a	17,3 ab	9,5 abcd	0,75 a	2,6 a	14,0 a	0,75 a	9,4 a	6,5 a
CAR20	1,75 a	12,4 a	10,5 a	0,5 a	3,0 b	13,8 abcd	0 a	0,0 a	16,0 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CAR21	2 a	9,8 a	9,0 a	3,25 a	23,6 ab	5,8 abcd	0 a	0,0 a	16,0 a	1,5 a	12,8 a	6,8 a
CAR22	1 a	5,3 a	12,8 a	3,75 a	25,9 ab	6,0 abcd	0 a	0,0 a	16,0 a	1,25 a	12,4 a	3,8 a
CAR24	2 a	7,5 a	9,5 a	3,75 a	12,8 ab	6,5 abcd	0,5 a	2,3 a	13,8 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CAR28	1,25 a	3,4 a	12,5 a	3,25 a	16,1 ab	8,8 abcd	0,75 a	1,1 a	15,0 a	0,5 a	1,5 a	14,3 a

Tabela 2. Continuação

ISOLADO	PIMENTAO			TOMATE			BERINJELA			FUMO		
	SEV 15	AACPD	PI	SEV 15	AACPD	PI	SEV 15	AACPD	PI	SEV 15	AACPD	PI
CAR29	1 a	4,5 a	12,0 a	4 a	35,3 ab	5,0 abcd	1,5 a	4,5 a	12,3 a	1 a	3,8 a	11,5 a
GH3	2,75 a	11,6 a	9,5 a	4 a	39,0 ab	4,5 abcd	1,5 a	7,5 a	13,0 a	1 a	6,8 a	10,0 a
GH8	2,75 a	15,4 a	7,3 a	4 a	47,3 ab	2,5 bcd	2 a	11,3 a	7,5 a	0,5 a	0,8 a	13,0 a
GH10	1,5 a	6,8 a	10,8 a	4 a	36,8 ab	4,75 abcd	1 a	3,8 a	13,3 a	0 a	0,0 a	16,0 a
GH12	2 a	11,3 a	8,3 a	4 a	36,0 ab	5,5 abcd	3 a	18,0 a	8,0 a	1,25 a	6,4 a	10,0 a
GH16	1,5 a	5,3 a	11,3 a	3 a	18,0 ab	6,8 abcd	0,25 a	0,4 a	15,8 a	0,5 a	0,8 a	14,8 a
CGM2	1,25 a	5,6 a	10,5 a	4 a	36,0 ab	5,5 abcd	0,25 a	1,9 a	13,8 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CGM3	0,75 a	5,6 a	11,3 a	0,75 a	2,6 b	14,3 ab	0 a	0,0 a	16,0 a	1,25 a	12,4 a	6,8 a
CGM6	1,25 a	7,9 a	10,3 a	0,25 a	1,9 b	13 abc	0 a	0,0 a	16,0 a	1 a	9,0 a	5,8 a
CGM8	3,5 a	24,8 a	6,0 a	1,75 a	9,4 ab	11,3 abcd	0 a	0,0 a	16,0 a	0,5 a	0,8 a	15,0 a
CGM9	3 a	20,3 a	7,0 a	4 a	36,7 ab	4,8 abcd	2,5 a	10,5 a	11,0 a	2 a	18,0 a	4,8 a
CGM10	1 a	3,8 a	13,0 a	3,5 a	16,5 ab	9,3 abcd	0,75 a	1,9 a	15,0 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CGM11	1,75 a	7,9 a	12,5 a	1 a	12,8 ab	12,3 abcd	0,75 a	1,9 a	14,3 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CGM13	1 a	5,3 a	14,3 a	3,75 a	21,4 ab	8,3 abcd	0 a	1,9 a	16,0 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CGM14	1,5 a	7,5 a	9,3 a	4 a	30,0 ab	6,5 abcd	0,75 a	0,0 a	15,5 a	0,25 a	1,1 a	15,0 a
CGM15	2,5 a	12,8 a	8,3 a	4 a	39,0 ab	4,5 abcd	2,5 a	1,1 a	9,0 a	1 a	6,0 a	10,0 a
CGM17	0,5 a	5,3 a	11,3 a	4 a	33,0 ab	4,0 abcd	2 a	12,8 a	12,3 a	0,75 a	6,4 a	11,3 a
CGM18	1,5 a	11,3 a	10,8 a	4 a	30,0 ab	9,0 abcd	0,75 a	9,0 a	15,0 a	0,5 a	1,5 a	14,5 a
CGH3	4 a	21,8 a	6,5 a	4 a	39,8 ab	4,0 abcd	0,5 a	1,1 a	14,8 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CGH6	2,25 a	5,6 a	11,5 a	4 a	36,0 ab	5,5 abcd	0,5 a	1,5 a	15,5 a	0,25 a	3,4 a	12,8 a
CGH8	1,25 a	3,4 a	12,5 a	4 a	37,5 ab	5,0 abcd	0,75 a	1,5 a	14,0 a	0,25 a	0,4 a	14,8 a
CGH12	1,5 a	7,5 a	9,3 a	3,5 a	23,3 ab	5,3 abcd	0 a	1,9 a	16,0 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CGH16	2 a	3,0 a	14,0 a	4 a	36,8 ab	5,0 abcd	3,75 a	0,0 a	7,0 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CGH20	2,75 a	13,1 a	8,3 a	3,75 a	28,9 ab	6,0 abcd	3,25 a	22,9 a	6,3 a	0,5 a	3,0 a	12,8 a
CGH21	1,5 a	6,8 a	11,5 a	3,75 a	19,9 ab	7,5 abcd	0,75 a	22,1 a	13,5 a	0,75 a	2,6 a	10,0 a
CGH26	2 a	19,5 a	9,5 a	2 a	19,5 ab	9,0 abcd	0 a	1,1 a	16,0 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CGH28	1,75 a	7,9 a	9,3 a	3,75 a	25,1 ab	7,3 abcd	1,25 a	0,0 a	11,8 a	1 a	4,5 a	11,0 a
CGH31	1,5 a	3,0 a	14,0 a	1 a	6,0 ab	13,5 abcd	0 a	4,1 a	16,0 a	0,75 a	12,6 a	9,3 a
CGH32	1 a	3,0 a	13,3 a	2,75 a	15,4 ab	7,5 abcd	0 a	0,0 a	16,0 a	0,5 a	13,6 a	15,0 a
CGH34	2,25 a	12,4 a	9,0 a	4 a	41,3 ab	3,5 abcd	4 a	0,0 a	6,5 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CGH36	1 a	2,3 a	13,8 a	2 a	16,5 ab	6,8 abcd	0 a	24,0 a	16,0 a	0,75 a	2,6 a	12,8 a
CGH41	3,5 a	24,0 a	6,3 a	4 a	36,0 ab	5,3 abcd	3,5 a	0,0 a	7,3 a	0,5 a	2,3 a	13,5 a
CG2-2	1,75 a	9,4 a	9,8 a	3,75 a	28,9 ab	5,8 abcd	1,25 a	21,0 a	13,3 a	0,25 a	1,1 a	15,0 a
CG2-17	2,75 a	11,6 a	8,8 a	4 a	27,8 ab	5,5 abcd	0,5 a	6,4 a	14,5 a	0 a	0,0 a	16,0 a
CG2-27	3 a	15,0 a	5,0 a	4 a	23,3 ab	6,8 abcd	1,75 a	1,5 a	11,8 a	0,75 a	4,1 a	11,8 a
RS18	2 a	12,0 a	4,0 a	4 a	33,8 ab	4,5 abcd	0 a	7,1 a	16,0 a	0 a	0,0 a	16,0 a
FIO181C2	1,5 a	6,8 a	11,3 a	4 a	34,5 ab	4,8 abcd	0 a	0,0 a	16,0 a	0 a	0,0 a	16,0 a
IBSBF 292	4 a	21,0 a	7,0 a	4 a	34,5 ab	4,5 abcd	0 a	0,0 a	16,0 a	0,5 a	6,8 a	9,0 a

667 ¹ Todos os isolados foram obtidos no presente trabalho, exceto RS18, proveniente da Embrapa Hortaliças
668 (Brasília, DF, Brasil), FIO181C2 proveniente do INPA (Manaus, AM, Brasil) e o isolado tipo da espécie
669 IBSBF 292 (= ICMP 1727), obtido da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico
670 (Campinas, SP, Brasil). ² Severidade após 15 dias de inoculação, avaliada pela escala de notas descritiva
671 (Nielsen e Haynes 1960). ³ AACPD calculada segundo Fry (1978); ⁴ Período de incubação determinado pelo
672 número de dias entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença. ⁵ Média de 4 repetições. Médias
673 seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste não
674 paramétrico Kruskal-Wallis (P≤0,05).

675 **Tabela 3.** Diversidade genotípica dos isolados de *R. solanacearum* de diferentes áreas de cultivo de pimentão do estado de Pernambuco,
 676 Brasil, calculada pelos índices estatísticos de riqueza, igualdade e diversidade utilizando os padrões de bandas obtidos através do Rep-PCR,
 677 marcadores REP e BOX.

678

Índices	Bezerros	Camocim	Caruaru	Chã Grande	Garanhuns	Sairé	População total
	Amostra						
<i>n</i>	15	6	15	29	5	7	77
	Índices de diversidade						
N_1^a	6,06 (4,12-8,01)	3,78 (2,55-5,01)	10,98 (8,47-13,49)	11,21 (8,67-13,75)	3,79 (2,49-5,10)	4,71 (3,30-6,12)	25,58 (21,0-27,93)
G^b	4,79 (2,91-6,67) ^f	3,6 (2,42-4,78)	9,78 (7,27-12,29)	9,24 (6,69-11,80)	3,57 (2,30-4,84)	4,45 (3,05-5,85)	15,90 (11,18-20,61)
	Índices de riqueza						
g_{obs}^c	8	4	12	14	4	5	39
$E(g_n)^d$	3,76	3,67	4,64	4,31	4	4,05	4,55
	Índices de igualdade						
E_5^e	0,75	0,94	0,88	0,81	0,68	0,93	0,606
G/g_{obs}	0,60	0,9	0,82	0,66	0,89	0,89	0,408

684 ^a Índice de diversidade de Hill (Grünwald et al. 2003)

685 ^b Índice de diversidade Stoddart e Taylor (Grünwald et al. 2003)

686 ^c Número de genótipos observados.

687 ^d Número de genótipos esperados estimados pelo método de rarefação (Grünwald et al., 2003).

688 ^e Índice de igualdade de Ludwig e Reynolds (Ludwig e Reynolds, 1988)

689 ^f Número entre parênteses indica 95% de intervalo de confiança calculado pelo bootstrapping (1.000 reamostragens) (Grünwald et al., 2003).

690

CAPÍTULO III

**EFEITO DO KILOL-L[®] E SEUS COMPONENTES NO
CONTROLE DA MURCHA BACTERIANA DO PIMENTÃO**

1 Kilol-L[®] e seus componentes no controle da murcha bacteriana do 2 pimentão

3
4 Alessandra de L Garcia¹ ; Elineide B de Souza² ; Rosa de LR Mariano¹

5
6 ¹Fitossanidade, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de
7 Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-
8 PE, Brasil; ²Microbiologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de
9 Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-
10 PE, Brasil; alessandrargarcia@hotmail.com; elineidebs@yahoo.com.br;
11 rrmbac@gmail.com

12 13 RESUMO

14
15 O controle da murcha bacteriana do pimentão, causada por *Ralstonia*
16 *solanacearum*, é extremamente difícil, principalmente devido à ampla diversidade
17 infraespecífica do patógeno, extensa gama de hospedeiros e sobrevivência no solo por
18 longos períodos a grandes profundidades, sendo agravado pela falta de cultivares
19 resistentes e produtos químicos eficazes. Assim, este trabalho teve como objetivo
20 avaliar o efeito do produto comercial Kilol-L[®] de ação higienizante e seus componentes,
21 no controle da doença. Inicialmente foi avaliada a sensibilidade *in vitro* de *R.*
22 *solanacearum* ao Kilol-L[®] (0,4; 0,8; 2,5; 5; 10 e 100%) e seus componentes, os ácidos
23 ascórbico, cítrico e láctico (0,25; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10%). Após teste de fitotoxidez em
24 plantas de pimentão ‘Atlantis’, as concentrações Kilol-L[®] 0,8% e ácidos ascórbico,
25 cítrico e láctico a 1% foram selecionadas e testadas para redução da severidade da
26 murcha bacteriana, aplicadas pela imersão de raízes ou por pulverização da parte aérea
27 de plantas com 21 dias. *Ralstonia solanacearum* isolado CGH41 foi inoculado por
28 ferimento de raízes e deposição do inóculo. A análise dos halos de inibição *in vitro*
29 mostrou alta sensibilidade do patógeno ao ácido láctico 10% e média sensibilidade ao
30 ácido láctico 5 e 2,5 %, ácidos ascórbico e cítrico 10% e Kilol-L[®] 100%. A imersão de
31 raízes em ácido láctico 1% proporcionou 100% de controle da murcha bacteriana em
32 pimentão, embora sem diferir dos ácidos ascórbico e cítrico a 1%. O único efeito do

33 Kilol-L[®] foi elevar o período de incubação, no método de pulverização, sem diferir do
34 ácido cítrico 1%. A maioria dos produtos aplicados pelo método de imersão de raízes
35 foi mais eficiente na redução da severidade da murcha bacteriana que aqueles aplicados
36 por pulverização da parte aérea.

37

38 **Palavras-chave:** *Ralstonia solanacearum*, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico,
39 controle de doença

40

41

ABSTRACT

42

43 **Kilol-L[®] and its components on the control of bacterial wilt of**
44 **bell pepper**

45

46 The control of bacterial wilt of bell pepper caused by *Ralstonia solanacearum* is
47 extremely difficult mainly due to its high infraspecific diversity, large host range and
48 extended soil survival at large depth. This is also complicated by the lack of resistant
49 cultivars and efficient chemical control. Therefore this work aimed to evaluated the
50 commercial disinfectant product Kilol-L[®] and its components for disease control. Initially
51 it was evaluated *in vitro* the sensitivity of *R. solanacearum* to Kilol-L[®] (0.4, 0.8, 2.5, 5,
52 10 and 100%) and its components the ascorbic, citric and lactic acids (0.25, 0.5, 1, 2.5,
53 5 and 10%). After the phytotoxicity test in bell pepper cv. Atlantis, the concentrations
54 Kilol-L[®] 0.8% and ascorbic, citric and lactic acids 1% were selected and tested for
55 bacterial wilt severity reduction, by spraying of shoots or immersion of roots both using
56 21days-old plants. *Ralstonia solanacearum* strain CGH41 was inoculated by wounding
57 roots and pouring inoculum. According to the analysis of the inhibition halos *R.*
58 *solanacearum in vitro* showed high sensitivity to lactic acid 10% and medium
59 sensitivity to lactic acid 5 and 2.5 %, ascorbic and citric acids 10% and Kilol-L[®] 100%.
60 The immersion of roots in lactic acid 1% controlled pepper bacterial wilt by 100%
61 however without differing from ascorbic and citric acids 1%. The unique significant
62 effect of Kilol-L[®] was to elevate de incubation period when applied by shoot spraying
63 without differing of citric acid 1%. Most of the products applied by the root immersion

64 method were more efficient in reducing the severity of the bacterial wilt than those
65 applied by shoot spraying.

66

67 **Key words:** *Ralstonia solanacearum*, ascorbic acid, citric acid, lactic acid, disease
68 control

69 **(Recebido para publicação em... de... de 2011; aceito em... de... de 2011)**
70 **(Received on ..., 2011; accepted on ..., 2011)**

71

72 A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et*
73 *al.* tem importância mundial devido aos grandes prejuízos causados, à variada e extensa
74 gama de hospedeiros e ao difícil controle (Lopes & Reifschneider, 1999). Essa
75 bacteriose atinge mais de 450 plantas hospedeiras, distribuídas em cerca de 54 famílias
76 botânicas (Wicker *et al.*, 2007).

77 No Brasil, a murcha bacteriana das solanáceas tem ocorrido principalmente nas
78 Regiões Nordeste, Norte (Reifschneider & Takatsu, 1985) e em alguns pólos de
79 produção de terras baixas nas Regiões Sudeste, principalmente devido à temperatura e
80 umidade muito altas. Nessas regiões, a perda na produção é muito elevada, podendo
81 chegar a 100% e condenar o campo, principalmente em plantios sucessivos, devido à
82 capacidade da bactéria de sobreviver no solo por longos períodos (Lopes & Quezado-
83 Duval, 2007).

84 Por ser uma bactéria muito variável e adaptada a uma grande gama de
85 hospedeiros e condições climáticas, *R. solanacearum* foi classificada a nível
86 infraespecífico em cinco raças (He *et al.* 1983) e seis biovares (Hayward, 1964). Com o
87 advento das técnicas moleculares, a taxonomia de *R. solanacearum* foi revista e,
88 atualmente, é considerada um complexo de espécies, sendo classificada em filotipos (I-
89 IV), sequevares (1-51), linhagens clonais e biotipos (1-11) (Fegan & Prior, 2005; Xu *et*
90 *al.*, 2009).

91 No estado de Pernambuco, a murcha bacteriana do pimentão é causada por *R.*
92 *solanacearum* raça 1, biovares 1 e 3, biotipos 8, 6 e 3, filotipos I e II. No entanto, há
93 predominância de mais de 97% da biovar 3, biotipo 8 e filotipo I (Garcia, 2011).

94 Em pimentão, os sintomas da doença ocorrem como murcha inicial das folhas
95 progredindo para morte da planta, sem alteração na coloração, semelhantemente ao que
96 ocorre na deficiência hídrica. Redução no crescimento da planta também pode ser

97 verificada. Internamente, observa-se escurecimento do sistema vascular e o corte
98 transversal do caule de planta infectada revela a exsudação de fio leitoso de células
99 bacterianas, visível em água límpida (Momol *et al.*, 2008).

100 O controle da murcha bacteriana do pimentão é extremamente difícil,
101 principalmente devido à ampla diversidade infraespecífica de *R. solanacearum*, ampla
102 gama de hospedeiros (Cerkauskas, 2004) e sobrevivência no solo por longos períodos a
103 grandes profundidades, tornando o controle químico inviável e antieconômico. Takatsu e
104 Lopes (1997) sugeriram um manejo integrado para o controle da doença, com a
105 aplicação de diversas medidas como rotação de culturas, plantio em áreas indenens,
106 resistência genética, manejo da água e também solarização. A falta de cultivares de
107 pimentão resistentes e de produtos químicos eficazes no controle da murcha bacteriana,
108 nesta e em outras solanáceas, continua sendo um grande problema.

109 O controle alternativo, incluindo entre outros o controle biológico e a indução de
110 resistência em plantas pela utilização de moléculas ou substâncias eliciadoras, tem sido
111 uma opção para o manejo de bacterioses importantes no Brasil. Dentre estes métodos
112 está o uso de extratos vegetais e óleos essenciais (Stangarlin *et al.*, 1999), e ainda alguns
113 produtos comerciais a base de extratos cítricos e ácidos orgânicos.

114 Kilol-L[®] é um produto de ação higienizante, formulado para utilização em
115 ambientes e superfícies de agroindústrias, composto pelos ácidos orgânicos, ascórbico
116 (1%), cítrico (0,475%) e láctico (0,475%), naturalmente estabilizados (Quinabra, 2007).
117 Esta formulação tem sido relatada pelo fabricante como eficiente contra bactérias e
118 fungos diversos. No entanto, o Kilol LDF100[®] não foi eficiente no controle da
119 antracnose do maracujazeiro, quando comparado com os fungicidas sulfato de cobre,
120 enxofre coloidal 80%, calda bordalesa e mancozeb, apesar de ter promovido o
121 crescimento das plantas (Vega, 1998). Uma única referência ao uso do Kilol LDF100[®]
122 para o controle de *Xanthomonas*, *Erwinia* e *Pseudomonas* em plantas foi encontrada
123 (Molina, 2001). No entanto, segundo o Eng. Agrônomo Iramar Benigno Albert Jr.
124 (comunicação pessoal) o Kilol-L[®] vem sendo utilizado por alguns produtores das
125 Mesorregiões do Agreste e Mata de Pernambuco para o controle da murcha bacteriana
126 em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.).

127 Considerando os prejuízos causados pela murcha bacteriana em pimentão e que o
128 seu controle ainda é insatisfatório, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito

129 do produto comercial Kilol-L[®] e seus componentes, ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido
130 láctico, no controle da doença.

131

132

MATERIAL E MÉTODOS

133

134

Isolado bacteriano

135

136

137

138

139

140

Foi utilizado o isolado CGH41 de *R. solanacearum*, pertencente a raça 1, biovar 3, biotipo 8, filotipo I (Garcia, 2011), proveniente de planta de pimentão com sintomas típicos de murcha, coletada no município de Chã Grande, no estado de Pernambuco, Brasil. O isolado é representativo de uma população de 78 isolados e causa murcha seis dias após inoculação por corte de raízes e deposição de 15 mL de suspensão bacteriana a 5×10^8 UFC mL⁻¹ em plantas de pimentão com 21 dias (Garcia, 2011).

141

142

143

144

145

146

147

Todo inóculo foi preparado a partir de crescimento da bactéria com 48 h de cultivo em meio NYDA (20 g de ágar, 10 g de dextrose, 5 g de peptona, 5 g de extrato de levedura e 3 g de extrato de carne, completando-se o volume para 1000 ml com água destilada) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. O crescimento bacteriano foi diluído em água destilada esterilizada, ajustando-se a concentração com auxílio de um fotolorímetro (Analyser 500 M, São Paulo, SP, Brasil) para $A_{570} = 0,54$, que corresponde a concentração de 5×10^8 UFC mL⁻¹, de acordo com equação previamente determinada.

148

149

150

Sensibilidade *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* a Kilol-L[®] e seus componentes

151

152

153

154

155

156

157

Uma alíquota de 1 ml da suspensão de *R. solanacearum*, preparada como já descrito anteriormente, foi adicionada a 99 ml de meio NYDA ainda fundente, sendo vertidos em placas de Petri. Após solidificação do meio de cultura, cinco poços com 0,6 cm de diâmetro foram demarcados em pontos equidistantes da placa com o auxílio de um furador de plástico. Em quatro poços da placa foi adicionado o produto na mesma concentração e como testemunha foi adicionada água destilada esterilizada no poço central. As placas foram incubadas por 48 h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

158

159

160

Os seguintes tratamentos foram utilizados: Kilol-L[®] 0,4; 0,8; 2,5; 5; 10 e 100%; e seus componentes, ácido ascórbico, ácido cítrico e ácido láctico nas concentrações 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10%. A avaliação foi realizada após 48 h pela medição do halo de

161 inibição do crescimento bacteriano, em dois sentidos diametralmente opostos, com o
162 auxílio de um paquímetro. A sensibilidade do isolado às concentrações dos produtos foi
163 classificada em três grupos, de acordo com as reações de: resistência (halo \leq 14 mm),
164 média sensibilidade (14 mm < halo < 20 mm) e alta sensibilidade (halo \geq 20 mm) (Acar
165 & Goldstein, 1986).

166 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 25 tratamentos
167 incluindo a testemunha, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por
168 uma placa de Petri com quatro poços contendo o produto.

169 Análises de regressão foram realizadas e equações formuladas no modelo
170 quadrático com auxílio do programa Statistix 9 for Windows, utilizando-se os dados da
171 sensibilidade *in vitro* de *R. solanacearum* a Kilol-L[®] e seus componentes (Analytical
172 Software, Tallahassee, FL, USA).

173

174 **Efeito *in vivo* de Kilol-L[®] e seus componentes**

175

176 **Teste de Fitotoxicidade**

177 Os produtos foram testados pelos métodos de imersão de raízes e pulverização
178 da parte aérea. Foram utilizadas plantas de pimentão cv. Atlantis com 21 dias após o
179 plantio, cultivadas em bandeja de isopor contendo substrato Basaplant[®] (Base Agro
180 Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil).

181 No primeiro método, as plantas foram retiradas das bandejas e tiveram suas
182 raízes imersas por três minutos nos tratamentos selecionados pelas regressões (Kilol-L[®]
183 80%, ácido ascórbico 10%, ácido cítrico 7,5% e ácido láctico 9%) e também em todos
184 os tratamentos testados *in vitro* (Kilol-L[®] 0,4; 0,8; 2,5; 5; 10 e 100%; e seus
185 componentes, ácido ascórbico, ácido cítrico e ácido láctico nas concentrações 0,25; 0,5;
186 1; 2,5; 5 e 10%). Em seguida, foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade
187 de 500 mL, contendo solo natural:substrato Basaplant[®] (1:3, v:v).

188 No segundo método, os mesmos tratamentos foram testados pela pulverização
189 até completo molhamento da parte aérea de plantas com 21 dias após plantio.

190 Nos dois casos, a avaliação da fitotoxidez constou da observação do surgimento
191 de anormalidades no desenvolvimento ou na coloração das plantas.

192

193 **Redução da severidade da murcha bacteriana no pimentão**

194 Os tratamentos que não causaram fitotoxidez em plantas de pimentão e
195 apresentaram atividade *in vitro* foram selecionados para os testes *in vivo* em casa de
196 vegetação: Kilol-L[®] 0,8%, ácido ascórbico 1%, ácido cítrico 1% e ácido láctico 1%.

197 Estes produtos foram aplicados por imersão de raízes e pulverização, conforme
198 já descrito. Três dias após a aplicação dos produtos, as plantas foram inoculadas
199 individualmente, fazendo-se com auxílio de um bisturi inserido no solo, um corte em
200 formato de meia lua no sistema radicular, no qual foram depositados 15 mL da
201 suspensão bacteriana contendo 5×10^8 UFC ml⁻¹. Como testemunhas, foram utilizadas
202 plantas tratadas com água destilada pelos dois métodos.

203 As plantas foram mantidas em casa de vegetação. A avaliação foi realizada
204 diariamente, durante 15 dias, determinando-se: a) período de incubação (PI),
205 determinado pelo número de dias entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da
206 doença; b) severidade (SEV) avaliada com auxílio de escala de notas descritiva de 0 a 4
207 (Nielsen & Haynes, 1960), onde: 0 = ausência de sintomas, 1 = plantas com 1/3 das
208 folhas murchas, 2 = plantas com 2/3 das folhas murchas, 3 = plantas totalmente murchas
209 e 4 = plantas mortas; e c) área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD),
210 calculada pela expressão: $AACPD = [\sum (y_i + y_{i+1}) / 2 \cdot d_{ii}] / n$, onde y_i e y_{i+1} são os
211 valores da severidade observados nas avaliações consecutivas e d_{ii} é o intervalo entre as
212 avaliações (Fry, 1978).

213 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial
214 5x2, representados pelos cinco produtos incluindo a testemunha e dois métodos,
215 imersão de raízes e pulverização da parte aérea. Cada tratamento consistiu de cinco
216 repetições, sendo cada repetição constituída por uma planta por vaso. O experimento foi
217 realizado duas vezes em épocas distintas.

218 Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação de
219 médias de Tukey ($P \leq 0,05$), com auxílio do programa Statistix 9 for Windows.

221 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

222
223 A análise das médias dos halos de inibição em meio de cultura de acordo com
224 Acar e Goldstein (1986) demonstrou que *R. solanacearum* apresentou reação de alta

225 sensibilidade ao ácido láctico a 10% e média sensibilidade ao ácido láctico a 5 e 2,5 %,
226 ácido ascórbico 10%, ácido cítrico 10%, e Kilol-L[®] 100%. Aos outros produtos e
227 concentrações, *R. solanacearum* apresentou reação de resistência (Tabela 1).

228 As equações de regressão do Kilol-L[®] e ácidos componentes de sua formulação
229 permitiram verificar as concentrações mais eficientes a serem testadas *in vivo*, a saber,
230 80% de Kilol-L[®] ($y = 0,0013 + 0,0339x - 0,000204x^2$), 10% de ácido ascórbico ($y =$
231 $0,2634 + 0,1416x + 0,00042x^2$), 7,5% de ácido cítrico ($y = 0,5176 + 0,2728x -$
232 $0,0184x^2$) e 9% de ácido láctico ($y = 0,063 + 0,5404x - 0,027x^2$).

233 Apesar do Kilol-L[®] não ser um produto registrado para o uso agrícola, a sua
234 eficiência é citada no controle dos gêneros *Xanthomonas*, *Erwinia* e *Pseudomonas*
235 (Molina, 2001), bem como tem sido utilizado no controle da murcha bacteriana em
236 tomateiro por alguns produtores das Mesorregiões do Agreste e Mata de Pernambuco.
237 No entanto, não existem trabalhos científicos que demonstrem sua ação no controle de
238 bactérias fitopatogênicas. Por outro lado, os mesmos componentes do Kilol-L[®] também
239 são usados na composição de produtos indutores de resistência como o Ecolife[®] que tem
240 sido testado contra alguns patógenos, inclusive bactérias, tanto *in vitro* como *in vivo* na
241 proteção de plantas (Motoyama *et al.*, 2003; Cavalcanti *et al.*, 2006). O extrato cítrico
242 (Ecolife 40[®]) nas concentrações 0,1 e 0,5% inibiu o crescimento de *R. solanacearum* e
243 *X. axonopodis* pv. *manihotis* Dye com halos de 2,5; 6,9 e 2,4; 8,2 mm, respectivamente
244 (Motoyama *et al.*, 2003). Outros produtos tais como sanitizantes, óleos e extratos têm
245 sido testados para inibição do crescimento de *R. solanacearum*. O sanitizante cloreto de
246 dodecil dimetil amônio a 0,2 % induziu halos de 2,19 cm (Alves *et al.*, 2010), mas não
247 foi testado *in vivo*. Os óleos essenciais de palmarosa (*Cymbopogon martini* (Roxb.)
248 Watson) a 0,04% e capim-limão (*C. citratus* D.C. Stapf.) a 0,07% inibiram totalmente a
249 raça 4 desse patógeno em meio de cultura e em substrato infestado artificialmente (Paret
250 *et al.*, 2010). Além disto, extratos de *Tagetes* spp. contendo tiofenos também foram
251 capazes de impedir o crescimento de *R. solanacearum in vitro* e no solo, reduzindo
252 assim o desenvolvimento da murcha em plantas de fumo (Terblanche & Villiers, 1998).

253 Na presente pesquisa, foi evidenciada uma ação direta dos produtos Kilol-L[®] e
254 ácidos ascórbico, cítrico e láctico sobre *R. solanacearum* apenas em altas concentrações.
255 Isto pode indicar uma possível ação de indução de resistência em baixas concentrações,
256 nas quais não foi observada ação antibacteriana *in vitro*. A ausência de atividade

257 antibiótica *in vitro* é um dos critérios utilizados para se distinguir resistência induzida de
258 outros mecanismos de controle de doenças (Mello, 2009).

259 A aplicação de Kilol-L[®] 80%, ácido ascórbico 10%, ácido cítrico 7,5% e ácido
260 láctico 9% por imersão das raízes e pulverização na parte aérea em plantas de pimentão
261 com 21 dias, foi seguida, após algumas horas do surgimento de manchas foliares. Em
262 algumas plantas tratadas por imersão das raízes, murcha e morte foram também
263 observadas. A fitotoxidez ocorre quando o limiar de tolerância de uma planta exposta a
264 uma condição de estresse é atingido. Revelada por lesões irreversíveis ou sintomas
265 crônicos, é um mecanismo natural da planta na tentativa de desintoxicar as células de
266 determinada molécula (Carvalho *et al.*, 2009). Diferentes produtos aos quais a planta é
267 exposta para o controle de doenças e/ou pragas, ou ainda fertilizantes, podem causar
268 esta reação, portanto recomenda-se que sejam testados antecipadamente.

269 Diante da fitotoxidez das concentrações selecionadas a partir das regressões,
270 todas aquelas testadas *in vitro* foram testadas *in vivo*. As únicas concentrações que não
271 causaram fitotoxidez, tanto por imersão quanto por pulverização, foram Kilol-L[®] 0,8%,
272 e os ácidos ascórbico, cítrico e láctico a 1%, as quais foram utilizadas para os testes de
273 redução da severidade da doença.

274 Apesar de inexistirem trabalhos demonstrando a ação do Kilol[®] no controle de
275 doenças de plantas, na presente pesquisa foi possível verificar, em casa de vegetação,
276 que a redução da severidade da murcha bacteriana do pimentão não foi obtida pelo
277 Kilol[®] mas sim, individualmente, pelos ácidos componentes do produto. Houve redução
278 significativa ($P \leq 0,05$) da severidade da murcha bacteriana do pimentão em comparação
279 com a testemunha, tanto em relação ao período de incubação quanto à área abaixo da
280 curva de progresso da doença (Tabela 2).

281 A imersão de raízes em ácido láctico a 1% proporcionou 100% de controle da
282 murcha bacteriana em pimentão, expresso pelo PI e AACPD (Tabela 2), embora sem
283 diferir dos tratamentos ácido ascórbico 1% e ácido cítrico 1%. Estes elevaram o PI de
284 2,2 para 11,6 e 13,6 dias e reduziram a AACPD de 30,6 para 9,9 e 3,6, respectivamente
285 (Tabela 2).

286 No método de pulverização da parte aérea, apenas o Kilol-L[®] e o ácido cítrico
287 1% elevaram significativamente o PI para 11,6 e 8,6 dias em relação à testemunha (2,2
288 dias). Nenhum dos produtos aplicados por este método reduziu a AACPD (Tabela 2).

289 A maioria dos produtos aplicados pelo método de imersão de raízes foi mais
290 eficiente na redução da severidade da podridão mole que aqueles aplicados por
291 pulverização da parte aérea (Tabela 2).

292 O controle total da doença pela imersão de raízes em ácido láctico 1% é
293 realmente muito promissor no manejo da murcha bacteriana em pimentão, devendo ser
294 somado a outras medidas de controle como plantio em áreas indenens, rotação de
295 culturas, manejo da água e da fertilidade do solo. É importante considerar que este nível
296 de redução da doença foi obtido mesmo inoculando-se suspensão concentrada do
297 patógeno após corte de raízes, o que não ocorre comumente no campo, o que denota a
298 eficiência do tratamento. Embora não existam pesquisas com estes ácidos no controle da
299 murcha bacteriana, outros produtos vegetais têm sido analisados com resultados
300 diversos.

301 Produto a base de extrato de plantas como o Ecolife[®], contendo componentes
302 usados no Kilol-L[®], segundo o fabricante, tem se mostrado eficaz na proteção contra
303 doenças nas culturas do pepino (*Cucumis sativus* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e
304 cacauero (*Theobroma cacao* L.) (Cavalcanti *et al.*, 2006). Estes autores pulverizaram
305 Ecolife[®] em tomateiros e obtiveram reduções de 39,2% da mancha bacteriana causada
306 por *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Vauterin *et al.* No entanto, Mello (2009)
307 relataram que Ecolife[®] (0,2%) não foi eficiente no controle da podridão mole em couve-
308 chinesa.

309 Dentre os produtos vegetais testados que têm apresentado alta eficiência para
310 controle de *R. solanacearum*, estão os extratos e óleos vegetais aplicados ao solo. Nesta
311 linha de pesquisa, a biofumigação com óleos de manjerona, tomilho, palmarosa e
312 capim-limão em solos infestados com *R. solanacearum* tem reduzido até 100% da
313 murcha bacteriana em tomateiro (Pradhanang *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2005) e gengibre
314 (Paret *et al.*, 2010).

315 Apenas o método de aplicação dos produtos pela imersão de raízes mostrou ser
316 eficiente (Tabela 2). A eficácia de um produto pode ser influenciada pelo processo de
317 aplicação. A biofumigação com óleos é muito utilizada e com bons resultados
318 (Pradhanang *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2005; Paret *et al.*, 2010), no entanto em campo pode
319 exigir grandes quantidades de produto. A pulverização da parte aérea é prática, mas nem
320 sempre eficiente como verificado no presente trabalho. No entanto, a imersão de raízes

321 além de prática, pode reduzir a quantidade de produto necessário ao tratamento e se
322 tornar uma etapa do sistema de produção de mudas. Araújo *et al.* (2005) testaram ASM
323 a 0,0025%, por pulverização foliar e rega junto ao colo de tomateiros transplantados
324 para solo infestado com *R. solanacearum*. Apenas quando avaliado pelo número de
325 folhas murchas, o produto aplicado por pulverização diferiu significativamente da rega.
326 Aos 21 dias, o tratamento pulverização apresentava 31% de plantas murchas em
327 comparação com 35% no tratamento de rega e 55% na testemunha.

328 A inibição *in vitro* da *R. solanacearum* pelos produtos em altas concentrações
329 pode estar relacionada com o baixo pH do Kilol-L[®] e dos ácidos utilizados. O modo de
330 ação bactericida do Kilol-L[®] é principalmente fundamentado em dois mecanismos
331 baseados no pH, que na diluição a 10% está entre 2,5 e 3,5. Primeiramente, pela
332 acidificação do meio onde é aplicado, pois o pH interno de uma célula bacteriana deve
333 ser mantido dentro dos limites para seu crescimento. No caso das espécies neutrófilas,
334 na qual se inclui a maioria das bactérias patogênicas, esta faixa se encontra entre 5,4 a
335 8,5. Em um ambiente ácido, a célula bacteriana consome energia para realizar o
336 transporte ativo dos prótons, que de maneira passiva atingiram o interior da célula. Com
337 isso, interrompem reações metabólicas e cessam a multiplicação. O segundo mecanismo
338 seria a entrada passiva do ácido orgânico pela parede da bactéria, reduzindo assim o pH
339 interno, ocorrendo o acúmulo de ânions carboxílicos RCOO⁻ no interior da célula,
340 modificando a pressão osmótica interna, resultando em distúrbios metabólicos, como a
341 síntese de ácido nucléico, atividades enzimáticas e trocas metabólicas pela membrana
342 (Quinabra, 2007).

343 Não foi observada relação entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, nas baixas
344 concentrações utilizadas. Desta forma a significativa redução da severidade da doença
345 obtida, de até 100%, possivelmente aponta para o mecanismo de indução de resistência,
346 visto que foi evidenciada uma ação direta dos produtos Kilol-L[®] e ácidos ascórbico,
347 cítrico e láctico sobre o patógeno apenas em altas concentrações. A indução de
348 resistência já foi comprovada em tomateiro para a mancha bacteriana com o extrato
349 cítrico similar Ecolife[®] (Cavalcanti *et al.*, 2006).

350 Os resultados desta pesquisa são promissores, pois fornecem novas alternativas
351 para o manejo da murcha bacteriana no pimentão, principalmente por ser esta doença
352 ainda de controle extremamente difícil. Futuros trabalhos devem ser realizados para

353 comprovar a eficiência dos ácidos láctico, cítrico e ascórbico em condições de cultivo
354 protegido e campo e estudar os mecanismos de ação destes ácidos.

355

356

AGRADECIMENTOS

357 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão
358 de bolsas de produtividade em pesquisa a Elineide Barbosa de Souza e Rosa de Lima
359 Ramos Mariano e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
360 (CAPES) pela bolsa de doutorado a Alessandra de Lima Garcia.

361

362

REFERÊNCIAS

363

364 ACAR JF; GOLDSTEIN FW. 1986. Disk susceptibility test. In: RORIAN, V. (ed).
365 *Antibiotics in laboratory medicine*. London: Willians & Wilkins. p. 27-62.

366

367 ALVES AO; OLIVEIRA MMS; SANTOS LA; SOUZA LJN; SILVEIRA EL;
368 MARIANO RLR. 2010. Efeito do cloreto de dodecil dimetil amônio na inibição do
369 crescimento de *Ralstonia solanacearum*. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA
370 E EXTENSÃO, X. *Anais da Jornada de ensino, pesquisa e extensão*. Universidade
371 Federal Rural de Pernambuco, Recife (CD-ROM).

372

373 ARAÚJO JSP; GONÇALVES KS; OLIVEIRA BC; RIBEIRO RLD; POLIDORO JC.
374 2005. Efeito do acibenzolar-S-methyl sobre murcha-bacteriana do tomateiro.
375 *Horticultura Brasileira* 23: 05-08.

376

377 CARVALHO SJP; NICOLAI M; FERREIRA RR; FIGUEIRA AVO;
378 CHRISTOFFOLETI PJ. 2009. Herbicide selectivity by differential metabolism:
379 considerations for reducing crop damages. *Scientia Agricola* 66: 136-142.

380

381 CAVALCANTI FR; RESENDE MLV; ZACARONI AB; RIBEIRO JÚNIOR PM;
382 COSTA JC; SOUZA RM. 2006. Acibenzolar-Smetil e Ecolife na indução de
383 resistência e respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana
384 (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatologia Brasileira* 31: 372-380.

385

386 CERKAUSKAS R. 2004. Pepper diseases, Bacterial wilt. Shanhua, Tainan: AVRDC -
387 The World Vegetable Center. Fact Sheet, *AVRDC Publication* 04-573: 1-2.
388

389 FEGAN M; PRIOR P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species
390 complex? In: ALLEN C.; PRIOR P.; HAYWARD AC (eds). *Bacterial wilt disease*
391 *and the Ralstonia solanacearum species complex*. St. Paul: APS Press. p. 449-461.
392

393 FRY WE. 1978. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide
394 effects for integrated control of potato late blight. *Phytopathology* 68: 1650-1655.
395

396 GARCIA AL. 2011. *Diversidade populacional de Ralstonia solanacearum em pimentão*
397 *no estado de Pernambuco e controle da murcha bacteriana*. Recife: Universidade
398 Federal Rural de Pernambuco. 99p. (Tese doutorado).
399

400 HAYWARD AC. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of*
401 *Applied Bacteriology* 27: 265-277.
402

403 HE LY; SEQUEIRA L; KELMAN A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas*
404 *solanacearum*. *Plant Disease* 67: 1357-1361.
405

406 JI P; MOMOL MT; OLSON SM; PRADHANANG PM; JONES JB. 2005. Evaluation
407 of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field
408 conditions. *Plant Disease* 89: 497-500.
409

410 LOPES CA; REIFSCHNEIDER FJB. 1999. Manejo integrado das doenças da batata.
411 *Informe Agropecuário* 20: 56-60.
412

413 LOPES CA; QUEZADO-DUVAL AM. 2007. Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças. In:
414 ZAMBOLIM L; LOPES CA; PICANÇO MC; COSTA H.(eds). *Manejo Integrado de Doenças e Pragas:*
415 *Hortaliças*. Viçosa: Editora UFV. 502p.
416

417 MELLO MRF. 2009. *Eficiência de indutores e antibióticos no controle da podridão-*
418 *mole em couve-chinesa*. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 100p.
419 (Tese doutorado).
420

421 MOLINA N. 2001. Uso de extractos botánicos en control de plagas y enfermedades.
422 *Manejo Integrado de Plagas* 59: 76-77.
423

424 MOMOL T; PRADHANANG P; LOPES CA. 2008. *Bacterial Wilt of Pepper*. EDIS:
425 University of Florida IFAS Extension, 189p. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu>.
426 Acessado em 25 de janeiro de 2011.
427

428 MOTOYAMA MM; SCHWAN-ESTRADA KRF; STANGARLIN JR; FIORI ACG;
429 SCAPIM CA. 2003. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia*
430 *solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Acta Scientiarum*
431 *Agronomy* 5: 509-512.
432

433 NIELSEN LW; HAYNES FL. 1960. Resistance in *Solanum tuberosum* to *Pseudomonas*
434 *solanacearum*. *American Potato Journal* 37: 260-267.
435

436 PARET ML; CABOS R; KRATKY BA; ALVAREZ AM. 2010. Effect of plant
437 essential oils on *Ralstonia solanacearum* race 4 and bacterial wilt of edible ginger.
438 *Plant Disease* 94: 521-527.
439

440 PRADHANANG PM; MOMOL MT; OLSON SM; JONES JB. 2003. Effects of plant
441 essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt
442 incidence in tomato. *Plant Disease* 87: 423-427.
443

444 QUINABRA. *Comunicado Técnico*, Kilol-L higienizante. Edição 2007.
445

446 REIFSCHNEIDER FJB; TAKATSU A. 1985. *Pseudomonas solanacearum* no Brasil:
447 aspectos macroepidemiológicos. *Fitopatologia Brasileira* 10: 213.
448

- 449 STANGARLIN JR; SCHWAM-ESTRADA KRF; CRUZ MES; NOZAKI MH. 1999.
450 Plantas Medicinai: Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos.
451 *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 2: 16-21.
452
- 453 TAKATSU A; LOPES CA. 1997. Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e
454 perspectivas de controle. *Horticultura Brasileira* 15: 170-177.
455
- 456 TERBLANCHE J; VILLIERS DA. 1998. The suppression of *Ralstonia solanacearum* by
457 marigolds. In: PRIOR, CA.; ELPHINSTONE, JG. (eds). *Bacterial wilt disease:*
458 *molecular and ecological aspects*. Berlin: Spring-Verlag. p. 325-331.
459
- 460 VEGA SJM. 1998. *Estudio epidemiológico y evaluación de fungicidas contra la*
461 *antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides) del maracuyá para agricultura*
462 *orgánica en Olancho, Honduras: Universidade Zamorano, Departamento de*
463 *Protección Vegetal. 65p. (Monografía Engenharia Agronomica).*
464
- 465 WICKER E; GRASSART, L; CORANSON-BEAUDU R; MIAN D; GUILBAUD C;
466 FEGAN M; PRIOR P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique
467 (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and*
468 *Environmental Microbiology* 73: 6790-6801.
469
- 470 XU J; PAN ZC; XU JS; ZHANG Z; ZHANG H; ZHANG LQ; HE LY; FENG J. 2009.
471 Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European Journal*
472 *of Plant Pathology* 125: 641–653.

473 **Tabela 1.** Reação de *Ralstonia solanacearum* a Kilol-L[®] e ácidos componentes de sua
 474 formulação, avaliada pelo diâmetro médio dos halos de inibição do crescimento
 475 bacteriano (reaction of *Ralstonia solanacearum* to Kilol-L[®] and its components, as
 476 assessed by the average diameter of the inhibition of bacterial growth). Recife,
 477 UFRPE, 2010.

Tratamento	Diâmetro médio dos halos de inibição (mm)¹	Sensibilidade de <i>R. solanacearum</i>²
Ácido láctico 10%	27,87	AS
Ácido láctico 5%	19,43	MS
Ácido ascórbico 10%	17,25	MS
Ácido láctico 2,5%	14,62	MS
Ácido cítrico 10%	14,18	MS
Kilol-L 100%	14,00	MS
Ácido cítrico 5%	13,12	R
Ácido cítrico 2,5%	12,50	R
Ácido ascórbico 5%	9,68	R
Ácido cítrico 1%	7,21	R
Ácido cítrico 0,5%	6,96	R
Ácido ascórbico 2,5%	6,00	R
Ácido láctico 1%	5,25	R
Ácido ascórbico 1%	5,25	R
Ácido cítrico 0,25%	5,12	R
Ácido láctico 0,5%	3,93	R
Kilol-L 10%	3,00	R
Ácido ascórbico 0,5%	2,75	R
Ácido ascórbico 0,25%	2,68	R
Kilol-L 5%	1,87	R
Kilol-L 2,5%	1,25	R
Ácido láctico 0,25%	0,87	R
Kilol-L 0,8%	0,0	R
Kilol-L 0,4%	0,0	R
Testemunha (ADE)	0,0	-

478 ¹ Valores são médias de dois experimentos (values are means of two experiments).

479 ² Determinada pela mensuração do tamanho do halo de inibição, em mm. R = resistência (halo ≤ 14 mm),
 480 MS = média sensibilidade (14 mm < halo < 20 mm) e AS = alta sensibilidade (halo ≥ 20 mm), conforme
 481 Acar e Goldstein (1986) (determined by measuring the size of inhibition zone in mm. R = resistance (≤ 14
 482 mm halo), MS = moderate sensitivity (14 mm < halo < 20 mm) and AS = high sensitivity (≥ 20 mm halo)
 483 according to Acar and Goldstein (1986).

484

485 **Tabela 2.** Efeito de Kilol-L[®] e ácidos componentes de sua formulação no controle da
486 murcha bacteriana do pimentão, aplicados por imersão das raízes ou pulverização da
487 parte aérea em plantas com 21 dias, avaliado pelo período de incubação e área abaixo da
488 curva de progresso da doença (AACPD), em casa de vegetação (effect of Kilol-L[®] and
489 its components in the control of bacterial wilt of sweet pepper, applied by dipping the
490 roots or shoot spraying 21-days-plants, assessed by incubation period and area under the
491 disease progress curve (AUDPC) in the greenhouse). Recife, UFRPE, 2010.

Produtos	Período de Incubação ¹ (dias)		AACPD	
	Imersão	Pulverização	Imersão	Pulverização
Kilol-L 0,8%	8,2 ² bcA	11,6 aA	18,9 aA	14,4 aA
Ácido ascórbico 1%	11,6 abA	6,4 bA	9,9 bB	29,7 aA
Ácido cítrico 1%	13,6 abA	8,6 aA	3,6 bB	15,9 aA
Ácido láctico 1%	16 aA	7,2 bB	0,0 bB	18,8 aA
Testemunha	2,2 cA	2,2 bA	30,6 aA	30,0 aA
		C.V.(%) = 40,57	C.V.(%) = 50,17	

492

493 ¹Período de incubação determinado pelo número de dias entre a inoculação e o surgimento dos sintomas
494 da doença. AACPD calculada segundo Fry (1978) (incubation period determined by number of days
495 between inoculation and symptoms appearance. AACPD calculated according to Fry (1978).

496 ²Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem
497 significativamente entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05). Valores são médias de dois experimentos
498 (means followed by same lowercase letters in the column and uppercase letters in the line do not differ
499 significantly by Tukey's test (P ≤ 0.05). Values are means of two experiments).

500

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Os isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos nas Mesorregiões Agreste e Mata do estado de Pernambuco apresentaram baixa variabilidade bioquímica, sendo que houve predominância da biovar 3, biotipo 8 e filotipo I;
- ✓ A caracterização da virulência evidenciou alta variabilidade, com isolados de diferentes áreas em um mesmo grupo;
- ✓ As técnicas de Rep-PCR e ISSR apontaram similaridade entre a maioria do isolados do patógeno;
- ✓ Os primers REP e BOX (Rep-PCR) e GTG5, GACA e 820 (ISSR) não foram eficientes em agrupar os isolados de *R. solanacearum* de pimentão quanto a biovars, biotipos, filotipos, nem áreas diferentes;
- ✓ Os índices de diversidade genotípica evidenciaram alta diversidade entre os isolados pertencentes ao mesmo município, porém uma diversidade moderada quando considerada a população total dos isolados;
- ✓ Apenas o ácido láctico a 10% foi altamente eficiente na inibição de *R. solanacearum in vitro*;
- ✓ O produto higienizante Kilol-L[®] foi medianamente eficiente na inibição *in vitro* de *R. solanacearum* apenas na concentração 100%, similarmente aos ácidos láctico a 5 e 2,5%, ascórbico 10% e cítrico 10%;
- ✓ Foi evidenciada uma ação direta *in vitro* dos produtos sobre o patógeno, apenas em altas concentrações;
- ✓ Os tratamentos com ácidos em concentrações maiores que 1% e Kilol-L[®] acima de 0,8% induziram reação de fitotoxidez em plantas de pimentão com 21 dias de idade;

- ✓ O Kilo[®] não foi eficiente em reduzir a severidade da murcha bacteriana do pimentão, enquanto que os ácidos ascórbico, cítrico e láctico a 1%, aplicados pela imersão de raízes, aumentaram o período de incubação e reduziram a área abaixo da curva de progresso da doença, atingindo controle total da mesma com o último tratamento;

- ✓ O método de aplicação pela imersão de raízes diferiu significativamente da pulverização da parte aérea para a maioria dos produtos;

- ✓ O controle total da doença obtido com ácido láctico 1% é muito promissor no manejo da murcha bacteriana em pimentão, devendo ser somado a outras medidas de controle como plantio em áreas indenadas, rotação de culturas, manejo da água e da fertilidade do solo.