

KÁTIA CILENE DA SILVA FELIX

**SOBREVIVÊNCIA DE *Ralstonia solanacearum* EM TECIDOS
INFECTADOS DE PIMENTÃO E DIFERENTES TIPOS DE SOLO
DE PERNAMBUCO, BRASIL**

RECIFE – PE

Fevereiro, 2009

KÁTIA CILENE DA SILVA FELIX

**SOBREVIVÊNCIA DE *Ralstonia solanacearum* EM TECIDOS
INFECTADOS DE PIMENTÃO E DIFERENTES TIPOS DE SOLO
DE PERNAMBUCO, BRASIL**

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

RECIFE – PE

Fevereiro, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

F316s Felix, Kátia Cilene da Silva
Sobrevivência de *Ralstonia solanacearum* em resto de cultura de pimentão e diferentes tipos de solo de Pernambuco, Brasil / Kátia Cilene da Silva Felix. -- 2009.
86 f. : il.

Orientadora : Rosa de Lima Ramos Mariano
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.
Inclui bibliografia.

CDD 632.3

1. *Capsicum annuum*
2. Murcha-bacteriana
3. Solanáceas
4. Cultura
5. Persistência
6. Ecologia
7. Pernambuco (BR)
 - I. Mariano, Rosa de Lima Ramos
 - II. Título

**SOBREVIVÊNCIA DE *Ralstonia solanacearum* EM TECIDOS
INFECTADOS DE PIMENTÃO E DIFERENTES TIPOS DE SOLO
DE PERNAMBUCO, BRASIL**

KÁTIA CILENE DA SILVA FELIX

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Professora Dr^a. Rosa de Lima Ramos Mariano – Orientadora

Professora Dr^a. Elineide Barbosa da Silveira – Co-orientadora

Professor Dr. Sami Jorge Michereff – Co-orientador

Recife – PE

FEVEREIRO, 2009

SOBREVIVÊNCIA DE *Ralstonia solanacearum* EM TECIDOS
INFECTADOS DE PIMENTÃO E DIFERENTES TIPOS DE SOLO DE
PERNAMBUCO, BRASIL

KÁTIA CILENE DA SILVA FELIX

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 18 de fevereiro de 2009.

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Rosa de Lima Ramos Mariano

EXAMINADORES:

Dr. Domingos Eduardo Guimarães Tavares de Andrade
(Instituto de Pesquisa Agropecuária- PE)

Dr^a. Sayonara Maria Paulino de Assis
(Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento)

Dr. Ailton Reis (Embrapa Hortaliças)

RECIFE – PE

FEVEREIRO, 2009

"Para adquirir **conhecimento**, é preciso estudar;
mas para adquirir **sabedoria**, é preciso observar."

(Marilyn vos Savant)

*Aos meus irmãos, **Karine Felix Militão, Kleber Felix, Kleriston Felix e Maria Felix**, ao meu cunhado **Haroldo Militão**, meu sobrinho amado **Murilo** e meus tios e avôs, pelo apoio, incentivo, amor e compreensão em todos os momentos.*

OFEREÇO

*Aos verdadeiros amores da minha vida, meus pais **José Felix Dão e Rosimeire da Silva Felix**, pelo exemplo de vida, caráter, dedicação e amor, a quem sempre tiveram como prioridade os estudos dos seus filhos, meu eterno agradecimento.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida e força suprema nos momentos difíceis desta minha caminhada;

À Professora **Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano**, pela orientação acadêmica, que muito contribuiu para minha formação profissional, empenho, atenção, dedicação, amizade e, sobretudo, sua *paciência* que deixou até os dias mais estressantes terminarem mais leves.

Ao **Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)**, pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação, Mestrado/Fitopatologia;

Ao **Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia e aos Membros do Conselho de Coordenação Didática (CCD)**, pela confiança e apoio em mim depositados;

Aos **professores que compõem o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)**, pelos ensinamentos transmitidos com seriedade e compromisso, em especial, aos professores *Elineide B. Silveira e Sami J. Michereff*, pela ajuda e orientação constante durante toda execução desta dissertação;

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela concessão de bolsa de estudo;

Meu grande agradecimento a toda equipe que compõe o **Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)**, pela valiosa ajuda em todos os momentos durante a execução deste trabalho. Como costumamos brincar: câmara de fluxo laminar – 10.000,00, material para preparação de

meios de cultura – 3.500,00, casa de vegetação - 10.000,00, para tudo na vida têm preço, **ter amigos que podemos contar a qualquer hora isso não tem preço**. Um agradecimento especial aos colegas *Adriano e Marcelo Rodrigues* que tornaram os últimos dias mais descontraídos.

A todos os **amigos de turma**, *Alessandra, Alba Valéria, Cintia, Clêido, Eddy, Gustavo, Hailson, Isadora, Janaína, Leonardo, Sarah*, obrigada pelos momentos de descontração durante as disciplinas, principalmente Micologia.

Aos **amigos**, *Alessandra Garcia, Clêido Cabral, Emellynne Costa, Erika Graciano, Isadora Franca, Juliana Carnaúba, Joyce Lima, Kirley Marques, Ligia Andrade, Marcio Félix, Sarah Cavalcante e Thais Oliveira*, a minha imensa gratidão, pelo companheirismo de todos os momentos dessa trajetória, amizade e toda força recebida;

À *Darcy Martins, Romildo Angeiras e Adriana Melo*, pela amizade e presteza, ao longo do curso;

A *Luiz Coelho (Lula)* e a *Sr. Luís* pelo apoio na realização dos trabalhos executados em casa de vegetação;

Finalmente, a todos que de uma forma ou de outra, participaram de todos os momentos vividos nessa jornada, minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
SUMÁRIO	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
Capítulo I – Introdução Geral	16
Cultura do pimentão.....	16
Murcha-bacteriana do pimentão (<i>Ralstonia solanacearum</i>)	17
Importância da Doença.....	17
Características do Patógeno.....	19
Deteção do patógeno e sobrevivência.....	22
Referências Bibliográficas.....	28
Capítulo II - SOBREVIVÊNCIA DE <i>Ralstonia solanacearum</i> EM TECIDOS INFECTADOS DE PIMENTÃO E DIFERENTES TIPOS DE SOLO DE PERNAMBUCO, BRASIL	42
Resumo	42
Abstract	43
1. Introdução	45
2. Material e métodos	48
2.1. Obtenção de mutante de <i>R. solanacearum</i> resistente ao antibiótico rifampicina e teste de viabilidade em solos.....	48
2.2. Sobrevivência de <i>R. solanacearum</i> em tecidos infectados de pimentão no solo.....	49
2.3. Sobrevivência de <i>R. solanacearum</i> em diferentes tipos de solo.....	53
2.4. Análise Estatística.....	54
3. Resultados	55

3.1. Obtenção de mutante de <i>R. solanacearum</i> resistente ao antibiótico rifampicina e teste de viabilidade em solos.....	55
3.2. Sobrevivência de <i>R. solanacearum</i> em tecidos infectados de pimentão no solo.....	55
3.3. Sobrevivência de <i>R. solanacearum</i> em diferentes tipos de solo.....	57
4. Discussão.....	60
4.1. Obtenção de mutante de <i>R. solanacearum</i> resistente ao antibiótico rifampicina e teste de viabilidade em solos.....	60
4.2. Sobrevivência de <i>R. solanacearum</i> em tecidos infectados de pimentão no solo.....	61
4.3. Sobrevivência de <i>R. solanacearum</i> em diferentes tipos de solo.....	64
5. Agradecimentos.....	68
6. Referências	69
CONCLUSÕES GERAIS.....	87

RESUMO

A murcha-bacteriana do pimentão é causada por *Ralstonia solanacearum*, raça 1, biovars 1 e 3 e causa grandes prejuízos à cultura desta solanácea. Este trabalho teve por objetivo estudar a sobrevivência do patógeno em tecidos infectados de caule e raiz incorporados ao solo às profundidades de 0, 5 e 15 cm; e em 10 diferentes tipos de solo na ausência da planta hospedeira. Foi utilizado um mutante resistente a 100 mg l⁻¹ de rifampicina (*R. solanacearum* A1-9^{Rif}). A sobrevivência do patógeno diferiu significativamente ($P \leq 0,05$) apenas em relação aos tecidos vegetais analisados isoladamente. Desta forma, tecidos de raiz de pimentão apresentaram maior duração da sobrevivência (17,1 d), área abaixo da curva da população (AACPOP) (430×10^4) e população aos 7 (POP7) ($5,0 \times 10^4$ UFC g⁻¹ tecido) e 21 dias (POP21) ($3,1 \times 10^4$ UFC g⁻¹ tecido) que os de caule, que foram respectivamente, 7,0 d; 3,8; $0,35 \times 10^4$ e $0,48 \times 10^4$ UFC g⁻¹ tecido. Por outro lado, os tecidos do caule apresentaram maior índice de decomposição (81,3%) e pH (7,7) do que os de raízes, respectivamente 68,9% e 6,8. A análise microbiológica prévia deste solo não evidenciou diferenças significativas entre as populações de actinomicetos, bactérias copiotróficas, bactérias totais e fungos totais, que foram de 5,02; 3,63; 5,23 e 4,19 log UFC g⁻¹ solo seco, respectivamente. Não foram encontradas populações de bactérias oligotróficas, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. fluorescentes, e *Trichoderma* spp. Entre os 10 tipos de solos estudados, sete foram classificados como supressivos por apresentarem baixas duração da sobrevivência (42 a 49 dias), AACPOP (0,77 a 4,05), POP14 (5,59 a 6,18 log UFC g⁻¹ solo) e POP42 (5,44 a 6,31 log UFC g⁻¹ solo). Os solos S3, S4 e S6 foram avaliados como condutivos. Neste estudo, apenas algumas características físicas e químicas apresentaram correlação significativa com duração da sobrevivência, AACPOP e POP42, considerando todos os

solos em conjunto ou apenas os supressivos, destacando-se argila, umidade residual e água disponível que apresentaram correlação positiva e o pH com correlação negativa.

Palavras-chaves: *Capsicum annuum*, murcha-bacteriana, solanáceas, restos de cultura, persistência e ecologia.

ABSTRACT

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*, race 1, biovars 1 and 3 causes severe damage to pepper growth in Agreste region of state of Pernambuco in Brazil. The pathogen survival in infected tissues of stem and roots incorporated to the soil at 0, 5 and 15 cm; and at 10 different soil types of Pernambuco without host plant was studied by using a spontaneous mutant resistant to 100 mg l⁻¹ of rifampicin (*R. solanacearum* A1-9^{Rif}). Pathogen survival only showed difference ($P \leq 0.05$) in relation to vegetal tissue. Pepper root tissues showed higher survival duration (DUR) (17.1 d), area under population curve (AACPOP) (430×10^4) and population at 7 (POP7) (5.0×10^4 UFC g⁻¹ tissue) and 21 days (POP21) (3.1×10^4 UFC g⁻¹ tissue) than stem tissues, which were respectively, 7.0 d; 3.8×10^4 ; 0.35 and 3.1×10^4 UFC g⁻¹ tissue. On the other hand stem tissues presented higher decomposition index (81.3%) and pH (7.7) than root tissues, respectively 68.9% and 6.8. The previous soil microbiological analysis did not find differences among populations of actinomycetes, copiotrophic, bacteria, total bacteria and total fungi respectively 5.02; 3.63; 5.23 and 4.19 log UFC g⁻¹ dry soil. Populations of oligotrophic bacteria, *Bacillus* spp., fluorescent *Pseudomonas* spp. and *Trichoderma* spp. were not detected. The pathogen was isolated from the soil adjacent to infected tissues of stem and roots at the three depths six weeks after experiment establishment. The analysis of AACPOP in relation to locals (counties) of soil sampling, type of soil coverage at the sampling time and soil texture was not significant by Kruskal-Wallis test ($P \leq 0.05$). Among the 10 studied soils, seven were classified as suppressive showing low intervals of DUR (42 to 49 days), AACPOP (0.77 to 4.05), POP14 (5.59 to 6.18 log UFC g⁻¹ soil) and POP42 (5.44 to 6.31 log UFC g⁻¹ soil). The soils S3, S4 and S6 were evaluated as conducive. Considering all soils together or only the suppressive, DUR,

AACPOP and POP42 only showed significant correlation with soil physical and chemical characteristics, positive for clay, residual humidity and useful water and negative for pH. The population of copiotrophic bacteria, actinomycetes, total bacteria, total fungi (*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Rhizopus* spp. were identified) and *Bacillus* spp. did not differ among the 10 soil types.

Key words: *Capsicum annuum*, bacterial wilt, solanaceous, crop residue, ecology, persistence.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO

A CULTURA DO PIMENTÃO

No Brasil, o cultivo de hortaliças desempenha um papel preponderante no agronegócio, representando cerca de 3,5% do PIB agrícola (FILGUEIRA, 2000), e gerando em torno de 2,4 milhões de empregos diretos (AGRIANUAL, 2004). Em 2007, este cultivo ocupava cerca de 800 mil hectares, com produção de 16 milhões de toneladas (AGRIANUAL, 2008).

O pimentão é uma das hortaliças mais apreciadas, consumidas e produzidas no Brasil e está entre as cinco com maior área cultivada no mundo (HALFELD-VIEIRA et al., 2005). Botanicamente é classificado como *Capsicum annuum* L. pertencente à família das solanáceas; é uma planta perene, embora seja cultivada como anual (FILGUEIRA, 2003). O gênero *Capsicum* apresenta uma crescente importância no Brasil e em outros países, tanto para o consumo in natura, como para o processamento em molhos, temperos e conservas (AZEVEDO et al., 2006). Juntamente com as pimentas (*Capsicum* sp.) tem seu centro de origem no continente americano, ocorrendo em várias formas silvestres desde o sul dos Estados Unidos até ao norte do Chile. Depois do descobrimento das Américas essas espécies foram levadas para outros países e hoje se encontram dispersas em todos os continentes (FILGUEIRA, 2003).

O fruto de pimentão tem forma de baga oca, alongada ou cúbica de coloração verde, amarela vermelha ou roxa. Pela ausência do alcalóide capsicina não apresenta o sabor picante característico das diversas pimentas do gênero *Capsicum* L. Os frutos de *Capsicum* são fontes importantes de três antioxidantes naturais: vitamina C, carotenóides e vitamina E. Podem atingir cerca de 180 mg de ácido ascórbico por cada 100g de fruto, sendo mais ricos em vitamina C que as frutas cítricas (FILGUEIRA,

2003). Segundo Hornero-Méndez et al. (2000) os teores de carotenóides em pimentão variam com relação a cultivar ou variedade avaliada.

Por ser uma planta de origem tropical, as cultivares de pimentão não são tolerantes a frio e geadas, preferindo temperaturas mais altas (25° a 30°C). Em regiões de clima temperado apresentam melhor desenvolvimento quando o cultivo é feito na época em que não há riscos de ocorrência de geadas (HENZ et al., 2007).

Apesar da crescente produção e de novas tecnologias de cultivo, os problemas fitossanitários do pimentão ainda são fatores de perda de produtividade. Segundo a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Distrito Federal (EMATER-DF), os custos com agrotóxicos atingem aproximadamente 2.250,00 reais por hectare em produção de campo, e mais de 2.600,00 reais por hectare em cultivo de estufa (EMATER-DF, 2007).

MURCHA-BACTERIANA DO PIMENTÃO (*Ralstonia solanacearum*)

Importância da Doença

A murcha-bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., é uma das mais importantes e prejudiciais doenças de plantas no Brasil e no mundo. Esta importância está relacionada ao grande número de espécies afetadas, possuindo mais de 200 hospedeiros distribuídos em cerca de 50 famílias botânicas, e as perdas econômicas difíceis de quantificar. É particularmente limitante em áreas de clima úmido, com altitudes baixa a média, em regiões tropicais e subtropicais (HAYWARD, 1991).

Em pimentão, a murcha-bacteriana é causada por *R. solanacearum* raça 1, biovars 1 e 3, a mesma que causa a doença em tomate e outras solanáceas. Esta raça está amplamente disseminada pelas principais áreas de produção de pimentão em todas as

regiões do Brasil, principalmente no Norte, Nordeste e Centro-Oeste (MARQUES et al., 1994). No Estado do Amazonas, Netto et al. (2003) registraram a doença em 25 municípios entre os anos de 1998 e 2000. Ocorre também nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima e São Paulo (MALAVOLTA et al., 2008). Em Pernambuco, apesar da murcha bacteriana ocorrer anteriormente em pimentão e tomate, o primeiro relato formal da doença em pimentão foi realizado em 1987 por MARIANO et al. (1988; 1989). Atualmente, observa-se um aumento na importância da doença nesse Estado, principalmente nos municípios produtores de Camocim de São Félix, Bezerros, São Joaquim do Monte, Sairé e Bonito.

Os sintomas da doença iniciam-se com murcha das folhas progredindo para morte da planta, sem alteração na coloração, semelhantemente ao que ocorre na deficiência hídrica. Após corte transversal do caule, observa-se o escurecimento do sistema vascular. Quando o teste do copo é realizado, revela a exsudação do pus bacteriano (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997).

Ralstonia solanacearum penetra por ferimentos nas raízes invade os espaços intercelulares do córtex da raiz em menos de 4 horas e após 2 a 3 dias coloniza inteiramente esses espaços e o parênquima vascular (SAILE et al., 1997), movimentando-se em direção à parte superior da planta. A presença do grande número de células bacterianas e a produção de exopolissacarídeo (EPS), considerado o principal fator de virulência deste patógeno, resulta na redução do transporte de água e conseqüente murcha (HIKICHI et al., 2007). O mecanismo de ataque inicial das raízes e o quimiotactismo ainda não foram bem esclarecidos, porém evidências sugerem que o mesmo esteja relacionado com os pili e o papel de alguns lipopolissacarídeos (ROMANTSCHUK, 1992).

A epidemiologia da murcha-bacteriana é considerada complexa, por envolver a interação de vários fatores (BUDDENHAGEN; KELMAN, 1964). Embora a disseminação de *R. solanacearum* por implementos agrícolas e a transmissão raiz-raiz sejam bem compreendidas (KELMAN; SEQUEIRA, 1965), vários outros aspectos ainda não foram totalmente esclarecidos e necessitam de mais investigações, tais como, a ocorrência e sobrevivência da bactéria em sementes, solo, água, restos de cultura, infecções latentes, hospedeiros alternativos e plantas invasoras (COUTINHO, 2005; GRAHAM et al., 1979).

O controle de *R. solanacearum* é extremamente difícil, principalmente devido à ampla gama de hospedeiros, à alta variabilidade genética e à sobrevivência no solo por longos períodos em grandes profundidades tornando o controle químico inviável e anti-econômico (LOPES et al., 1994).

Características do Patógeno

Ralstonia solanacearum é uma bactéria habitante do solo, aeróbica, em forma de bastonetes Gram-negativos, com aproximadamente 0,5 x 1,5 µm, não formadora de esporos. Isolados virulentos são essencialmente não flagelados e não móveis, enquanto os isolados avirulentos têm alta motilidade sendo providos de 1 a 4 flagelos. A bactéria acumula poli-β-hidroxi-butirato como reserva de carbono. Embora não produza pigmento fluorescente, produz pigmento marrom em meio de cultura sólido contendo tirosina. Frequentemente pode reduzir nitrato a nitrito com produção de gás, mas não hidrolisa o amido. É fraca degradadora de gelatina e não utiliza arginina ou betaina como fonte de carbono. É tolerante a sais e cresce em temperatura entre 25 a 35°C, variando de acordo com os isolados (MEHAN et al., 1994).

A nomenclatura de *R. solanacearum* tem sofrido algumas mudanças desde a primeira descrição feita por Smith em 1896, quando foi denominada *Bacillus solanacearum* Smith. Em 1914 passou a *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, e em 1992 Yabuuchi e colaboradores propuseram um novo gênero, *Burkholderia*, para o qual transferiram sete espécies do gênero *Pseudomonas*, entre elas *P. solanacearum*, que passou a ser denominada de *Burkholderia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (YABUUCHI et al., 1992). Finalmente em 1995, com base na análise molecular da seqüência do gene da região 16S do rRNA e análises quimiotaconômicas, passou a ser designada de *R. solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (YABUUCHI et al., 1995)

O gênero *Ralstonia* está assim classificado: reino Procariotae, divisão Bactéria, classe Proteobacteria, subclasse β -Proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae (EUZÉBY, 2009). Esta bactéria é caracterizada pela alta diversidade de fenótipos e genótipos, sendo necessária a utilização de sistemas de classificação a nível subespecífico Tradicionalmente, a espécie tem sido dividida em cinco raças e cinco biovars, com base na gama de hospedeiros e nas propriedades bioquímicas, respectivamente (FEGAN; PRIOR, 2005; GILLINGS; FAHY, 1994).

A raça 1 afeta o maior número de culturas incluindo solanáceas tais como, batata (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Solanum lycopersici* L.), pimentão, berinjela (*Solanum melongena* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e plantas de outras famílias, entre as quais, amendoim (*Arachis hypogaea* L.), oliveira (*Olea* sp. L.), bananeira ornamental (*Musa* sp.), ave do paraíso (*Strelitzia reginae* Banks) e em alguns locais, helicônia (*Heliconia* spp.). A raça 2 afeta bananeira triplóide (banana comestível e banana subgrupo Terra ou “plátano”) e helicônias (HAYWARD, 1994), enquanto a raça 3 é considerada específica da batata e ocasionalmente tomate, mas não outras culturas (BUDDENHAGEN et al.,

1962). As raças 4 e 5 infectam o gengibre e a amoreira, respectivamente (HAYWARD, 1994).

As biovars 1, 2, 3, 4 e 5 são definidas pelas propriedades bioquímicas, através da utilização de açúcares e álcoois como única fonte de carbono e a formação de ácidos a partir destes carboidratos, além da produção de nitrito e gás a partir de nitrato (HAYWARD, 1964; HE et al., 1983).

No Brasil, segundo Malavolta et al. (2008) a murcha-bacteriana do pimentão já foi constatada nos Estados do Amazonas, Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima e São Paulo. Segundo Lopes et al. (2005) na região Norte do Brasil o maior número dos isolados de *R. solanacearum* obtidos de pimentão pertencem à raça 1, biovars 1 e 3. Martins et al. (1988) estudaram diversos isolados de *R. solanacearum* de vários hospedeiros, sendo que os de pimentão provenientes do Amazonas, Pernambuco e Paraíba pertenciam a biovar 3. Não foram encontrados outros relatos de caracterização de isolados de pimentão em diferentes Estados ou regiões do Brasil.

A diversidade filogenética de *R. solanacearum* foi demonstrada por Cook et al. (1989), os quais usando análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (restriction fragment length polymorphism - RFLP) definiram 28 grupos. Esta análise permitiu prever raça e biovar de isolados desconhecidos. O exame das relações entre esses grupos mostrou a existência de duas divisões geneticamente distintas (I e II) fortemente relacionadas com a origem geográfica dos isolados, respectivamente Austrália, Ásia e Américas. Posteriormente, o número de grupos RFLP foi expandido para 33 (COOK et al., 1991) e continuará crescendo à medida que novos isolados forem estudados (GILLINGS; FAHY, 1994).

Atualmente, segundo Fegan e Prior (2005), *R. solanacearum* é considerada um complexo de espécies, que pode ser definido como “um grupo de isolados estreitamente relacionados os quais podem representar mais de uma espécie”. Este complexo é classificado em filotipos, sequevares, linhas clonais e biotipos. Esta nova classificação é flexível, podendo agregar novos genótipos à medida que forem descobertos, e reflete melhor a diversidade do complexo e confirma o estudo com RFLP (FEGAN; PRIOR, 2005). Ji et al. (2007), compararam seqüências de genes de isolados de pimentas, gerânios e hortênsia na Flórida, e verificaram que os isolados de pimenta pertenciam ao filotipo I e biovar 3, sendo semelhantes a isolados de hospedeiros da Ásia.

Deteccão do patógeno e sobrevivência

Métodos de deteção de *R. solanacearum* em sementes, plantas, solo e água vem sendo estudados e descritos há vários anos, porém com pouco sucesso devido a complexidade da bactéria, o que ocasionou um atraso na elaboração de métodos mais sensíveis de deteção (COUTINHO, 2005).

Entretanto, novos métodos mais sensíveis têm sido descritos para a deteção de *R. solanacearum*, em baixas concentrações, em água, solo e material vegetal (van ELSAS et al., 2000), a exemplo dos métodos moleculares utilizados por Poussier et al. (2002). Esses métodos têm promovido uma maior compreensão das estratégias de sobrevivência usadas por esse patógeno, assim como a extensão, distribuição e persistência dessa bactéria em material vegetal, água de irrigação e solo (COUTINHO, 2005).

Além dos métodos moleculares, nem sempre ao alcance de todos os laboratórios, meios semi-seletivos e mutantes com resistência espontânea a antibióticos, tais como rifampicina, ácido nalidíxico e estreptomina tem se mostrado eficientes para estudos de colonização e sobrevivência de microrganismos introduzidos em ambiente

complexos (WANG et al., 1999; TOUSSAINT et al., 2001; MARIANO; McCARTER, 1991). A resistência à antibióticos funciona como marcador genético do isolado, que pode ser monitorado após introdução em plantas ou solo, por métodos simples, a exemplo de isolamento em meio de cultura contendo o referido antibiótico. A resistência a rifampicina é geralmente mediada pela mutação na subunidade β da RNA polimerase, mutação essa incomum entre bactérias habitantes do solo, o que a recomenda para tais estudos (COMPEAU et al., 1988). Embora a razão para o uso deste marcador em estudos ecológicos esteja baseada nas vantagens para recuperação e enumeração (COMPEAU et al., 1988), há evidências de que tal método pode afetar a fisiologia dos microrganismos (SCHROTH, 1992). Assim, para o estudo de dinâmica das populações bacterianas recomenda-se que o mutante apresente além de estabilidade, patogenicidade e crescimento similares ao isolado selvagem (MARIANO; McCARTER, 1991).

Os microrganismos, incluindo as bactérias fitopatogênicas, quando se encontram em ambientes com ausência ou deficiência de nutrientes (ROMEIRO, 2005), estando ou não associados ao hospedeiro, desenvolvem diversos mecanismos de sobrevivência, os quais têm sido definidos como: manutenção da viabilidade sob condições adversas (ROSZAK; COLWELL, 1987). *Ralstonia solanacearum* tem capacidade saprofítica, apresentando persistência notável em vários habitats sob circunstâncias específicas (van OVERBEEK et al., 2004). A capacidade de *R. solanacearum* colonizar e sobreviver na rizosfera e em raízes de plantas hospedeiras, plantas não hospedeiras de importância econômica e plantas invasoras tem sido relatada por diversos autores (QUIMIO; CHAN, 1979; GRANADA; SEQUEIRA, 1983; SEQUEIRA, 1993; WENNEKER et al., 1999; MIRANDA et al., 2004; COUTINHO, 2005).

A sobrevivência por longo período pode estar associada com a localização ou tipo de infecção na planta que não expressa sintomas de murcha (SEQUEIRA, 1993). Evidências sugerem que a fase epifítica ou residente, no ciclo de vida de *R. solanacearum*, pode ser uma importante fonte de inóculo por renovar a população existente no solo (HAYWARD, 1991). A ocorrência de *R. solanacearum* em plantas com infecção latente e a não expressão dos sintomas da doença pode levar a uma conclusão errônea de que as mesmas possuam alguma resistência a bactéria. No cultivo da batata em especial, a infecção latente pode constituir um grande problema, pois em baixas temperaturas não há aparecimento de sintomas, mas o armazenamento ou plantio dos tubérculos sob condições favoráveis à expressão da doença pode ter conseqüências devastadoras (COUTINHO, 2005).

Em sementes, a sobrevivência de *R. solanacearum* foi demonstrada apenas para amendoim e pode estar associada ao conteúdo de água disponível (10%) nesta semente (MACHMUND; MIDDLETON, 1991).

O solo pode ser considerado um ambiente oligotrófico, onde a capacidade de sobrevivência dos microrganismos depende da sua habilidade em resistir à falta de nutrientes e água, e a exposição a metais pesados (GREY; STECK, 2001; HASHIMOTO et al., 2006). No entanto, *R. solanacearum* pode persistir por longo tempo no solo (GRAHAM et al., 1979; GRANADA; SEQUEIRA, 1983), principalmente na rizosfera, ambiente rico em nutrientes comparado ao solo compactado (COUTINHO, 2005).

Graham et al. (1979), demonstraram que restos de cultura infectados são importantes formas de sobrevivência a curto prazo em clima temperado no Nordeste de New South Wales, Austrália. Nesta região *R. solanacearum* raça 3 sobreviveu em restos de cultura infectados até 33 semanas e quando estes restos foram adicionados a solo não

infestado e mantidos em vasos enterrados no solo, a sobrevivência durou até 26 e 32 semanas. No entanto, já foi provado que *R. solanacearum* raça 3 sobrevive por 1 a 2 anos quando o solo está em pousio pleno ou pousio com plantas invasoras (SHANSUDIN et al., 1979). É importante evidenciar as diferenças na sobrevivência de raças de *R. solanacearum*, principalmente as raças 1 e 3, já que a primeira é encontrada em regiões tropicais e sub-tropicais do globo onde tem grande número de hospedeiros e a segunda em regiões de clima temperado infectando principalmente a batata. Segundo Graham et al. (1979), os restos de cultura se decompõem gradualmente, principalmente em condições de solo úmido e quente que apenas ocorrem durante o verão em New South Wales, sendo portanto pouco provável que esses restos sejam locais de sobrevivência para raça 3 da bactéria por períodos mais longos que 2 anos. Já *R. solanacearum* raça 1 que afeta entre outras espécies, o pimentão e plantas invasoras, encontra apenas locais de sobrevivência temporários nos restos de cultura, que são rapidamente decompostos pela microbiota dos solos úmidos e quentes. Van Elsas et al. (2000) verificaram que o tipo de solo afetou a taxa de declínio da população a 20°C com maior redução ocorrendo em solo argiloso-arenoso. Flutuações moderadas de umidade, cerca de pF 2 não afetaram a presença da *R. solanacearum* no solo, mas a seca severa reduziu drasticamente as populações. Os autores afirmaram ainda que a presença de tubérculos de batata, plantas daninhas e restos de cultura em campo podiam contribuir potencialmente para a sobrevivência do patógeno.

Fatores abióticos a exemplo de temperatura, pH, umidade e tipo de solo e bióticos tais como, presença e atividade de organismos predadores, antagonistas e/ou competidores, podem influenciar a sobrevivência da bactéria no solo (Van VEEN et al., 1997).

Van Elsas et al. (2000) observaram que a população de *R. solanacearum* biovar 2 mantida em microcosmos de solo a 12°C ou 15°C e 20°C foi progressivamente reduzida, chegando em alguns casos ao limite de detecção (10^2 UFC g⁻¹ de solo seco) em aproximadamente 90 a 210 dias. Os autores demonstraram ainda que a persistência de *R. solanacearum* em colunas de solo dependia da temperatura e umidade. Para algumas bactérias, a estrutura física e composição química do solo são características que também interferem na sobrevivência (Stamford et al., 2005).

Martins (2000) estudando a sobrevivência de *R. solanacearum* em solos incubados a diferentes temperaturas, obteve uma maior recuperação de células viáveis da bactéria em temperatura de 27 a 30 °C. O estudo da umidade do solo merece atenção especial porque ela regula diretamente as atividades da microbiota tais como, germinação, viabilidade e agressividade patogênica (MONDAL et al., 1995). Kongkiattikajorn e Tepa (2006) verificaram que o estresse de temperaturas extremas no solo afeta o crescimento microbiano competitivo sendo um importante mecanismo no enfraquecimento dos microrganismos em solo. Tratamento do solo em temperaturas constantes de 45°C por 2 dias ou de 60°C por 2 horas reduziu de 55 a 85% da incidência da murcha-bacteriana do milho causada por *Ralstonia* spp., cuja população também foi diminuída.

Existem relatos da supressão de *R. solanacearum* por certos componentes solúveis em água como C e N que promovem a atividade microbiana. Posas et al. (2007) verificaram que a adição dos açúcares e aminoácidos, glicose, prolina, glutamina, serina, arginina e lisina ao solo causou supressividade à murcha-bacteriana do tomateiro. Esses componentes orgânicos simples são decompostos por microrganismos habitantes do solo e estimulam a atividade antagônica reduzindo a sobrevivência do patógeno. Okamura et al. (2002) verificaram que a densidade da *R. solanacearum* no

solo foi reduzida pela adição de serina e glicina, aminoácidos não utilizados pelo patógeno, baixando a taxa de sobrevivência e elevando a supressividade à murcha no tomateiro.

Outros trabalhos também descrevem que a modificação do solo reduz significativamente a sobrevivência de *R. solanacearum*. Michel e Mew (1998), observaram que em solos modificados com uréia e óxido de cálcio (CaO) houve redução na sobrevivência de *R. solanacearum* raça 1 biovar 3 após três semanas, fato explicado pelo aumento no pH e concentração de nitrito, que promoveram efeito supressivo ao patógeno. Messiha et al. (2007) verificaram que, em mesocosmo de solo biologicamente desinfestado, pela adição de grama fresca e cobertura com plástico induzindo condições de anaerobiose, aos 31 dias a população de *R. solanacearum* raça 3 biovar 2 foi quase erradicada, restando apenas 0,59 Log UFC g⁻¹ solo seco em comparação com outros tratamentos onde se encontrava 3,6 Log UFC g⁻¹ solo seco. Em campo com solo biologicamente desinfestado, pela adição de restos de cultura de batata infectados com a murcha-bacteriana (30 ton massa fresca ha⁻¹) e submetidos a condições de anaerobiose pela compactação e cobertura plástica, quando tubérculos de batata foram incorporados em sacos de nylon nas profundidades de 15 e 35 cm ou deixados na superfície do solo após a colheita houve significativo declínio da população de *R. solanacearum*. Segundo os autores, o tratamento não causou redução da diversidade bacteriana, mas mudança na composição da mesma, propiciando assim supressividade a doença, pela destruição das fontes de inóculo no campo.

O entendimento da ecologia e dos fatores que afetam a sobrevivência de *R. solanacearum* em diferentes tipos de solos é prioritário (MESSIHA, 2006). Segundo Sequeira (1994) a sobrevivência de *R. solanacearum* é uma questão fundamental não

apenas para o conhecimento da biologia deste patógeno, mas para a implementação de estratégias racionais de controle.

Ralstonia solanacearum, raça 1 biovars 1 e 3, tem grande círculo de hospedeiros no Nordeste e em Pernambuco infectando pimentão, tomate, berinjela e batata, dentre outras espécies. Entre os hospedeiros alternativos desta raça estão jiló (*Solanum gilo* L.), jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), maria-pretinha (*Solanum americanum* Mill.), quiabo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench), picão-preto (*Bidens pilosa* L.), erva-palha (*Blainvillea rhomboidea* Cass.) (MALAVOLTA et al., 2008), encontrados no Agreste Central de Pernambuco. Sabe-se que a bactéria não sobrevive em sementes com exceção do amendoim. Não existem estudos de sobrevivência deste patógeno em solos ou restos de cultura na área, dificultando a implantação de estratégias adequadas de controle. O objetivo deste trabalho foi estudar a sobrevivência de *R. solanacearum* raça 1, biovar 3, em tecidos infectados no solo e em diferentes tipos de solo de Pernambuco, visando subsidiar um programa de manejo integrado da doença neste Estado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **O lugar especial da produção de hortaliças no agronegócio.** São Paulo: FNP – negócios e consultoria, 2004. 496p.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira.** São Paulo: FNP – negócios e consultoria, 2008. 502 p.

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).

BUDDENHAGEN, I. W.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, 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**, Palo Alto, v. 2, p. 203-230, 1964.

COMPEAU, G.; AL-ACHI, B. J.; PLATSOUKA, E. LEVY, S. B. Survival of rifampin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 10, p. 2432-2438, 1988.

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-microbe interactions**. Kluwer Academic Publishers: Netherlands, 1991. p. 103-108.

COUTINHO, T. A. Introduction and prospectus on the survival of *R. solanacearum*. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **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**. 2007. Disponível em: <<http://www.emater.df.gov.br/sites/200/229/00000776.pdf>>. Acesso em: 23 dez. 2007.

EUZÉBY, J. P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. France, 2009. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>>. Acesso em: 14 jan. 2009.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **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.

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.

GRAHAM, J.; JONES, D. A.; LLOYD, A. B. Survival of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in plant debris and in latently infected potato tubers. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n. 10, p. 1100-1103, 1979.

GRANADA, G. A.; SEQUEIRA, L. Survival of *Pseudomonas* in soil, rhizosphere, and plant roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Negev, v. 29, p. 433-440, 1983.

GREY, B. E.; STECK, T. R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 9, p. 3866-3872, 2001.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; PEREIRA, P. R. V. S.; MOURÃO JUNOR, M. **Aspectos agronômicos de híbridos de pimentão em cultivo protegido em Roraima.** Boa Vista: Embrapa, 2005. 15p. (Embrapa. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1).

HASHIMOTO, T.; WHANG, K. S.; NAGAOKA, K. A quantitative evaluation and phylogenetic characterization of oligotrophic denitrifying bacteria harbored in subsurface upland soil using improved culturability. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, n. 3 179–185, 2006.

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

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.

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.

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

HORNERO-MÉNDEZ, D.; GUEVARA, R. G. L.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening cultivar selection for breeding. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 9, p. 3857-3864, 2000.

JI, P.; ALLEN, C.; SANCHEZ-PEREZ, A.; YAO, J.; ELPHINSTONE, J. G.; JONES, J. B.; MOMOL, M. T. New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 2, p. 195-203, 2007.

KELMAN, A.; SIQUEIRA, L. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 55, n. 4, p. 304-309, 1965.

KONGKIATTIKAJORN, J.; TEPA, S. Effect of Temperature on the Inhibition of *Ralstonia* spp. on Maize Seedling. In: Symposium Annual Meeting of Society for Economic Botany: Folk Botanical Wisdom: Towards Global Markets, 47., 2006,

Chiang Mai. **Proceedings...** St. Louis: Society for Economic Botany, p. 60-60, resumo 38, 2006.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M.; MELO, P. E. Differential resistance of tomato cultigens to biovars I e III of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 11, p. 1091-1094, 1994.

LOPES, CA.; QUEZADO-SOARES, AM. **Doenças bacterianas das hortaliças -** diagnose e controle. Brasília: Embrapa – CNPH, 1997. 70p.

LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; BOITEUX, L. S. Search for resistance to bacterial wilt in a Brazilian *Capsicum* germplasm collection. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p. 247-251.

MACHMUD, M.; MIDDLETON, K. J. Transmission of *Pseudomonas solanacearum* through groundnut seeds. **Bacterial Wilt Newsletter**, Canberra, n. 7, p. 4-5, 1991.

MALAVOLTA Jr., V. A.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C. F. Bactérias fitopatogênicas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, Special Supplement, p. 1-88, 2008.

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, n. 2, 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, n. 2, p. 158, 1989.

MARIANO, R. L. R.; MACARTER, S. M. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato and weeds. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 86-91, 1991.

MARQUES, A. S. A.; ROBBS, C. F.; BOITEUX, L. S.; PARENTE, P. M. G. **Índice de** fitobacterioses assinaladas no Brasil. Brasília: Embrapa/Cenargem, 1994. 65 p.

MARTINS, O. L.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Virulência de biovars I e II de *Pseudomonas solanacearum* ao tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 249-252, 1988.

MARTINS, O. M. **Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. 2000.** 127f. Tese (Doctorate in Agriculture) – Faculty of Agricultural Sciences, Georg-August University, Gottingen, Germany, 2000.

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

MESSIHA, N. A. S. **Bacterial wilt of potato (*Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2: Disease management, pathogen survival and possible eradication**. 2006, 150f. Tese (Doutorado em Ecologia) Wageningen University, The Netherlands.

MESSIHA, N. A. S.; VAN DIEPENINGEN, A. D.; WENNEKER, M.; VAN BEUNIGEN, A. R.; JANSE, J. D.; COENEN, T. G. C.; TERMORSHUIZEN, A. J.; VAN BRUGGEN, A. H. C.; BLOK, W. J. Biological soil desinfestation (BSD), a new control method for potato brown rot, causes by *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, n. 4, p. 403-415, 2007.

MIRANDA, E. F. O.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. Colonização de raízes de plantas daninhas cultivadas *in vitro* e em vasos por *Ralstonia solanacearum*, biovares 1, 2 e 3. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 121-127, 2004.

MICHEL V. V.; MEW, T. W. Effect of a soil amendment on the survival of *Ralstonia solanacearum* in different soils. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 4, p. 300-305, 1998.

MONDAL, S. N.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Influence of soil matric potential on the debilitation of oospores of *Pythium aphanidermatum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 1319-1324, 1995.

NETTO, R. A.; PEREIRA, B. G.; HIROSHI, N.; BOHER, B. Caracterização de isolados em várzea e em terra firme, no Estado do Amazonas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 362-366, 2003.

OKAMURA, Y.; MURAKAMI, N.; YAGI, W. Method for controlling target microorganism. **United States Patent**, N. WO99/44422. 2002.

POSAS, M. B; TOYOTA, K.; ISLAM, T. M. D. Inhibition of Bacterial Wilt of Tomato Caused by *Ralstonia solanacearum* by Sugars and Amino Acids. **Microbes and Environment**, Tokyo, v. 22, n. 3, p. 290-296, 2007.

POUSSIER, S.; CHÉRON, J. J.; COUTEAU, A.; LUISETTI, J. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 51, n. 3, p. 349-359, 2002.

QUIMIO, A. J.; CHAN, H. H. Survival of *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith in the rhizosphere of some weeds and economic plant species. **Philippine Phytopathology**, Laguna, v. 15, p. 108-121, 1979.

ROMANTSCHUK, M. Attachment of plant pathogenic bacteria to surfaces plant. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 225-243, 1992.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2ª. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005, 417p.

ROSZAK, D. B.; COLWELL, R. R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, Baltimore, v. 51, n. 3, p. 365-379, 1987.

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.

SCHROTH, M. N. Risks of releasing wild-type and genetically engineered biocontrol organisms into the ecosystem. In: TJAMOS, E.S.; PAPAIVIZAS, G. C.; COOK, R. J. (Eds.). **Biological control of plant diseases**. New York: Plenum Press. 1992. p. 371-379.

SEQUEIRA, L. Bacterial wilt: past, present, and future. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.). **Bacterial wilt**. Taiwan: ACIAR Proceedings, 1993. p. 12-21.

SEQUEIRA, L. Epilogue: life with a “mutable and treacherous tribe”. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International. 1994. p. 235-248.

SHAMSUDDIN, N.; LLOYD, A. B.; GRAHAM, J. Survival of the potato strain of *Pseudomonas solanacearum* in soil. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, Sidney, n. 44, p. 294-304, 1979.

STAMFORD, N. P.; RODRIGUES, J. J. V.; HECK, R. J.; ANDRADE, D. E. G. T. Propriedades físicas e químicas dos solos. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G.

T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, 2005. p. 41-60.

TOUSSAINT, V.; MORRIS, C. E.; CARISSE, O. A new semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 131-136, 2001.

VAN ELSAS, J. D.; KASTELEIN, P.; VAN BEKKUM, P.; VAN DER WOLF, J. M.; DE VRIES, P. M.; VAN OVERBEEK, L. S. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 12, p. 1338-1366, 2000.

VAN OVERBEEK, L. S.; BERGEVOET, J. H. W.; JACOBS, F. H. H.; VAN ELSAS, J. D. The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 5, p. 463-469, 2004.

VAN VEEN, J. A.; Van OVERBEEK, L. S.; Van ELSAS, J. D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Wageningen, v. 61, n. 2, p. 121-135, 1997.

WANG, Z. K.; COMSTOCK, J. C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N. W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 245-252, 1999.

WENNEKER, M.; VERDEL, M. S. W.; GROENEVELD, R. M. W.; KEMPENAAR, C.; VAN BEUNINGEN, A. R.; JANSE, J. D. *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: First report on stinging nettle (*Urtica dioica*). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 3, p. 307-315, 1999.

YABUUCHI, E.; KOSARO, Y.; OYIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.

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

CAPÍTULO II

**SOBREVIVÊNCIA DE *Ralstonia solanacearum* EM TECIDOS
INFECTADOS DE PIMENTÃO E DIFERENTES TIPOS DE SOLO DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

1 SOBREVIVÊNCIA DE *Ralstonia solanacearum* EM TECIDOS INFECTADOS DE
2 PIMENTÃO E DIFERENTES TIPOS DE SOLO DE PERNAMBUCO, BRASIL¹

3

4 Survival of *Ralstonia solanacearum* in sweet pepper infected tissues and different
5 soil types of Pernambuco, Brazil

6

7 Kátia Cilene da Silva Felix^{1,2}, Rosa de Lima Ramos Mariano^{2*}, Elineide Barbosa da
8 Silveira³ e Sami Jorge Michereff²

9

10 ² Fitossanidade, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de
11 Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52071-900, Recife-PE, Brasil

12 ³ Microbiologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de
13 Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52071-900, Recife-PE, Brasil

14

15 **Resumo**

16

17 A murcha-bacteriana do pimentão é causada por *Ralstonia solanacearum*, raça 1,
18 biovars 1 e 3 e causa grandes prejuízos à cultura desta solanácea. Este trabalho teve
19 por objetivo estudar a sobrevivência do patógeno em tecidos infectados de caule e
20 raiz incorporados ao solo às profundidades de 0, 5 e 15 cm; e em 10 diferentes tipos
21 de solo na ausência da planta hospedeira. Para os estudos foi utilizado um mutante
22 resistente a 100 mg l⁻¹ de rifampicina (*R. solanacearum* A1-9^{Rif}). A sobrevivência do
23 patógeno diferiu significativamente (P≤0,05) apenas em relação aos tecidos vegetais
24 analisados isoladamente. Desta forma, tecidos de raiz de pimentão apresentaram
25 maior duração da sobrevivência (17,1 d), área abaixo da curva da população
26 (AACPOP) (430x10⁴) e população aos 7 (POP7) (5,0 x 10⁴ UFC g⁻¹ tecido) e 21 dias
27 (POP21) (3,1 x 10⁴ UFC g⁻¹ tecido) que os de caule, que foram respectivamente, 7,0

¹ Parte da Dissertação de Mestrado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal Rural de Pernambuco (2009).

* Autor para correspondência; e-mail: rmariano@truenet.com.br

28 d; $3,8 \times 10^4$; 0,35 e $0,48 \times 10^4$ UFC g^{-1} tecido. Por outro lado, os tecidos do caule
29 apresentaram maior índice de decomposição (81,3%) e pH (7,7) do que os de raízes,
30 respectivamente 68,9% e 6,8. A análise microbiológica prévia deste solo não
31 evidenciou diferenças significativas entre as populações de actinomicetos, bactérias
32 copiotróficas, bactérias totais e fungos totais, que foram de 5,02; 3,63; 5,23 e 4,19
33 log UFC g^{-1} solo seco, respectivamente. Não foram encontradas populações de
34 bactérias oligotróficas, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. fluorescentes, e
35 *Trichoderma* spp. Entre os 10 tipos de solos estudados, sete foram classificados
36 como supressivos por apresentarem baixas duração da sobrevivência (42 a 49 dias),
37 AACPOP (0,77 a 4,05), POP14 (5,59 a 6,18 log UFC g^{-1} solo) e POP42 (5,44 a 6,31
38 log UFC g^{-1} solo) sendo os outros três (S3, S4 e S6) avaliados como condutivos.
39 Neste estudo, apenas algumas características físicas e químicas apresentaram
40 correlação significativa com duração da sobrevivência, AACPOP e POP42,
41 considerando todos os solos em conjunto ou apenas os supressivos, destacando-se
42 argila, umidade residual e água disponível que apresentaram correlação positiva e o
43 pH com correlação negativa.

44

45 **Palavras-chaves:** *Capsicum annuum*, murcha-bacteriana, solanáceas, restos de
46 cultura, persistência e ecologia.

47

48 **Abstract**

49

50 Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*, race 1, biovars 1 and 3 causes severe
51 damage to pepper growth in Agreste region of state of Pernambuco in Brazil. The

52 pathogen survival in infected tissues of stem and roots incorporated to the soil at 0, 5
53 and 15 cm; and at 10 different soil types of Pernambuco without host plant was
54 studied by using a spontaneous mutant resistant to 100 mg l⁻¹ of rifampicin (*R.*
55 *solanacearum* A1-9^{Rif}). Pathogen survival only showed difference ($P \leq 0.05$) in
56 relation to vegetal tissue. Pepper root tissues showed higher survival duration (DUR)
57 (17.1 d), area under population curve (AACPOP) (430×10^4) and population at 7
58 (POP7) (5.0×10^4 UFC g⁻¹ tissue) and 21 days (POP21) (3.1×10^4 UFC g⁻¹ tissue) than
59 stem tissues, which were respectively, 7.0 d; 3.8×10^4 ; 0.35 and 3.1×10^4 UFC g⁻¹
60 tissue. On the other hand stem tissues presented higher decomposition index (81.3%)
61 and pH (7.7) than root tissues, respectively 68.9% and 6.8. The previous soil
62 microbiological analysis did not find differences among populations of
63 actinomycetes, copiotrophic, bacteria, total bacteria and total fungi respectively 5.02;
64 3.63; 5.23 and 4.19 log UFC g⁻¹ dry soil. Populations of oligotrophic bacteria,
65 *Bacillus* spp., fluorescent *Pseudomonas* spp. and *Trichoderma* spp. were not
66 detected. The pathogen was isolated from the soil adjacent to infected tissues of stem
67 and roots at the three depths six weeks after experiment establishment. The analysis
68 of AACPOP in relation to locals (counties) of soil sampling, type of soil coverage at
69 the sampling time and soil texture was not significant by Kruskal-Wallis test
70 ($P \leq 0.05$). Among the 10 studied soils, seven were classified as suppressive showing
71 low intervals of DUR (42 to 49 days), AACPOP (0.77 to 4.05), POP14 (5.59 to 6.18
72 log UFC g⁻¹ soil) and POP42 (5.44 to 6.31 log UFC g⁻¹ soil). The soils S3, S4 and S6
73 were evaluated as conducive. Considering all soils together or only the suppressive,
74 DUR, AACPOP and POP42 only showed significant correlation with soil physical
75 and chemical characteristics, positive for clay, residual humidity and useful water

76 and negative for pH. The population of copiotrophic bacteria, actinomycetes, total
77 bacteria, total fungi (*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Rhizopus*
78 spp. were identified) and *Bacillus* spp. did not differ among the 10 soil types.

79

80 **Key words:** *Capsicum annuum*, bacterial wilt, solanaceous, crop residue, ecology,
81 persistence.

82

83 **1. Introdução**

84

85 O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma das hortaliças mais apreciadas,
86 consumidas e produzidas no Brasil e está entre as cinco com maior área cultivada no
87 mundo (Halfeld-Vieira et al., 2005). A produção de pimentão pode ser limitada pela
88 ocorrência de várias doenças dentre as quais se destaca a murcha-bacteriana. Embora
89 não seja tão importante como é para batata e tomate, esta doença pode causar grandes
90 prejuízos em pimentão nos cultivos em períodos quentes e úmidos ou em plasticultura
91 (Lopes e Quezado-Soares, 1997).

92 A murcha-bacteriana é causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi
93 et al., raça 1, biovars 1 e 3. No Brasil, a raça 1 de *R. solanacearum* está amplamente
94 disseminada pelas principais áreas de produção de pimentão (Marques et al., 1994),
95 mais especificamente nos Estados de Amazonas, Bahia, Espírito Santo, Maranhão,
96 Paraíba, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima e São Paulo
97 (Malavolta et al., 2008). Em Pernambuco, existem relatos da doença desde 1987
98 (Mariano et al., 1988; 1989), mas ultimamente, com o cultivo de novos híbridos, a

99 doença tem aumentado de importância, principalmente nos municípios produtores de
100 Camocim de São Félix, São Joaquim do Monte, Sairé e Bonito.

101 A epidemiologia da murcha-bacteriana é considerada complexa, por envolver
102 a interação de vários fatores (Buddenhagen e Kelman, 1964). Estudos
103 epidemiológicos e ecológicos com *R. solanacearum*, ainda são pouco realizados
104 devido à falta de métodos de detecção eficientes, especialmente quando a densidade
105 populacional do patógeno é baixa ou em condições de infecção latente, estado de
106 dormência ou estado de célula viável, mas não cultivável (VMNC) (Janse et al.,
107 1998). Em pimentão, são escassos os trabalhos enfocando a ecologia e epidemiologia
108 da murcha-bacteriana.

109 *Ralstonia solanacearum* tem capacidade saprofítica, apresentando
110 persistência notável em vários habitats sob circunstâncias específicas (Van Overbeek
111 et al., 2004). Em ambientes oligotróficos como o solo, a capacidade de sobrevivência
112 dos microrganismos depende da sua habilidade em resistir à falta de nutrientes e
113 água, e a exposição a metais pesados (Grey e Steck, 2001; Hashimoto et al., 2006).
114 No entanto, *R. solanacearum* pode persistir por longo tempo no solo (Graham et al.,
115 1979; Granada e Sequeira, 1983), principalmente na rizosfera, ambiente rico em
116 nutrientes comparado ao solo (Coutinho, 2005). Além da rizosfera, esse patógeno
117 coloniza e sobrevive em raízes de plantas hospedeiras, plantas não hospedeiras de
118 importância econômica e plantas invasoras (Quimio e Chan, 1979; Granada e
119 Sequeira, 1983; Sequeira, 1993; Wenneker et al., 1999; Miranda et al., 2004;
120 Coutinho, 2005).

121 A sobrevivência de *R. solanacearum* difere com relação a raça e a região
122 onde se encontra (Granada e Siqueira, 1983; Kelman, 1953). Segundo Graham et al.

123 (1979) os restos de cultura se decompõem gradualmente, principalmente em
124 condições de solo úmido e quente, o que favorece a sobrevivência de *R.*
125 *solanacearum* raça 3 por longo período. No entanto, *R. solanacearum* raça 1 que
126 afeta entre outras espécies, o pimentão e plantas invasoras, encontra apenas locais de
127 sobrevivência temporários nos restos de cultura, que são rapidamente decompostos
128 pela microbiota dos solos úmidos e quentes.

129 Fatores abióticos a exemplo de temperatura, pH, umidade e tipo de solo, além
130 de bióticos tais como, presença e atividade de organismos predadores, antagonistas
131 e/ou competidores, podem influenciar a sobrevivência da bactéria no solo (Van Veen
132 et al., 1997). Segundo van Elsas et al. (2000) a presença de tubérculos de batata,
133 plantas daninhas e restos de cultura em campo podem contribuir potencialmente para
134 a sobrevivência de *R. solanacearum*, já que a mesma consegue sobreviver cerca de
135 90 dias a 12°C ou 15°C e 120 dias a 20°C, constituindo fonte primária de inóculo.

136 O entendimento da ecologia e dos fatores que afetam a sobrevivência de *R.*
137 *solanacearum* em diferentes tipos de solo é prioritário. Segundo Sequeira (1994), a
138 sobrevivência de *R. solanacearum* é uma questão fundamental não apenas para o
139 conhecimento da biologia deste patógeno, mas para a implementação de estratégias
140 racionais de controle.

141 Tendo em vista o pequeno número de trabalhos sobre a ecologia e
142 epidemiologia de *R. solanacearum* em pimentão, o objetivo desta pesquisa foi
143 estudar a sobrevivência do patógeno em tecidos infectados de caule e raiz e em
144 diferentes tipos de solo, visando obter subsídios para aplicação de novas estratégias
145 de controle em um programa de manejo integrado da doença.

146

147 **2. Material e Métodos**

148

149 *2.1. Obtenção de mutante de Ralstonia solanacearum resistente ao antibiótico* 150 *rifampicina e teste de viabilidade em solos*

151 O mutante de *R. solanacearum* com resistência espontânea estável ao
152 antibiótico rifampicina *R. solanacearum* A1-9^{Rif} foi obtido a partir de um isolado
153 proveniente de pimentão, pertencente a Coleção de Culturas do Laboratório de
154 Fitobacteriologia da UFRPE, de acordo com a metodologia descrita por Assis et al.
155 (1996). A estabilidade do mutante quanto a patogenicidade a plantas de pimentão foi
156 testada em condições de casa de vegetação utilizando-se o método de ferimentos em
157 raízes (Menezes e Assis, 2004). A comparação do crescimento entre o mutante *R.*
158 *solanacearum* A1-9^{Rif} e o isolado selvagem *R. solanacearum* A1-9 foi realizada em
159 meio líquido NYD (caldo nutritivo-extrato de levedura-dextrose) e avaliada pela
160 variação na densidade ótica da cultura neste meio, monitorada em fotocolorímetro
161 (Mectronic M3) a 560 nm às 24, 48, 96 e 144 horas após o semeio (Silva et al.,
162 2006).

163 A partir da obtenção e testes de estabilidade, patogenicidade e crescimento do
164 mutante, em todos os experimentos, *R. solanacearum* A1-9^{Rif} foi cultivado em meio
165 de cultura NYDA+RIF durante 48-72 horas, sendo a suspensão preparada em água
166 destilada (AD) e ajustada em fotocolorímetro para $A_{560} = 0,54$ que corresponde a
167 concentração de 5×10^8 UFC mL⁻¹ de acordo com equação previamente estabelecida (y
168 $= 0,24 + 0,06x$; $R^2 = 0,94$).

169 Para o teste de viabilidade do mutante em solo, foram utilizados os tipos de
170 solo A e B, coletados respectivamente em campos comerciais dos municípios de

171 Sairé e Pombos, região agreste do Estado de Pernambuco. Os solos A e B foram
172 utilizados na forma natural ou esterilizados. De cada uma das quatro combinações,
173 200 g foram colocados em caixas tipo Gerbox, adicionando-se 50 ml de suspensão de
174 *R. solanacearum* A1-9^{Rif} nas concentrações 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^3 , 5×10^1 UFC
175 ml^{-1} e homogeneizando-se com auxílio de bastão de vidro. As caixas foram
176 incubadas em B.O.D. a temperatura constante de 25°C. Após 7 dias, amostras de solo
177 com 0,5 g foram adicionadas a 4,5 ml de água destilada esterilizada (ADE) em tubos.
178 Em condições assépticas, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-3} , plaqueando-se
179 0,1 ml das diluições em meio NYDA+RIF, com três repetições. As placas foram
180 incubadas por 48-72 h a 30°C, em B.O.D. e a avaliação foi realizada pela contagem
181 do número de colônias, determinando-se a população bacteriana em UFC g^{-1} de solo.

182

183 2.2. *Sobrevivência de Ralstonia solanacearum em tecidos infectados de pimentão no* 184 *solo*

185 A sobrevivência de *R. solanacearum* foi estudada utilizando-se o mutante
186 espontâneo *R. solanacearum* A1-9^{Rif} resistente a 100 mg l^{-1} de rifampicina, estável,
187 com crescimento e patogenicidade similares ao isolado selvagem *R. solanacearum*
188 A1-9. Para a produção de material vegetal com sintomas, plantas de pimentão
189 híbrido cv. Atlantis (Agristar) com 30 dias de idade foram inoculadas com o mutante
190 *R. solanacearum* A1-9^{Rif} conforme já descrito.

191 Quinze dias após a inoculação, caule e raízes de plantas com sintomas de
192 murcha-bacteriana foram coletados separadamente e fragmentados em pedaços de
193 aproximadamente 1 cm. De cada material, 3 g foram colocadas em sacos de malha
194 plástica com abertura 2 x 2 mm e dimensões 8 x 5 cm. Dois sacos, um com

195 fragmentos de caule e outro com fragmentos de raízes foram incorporados lado a
196 lado, em cada uma das profundidades 0, 5 e 15 cm, em colunas plásticas de 20 cm
197 contendo 2 kg de solo de área de plantio comercial de pimentão, sem histórico de
198 ocorrência da murcha-bacteriana, com as seguintes características: pH 5,5; P = 31 mg
199 dm^{-3} ; Na = 1,65 mg dm^{-3} ; K = 1,79 mg dm^{-3} ; Ca + Mg = 4,75 mg dm^{-3} ; Ca = 2,85 mg
200 dm^{-3} ; Al = 0,10 mg dm^{-3} ; H + Al = 4,19 mg dm^{-3} ; C.O. = 16,59 mg dm^{-3} e M.O. =
201 28,61 mg dm^{-3} . As colunas plásticas com solo e tecidos infectados de pimentão
202 foram irrigadas periodicamente visando manter a umidade próxima a capacidade de
203 pote.

204 Análises microbiológicas, para cada solo individualmente foram retiradas 10
205 sub-amostras de 10 g, formando uma única amostra, da qual foi retirado 0,5 g. Esta
206 alíquota foi adicionada a 4,5 ml de ADE e após homogeneização foram feitas
207 diluições seriadas até 10^{-3} , sendo 0,1 ml de cada diluição plaqueado em diferentes
208 meios de cultura com três repetições. Utilizou-se meio extrato de malte-ágar, EMA
209 (15 extrato de malte; 13 maltose; 1 peptona; 3 dextrose; 1 K_2HPO_4 ; 0,5 NH_4Cl ; 20
210 ágar g l^{-1}) com adição de 250 ppm de tetraciclina, para o isolamento de fungos totais;
211 ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura (NYDA) para o isolamento de bactérias
212 totais; meio B de King, KMB (20 peptona; 1,5 K_2HPO_4 ; 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 20 ágar g
213 l^{-1} e 10 glicerol ml l^{-1}) para o isolamento de *Pseudomonas* spp. fluorescentes; meio
214 de amido-caseína-ágar modificado ACAM (10 amido; 0,3 caseína; 2 KNO_3 ; 2
215 K_2HPO_4 ; 2 NaCl; 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 CaCO_3 ; 0,01 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 20 ágar; 2
216 propionato de sódio; 1 cicloheximida g l^{-1}) para isolamento seletivo de *Actinomicetos*
217 spp.; MBC (2,5 dextrose; 0,2 caseína; 0,5 KNO_3 ; 1,3 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 0,5

218 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,6 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 20 ágar g l^{-1} e 100 cicloheximida mg l^{-1}) e MBO
219 (MBC diluído 100 vezes) para isolamento de bactérias copiotróficas (bactérias que
220 crescem em ambientes ricos em carbono, fator importante para sua sobrevivência) e
221 oligotróficas (bactérias incapazes de crescer em ambientes ricos em carbono),
222 respectivamente; e meio de Martin (10 glicose; 5 peptona; 1 K_2HPO_4 ; 0,5
223 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 sulfato de estreptomicina; 0,033 rosa de Bengala; 20 ágar g^{-1})
224 para isolamento seletivo de *Trichoderma* spp. No isolamento de *Bacillus* spp. as
225 diluições foram submetidas a banho-maria de 80°C por 20 min, com posterior
226 distribuição em meio NYDA, sem adição de antibiótico. No isolamento de fungos, as
227 placas foram incubadas a 25±2°C, sob alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro),
228 em B.O.D. As placas dos isolamentos de bactérias foram incubadas em B.O.D. a
229 28±2°C. As avaliações foram realizadas após 48 h para bactérias e *Bacillus* enquanto
230 que os actinomicetos e fungos foram avaliados após cinco dias, e cada população
231 resultou do número médio de colônias em três placas, sendo expressas em UFC g^{-1} de
232 solo.

233 As avaliações foram realizadas semanalmente durante o período de seis
234 semanas. Em cada avaliação foram coletados 5 sacos de malha plástica de cada uma
235 das 3 profundidades para caule e raízes. Após homogeneização manual dos tecidos
236 infectados, 0,5 g de cada saco foram macerados em almofariz com pistilo,
237 adicionados a 4,5 ml de ADE em tubos, os quais foram submetidos a aparelho de
238 ultra-som por 5 minutos, na potência 10. Em condições assépticas, foram realizadas
239 diluições seriadas até 10^{-3} , plaqueando-se 0,1ml das diluições em meio NYDA +
240 RIF, com três repetições. As placas foram incubadas por 48-72 h a 30°C, em B.O.D.
241 A avaliação foi realizada pela contagem do número de colônias, determinando-se a

242 população bacteriana em UFC g⁻¹ de tecido infectado. As amostras foram coletadas e
243 processadas até que em duas amostragens consecutivas *R. solanacearum* não fosse
244 detectada.

245 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com arranjo
246 fatorial 2 x 3 representando dois tipos de tecido vegetal (caule e raízes) x três
247 profundidades (0, 5 e 15 cm de profundidade), com cinco repetições, para cada
248 amostragem, sendo cada repetição constituída por um saco de malha plástica
249 contendo tecido infectado. O experimento foi realizado duas vezes.

250 No primeiro experimento, 13 semanas após a incorporação dos tecidos
251 infectados de caule e raiz de pimentão, realizou-se o isolamento de *R. solanacearum*
252 A1-9^{Rif} a partir do solo adjacente aos sacos de malha plástica onde os tecidos se
253 encontravam às profundidades de 0, 5 e 15 cm, pelo método já detalhado
254 anteriormente. Em seguida, foi realizado bioensaio com plantas indicadoras de
255 tomate cv. Santa Clara de acordo com Tavares et al. (2000), utilizando-se 10 plantas
256 por profundidade. A observação dos sintomas foi realizada diariamente até o 20º dia
257 após o transplante. No segundo experimento, o mesmo procedimento de isolamento
258 do patógeno foi realizado 6 semanas após a incorporação dos tecidos infectados de
259 caule e raiz de pimentão, não sendo realizado o bioensaio com tomate.

260 O índice de decomposição dos tecidos infectados de pimentão, 42 dias após a
261 incorporação ao solo, foi determinado pela pesagem do material vegetal contido nos
262 sacos de malha plástica nas diferentes profundidades (0, 5 e 15 cm), sendo os
263 resultados posteriormente aplicados à fórmula $ID = (P_i - P_f) / P_i \times 100$, sendo P_i , peso
264 inicial dos tecidos infectados de pimentão e P_f , peso final aos 42 dias após a
265 instalação do experimento.

266 2.3. *Sobrevivência de Ralstonia solanacearum em diferentes tipos de solo*

267 Para avaliar a influência do tipo de solo na sobrevivência de *R. solanacearum*
268 A1-9^{Rif}, foram utilizados 10 tipos de solos representativos do Estado de Pernambuco
269 com base na classificação de Jacomine et al. (1972) (Tabela 1). Os solos foram
270 coletados durante o mês de julho de 2008. De cada área foram removidos,
271 aleatoriamente, cinco subamostras de 5 kg de solo a uma profundidade de 0-20 cm,
272 totalizando 25 kg de solo/área. Cada área foi geo-referenciada pelo Sistema de
273 Posicionamento Global (GPS 48 Personal Navigator, Garmin International, Olathe
274 KS, USA). As amostras de solos foram secas ao ar em ambiente coberto durante
275 quinze dias, seguindo-se o peneiramento para a retirada de resíduos e
276 armazenamento em sacos de nylon, em casa de vegetação, até o processamento.

277 As análises físicas e químicas dos solos foram realizadas no Instituto de
278 Agrônomo de Pernambuco (IPA), e no Laboratório de Fertilidade do Solo da
279 Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE respectivamente. Foram
280 determinados: granulometria; densidade aparente e real; umidade, pH em água; P
281 disponível (mg dm^{-3}); Na, K, Ca + Mg, Ca e Al trocáveis (cmolc dm^{-3}); acidez
282 potencial (H + Al); C orgânico; e matéria orgânica (g kg^{-1}).

283 As análises microbiológicas de cada solo foram realizadas conforme descrito
284 no item 2.2.

285 A sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} nos diferentes tipos de solo
286 natural foi analisada colocando-se 200 g de cada solo em caixas Gerbox,
287 adicionando-se 50 ml de suspensão de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} com concentração de
288 $5 \times 10^8 \text{ UFC ml}^{-1}$ e homogeneizando-se com auxílio de bastão de vidro. As caixas
289 foram incubadas em B.O.D. a temperatura constante de 25°C.

290 As avaliações foram realizadas semanalmente durante o período de 13
291 semanas. Em cada avaliação, 0,5 g de solo de cada uma das 4 caixas contendo o
292 mesmo tipo de solo foram adicionados a 4,5 ml de ADE em tubos. Em condições
293 assépticas, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-3} , plaqueando-se 0,1 ml das
294 diluições em meio NYDA + RIF, com três repetições. As placas foram incubadas por
295 48-72 h a 30°C, em B.O.D. Após a contagem do número de colônias, determinou-se
296 a população bacteriana em UFC g⁻¹ de solo.

297 As variáveis analisadas para a sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} nos
298 solos foram: duração da sobrevivência em dias (DUR), população aos 14 e 42 dias
299 (POP14 e POP42) e área abaixo da curva da população (AACPOP), calculada de
300 acordo com Shaner e Finney (1977).

301 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dez
302 tratamentos representados pelos 10 tipos de solo e quatro repetições, sendo cada
303 repetição constituída por uma caixa Gerbox.

304

305 2.4 Análises Estatísticas

306 Todos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes. As análises
307 estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SAEG – Sistema para análise
308 estatísticas e genéticas, Viçosa, UFV, versão 9.0, 2005, compreendendo análises de
309 variância, testes LSD, Duncan, T e não paramétrico de Kruskal-Wallis para
310 comparação de médias ($P \leq 0,05$) e análise de correlação de Pearson.

311

312

313

314 3. Resultados

315

316 Todos os resultados apresentados no presente trabalho referem-se à
317 sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif}, como células cultiváveis detectadas pelo
318 método de plaqueamento em meio de cultura NYDA+RIF.

319

320 *3.1. Obtenção de mutante de Ralstonia solanacearum resistente ao antibiótico*
321 *rifampicina e teste de viabilidade em solos*

322 O mutante espontâneo de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} resistente a 100 mg l⁻¹ de
323 rifampicina apresentou estabilidade para a resistência ao antibiótico, além de
324 crescimento em NYD (Figura 1) e patogenicidade em plantas de pimentão
325 semelhantes ao isolado selvagem *R. solanacearum* A1-9.

326 No teste de viabilidade, *R. solanacearum* A1-9^{Rif} demonstrou habilidade para
327 sobreviver, tanto em solo esterilizado como em solo natural (Figura 2). À medida que
328 a concentração da suspensão adicionada ao solo foi reduzida, diminuiu também a
329 população de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} recuperada, até que na concentração 10¹ UFC
330 ml⁻¹, apenas no solo A esterilizado (SAE), a população da bactéria foi ainda
331 detectada.

332

333 *3.2. Sobrevivência de Ralstonia solanacearum em tecidos infectados no solo*

334 Durante a análise da sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} em tecidos
335 infectados incorporados a diferentes profundidades, em colunas de solo mantidas
336 sobre bancadas em casa de vegetação, a temperaturas média do ar, do solo e umidade

337 relativa do ar foram de $31\pm 2^{\circ}\text{C}$; $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $42\pm 3\%$, respectivamente. Os resultados
338 dos dois experimentos foram analisados em conjunto.

339 Não houve diferença significativa ($P\leq 0,05$) para a sobrevivência de *R.*
340 *solanacearum* A1-9^{Rif} em relação à profundidade e interação profundidade x tecido
341 vegetal infectado. Entretanto houve diferença entre tecidos de caule e raízes de
342 pimentão, com relação às variáveis duração da sobrevivência, área abaixo da curva
343 da população, população aos 7 dias, população aos 21 dias e índice de decomposição
344 (Tabela 2). Para efeito de análise o valor 1 foi atribuído, quando não foram
345 detectadas colônias de *R. solanacearum*.

346 A duração da sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} em tecidos de caule
347 de pimentão infectado foi de 7,0 dias enquanto em raízes foi de 17,1 dias (Tabela 2).
348 A área abaixo da curva da população de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} em tecidos de
349 caule foi de $3,8 \times 10^4$ enquanto em raízes foi de 430×10^4 . Também as populações de
350 *R. solanacearum* A1-9^{Rif} aos 7 e 21 dias em tecidos de raiz foram maiores do que em
351 caule. Os tecidos do caule apresentaram maior índice de decomposição (81,3%) do
352 que os da raiz (68,9%).

353 Outros fatores que possivelmente contribuíram tanto para a redução da
354 duração da sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} quanto para o declínio da
355 população nos tecidos infectados de caule e raiz, foram o potencial hidrogeniônico
356 (pH) (Tabela 2) e a atividade de microrganismos antagonistas. Quarenta e dois dias
357 após o início do experimento, o pH do macerado de caule (7,7), foi
358 significativamente ($P<0,01$) maior que o pH do macerado de raiz (6,8).

359 A análise microbiológica do solo, antes da incorporação dos tecidos
360 infectados de caule e raiz de pimentão, não evidenciou diferenças significativas entre

361 as populações de actinomicetos, bactérias copiotróficas, bactérias totais e fungos
362 totais, que foram de 5,02; 3,63; 5,23 e 4,19 log UFC g⁻¹ solo seco, respectivamente.
363 Não foram encontradas populações de bactérias oligotróficas, *Bacillus* spp.,
364 *Pseudomonas* spp. fluorescentes, e *Trichoderma* spp.

365 Treze semanas após a instalação do primeiro experimento, o isolamento de *R.*
366 *solanacearum* A1-9^{Rif} a partir do solo adjacente aos sacos de nylon onde os tecidos
367 infectados de caules e raízes se encontravam, às profundidades de 0, 5 e 15 cm não
368 detectou colônias viáveis do patógeno. Também não foi positiva a patogenicidade em
369 plantas indicadoras de tomate plantadas a essas profundidades. No entanto, 6
370 semanas após o início do segundo experimento, *R. solanacearum* A1-9^{Rif} foi ainda
371 detectada no solo adjacente aos sacos de nylon, em populações de 3,09; 3,65 e 3,41
372 log UFC g⁻¹ solo, respectivamente a 0, 5 e 15 cm de profundidade. É importante
373 salientar que em ambos experimentos, *R. solanacearum* A1-9^{Rif} deixou de ser
374 detectada nos restos culturais antes das seis semanas.

375

376 3.3. Sobrevivência de *Ralstonia solanacearum* em diferentes tipos de solo

377 A análise da área abaixo da curva da população de *R. solanacearum* A1-9^{Rif}
378 em relação aos locais (municípios) de coleta das amostras de solos, tipo de cobertura
379 do solo na época da coleta e textura dos solos não foi significativa pelo teste de
380 Kruskal-Wallis (P≤0,05) (Tabela 1).

381 A duração da sobrevivência de *R. solanacearum* isolado A1-9^{Rif} nos
382 diferentes tipos de solos de Pernambuco variou de 42 a 77 dias (Tabela 3) sendo os
383 maiores valores obtidos nos solos S4 e S3, respectivamente 77 e 59,5 dias. A área
384 abaixo da curva da população de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} nos dez tipos de solos

385 variou de 0,77 a 5,82. Novamente o solo S4, seguido desta vez pelo solo S6, o qual
386 não diferiu do solo S3 ($LSD \leq 0,05$), apresentaram os maiores valores,
387 respectivamente, 5,82; 5,26 e 4,15. Os solos S4, S3 e S6 também propiciaram
388 maiores populações aos 14 (6,22; 6,44 e 6,38 log UFC g⁻¹) e aos 42 dias (6,46; 6,49 e
389 6,49 log UFC g⁻¹), respectivamente. Portanto, os solos S3, S4 e S6 foram
390 classificados como condutivos ao patógeno.

391 Outras características importantes observadas no solo S6 foram a argila
392 (50%), a umidade residual (2,25%), a água disponível (1,52 mm/cm), o baixo valor
393 de bases trocáveis (8,06) e o pH (5,2) (Tabela 4 e 5). Além do solo S6, os solos S3 e
394 S4 também apresentaram altos níveis de umidade residual (3,25 e 2,35), água
395 disponível (1,75 e 1,26) e quantidade de argila (40 e 34%).

396 Quando consideradas as propriedades físicas e químicas de todos os solos, a
397 duração da sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} apresentou correlações
398 positivas ($P \leq 0,05$) para umidade residual e água disponível (Tabela 6). A área abaixo
399 da curva da população se correlacionou positivamente com argila, água disponível
400 ($P \leq 0,05$) e argila natural ($P \leq 0,01$) e negativamente com areia grossa, floculação e pH
401 ($P \leq 0,05$). A população aos 42 dias, teve correlação positiva com argila natural, H+Al
402 ($P \leq 0,05$), argila, umidade residual e água disponível ($P \leq 0,01$) e negativa com areia
403 grossa, areia fina e pH ($P \leq 0,05$) (Tabela 6).

404 Na análise das propriedades físicas e químicas dos solos, como possíveis
405 indicadores da supressividade, ou seja, considerando os sete solos supressivos, a
406 duração da sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} apresentou correlação positiva
407 apenas com silte ($P \leq 0,05$) (Tabela 6). A área abaixo da curva da população se
408 correlacionou positivamente com argila natural ($P \leq 0,05$) e negativamente com areia

409 grossa, carbono orgânico, matéria orgânica, pH e fósforo ($P \leq 0,05$). A população aos
410 42 dias teve correlação positiva com argila, argila natural, umidade residual e água
411 disponível ($P \leq 0,05$) e negativa com pH ($P \leq 0,05$) (Tabela 6). Esse fatores causaram
412 um rápido declínio na duração da sobrevivência, assim como redução da área abaixo
413 da curva da população e da densidade populacional de *R. solanacearum* A1-9^{Rif}.

414 Quando considerados apenas os três solos condúctivos, não foram verificadas
415 correlações significativas entre a duração da sobrevivência, área abaixo da curva da
416 população e população aos 14 e 42 dias, com as características físicas e químicas dos
417 solos.

418 Os níveis populacionais de bactérias copiotróficas, fungos totais e *Bacillus*
419 spp. não diferiram nos 10 tipos de solos utilizados, ocorrendo o oposto com as
420 populações de actinomicetos e bactérias totais (Tabela 7). A análise microbiológica
421 detectou espécies do gênero *Trichoderma* em todos os solos (Tabela 7), no entanto
422 não foi possível quantificar as populações devido à presença de contaminações com
423 outros fungos, mesmo utilizando o meio de Martin. Entre os fungos totais detectados
424 foram identificados, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus*
425 spp. No isolamento de bactérias totais foram observadas elevadas populações, entre
426 as quais o gênero *Bacillus* e actinomicetos, porém não foram detectadas
427 *Pseudomonas* do grupo fluorescente, nem bactérias oligotróficas.

428 Não foi observada nenhuma correlação significativa entre duração da
429 sobrevivência, área abaixo da curva da população e população aos 14 e 42 dias com
430 as características microbiológicas de todos os solos, dos solos supressivos e dos
431 condúctivos.

432

433 **4. Discussão**

434

435 *4.1. Obtenção de mutante de Ralstonia solanacearum resistente ao antibiótico*
436 *rifampicina e teste de viabilidade em solos*

437 O mutante espontâneo de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} resistente a 100 mg l⁻¹ de
438 rifampicina apresentou estabilidade para a resistência ao antibiótico, além de
439 crescimento em meio de cultura e patogenicidade similares ao isolado selvagem,
440 características estas desejáveis para utilização desse isolado em estudos de ecologia e
441 epidemiologia de fitobacterioses selvagem (Mariano e McCarter, 1991). Da mesma
442 maneira, Toyota e Kimura (1996) também verificaram que o isolado de *R.*
443 *solanacearum*^{Rif} utilizado em estudo de sobrevivência em solo, apresentou
444 similaridade ao tipo selvagem quanto a morfologia, taxa de crescimento, produção de
445 bacitracina e patogenicidade. Raramente no meio ambiente existem bactérias que
446 apresentem resistência a rifampicina, o que recomenda a utilização de mutantes com
447 resistência a esse antibiótico como ferramenta para monitorar a dinâmica
448 populacional de bactérias fitopatogênicas em solo e em plantas (Cintas et al., 2006)
449 incluindo *R. solanacearum* (Grey e Steck, 2001).

450 Para ser utilizado nos estudos de sobrevivência em solo, *R. solanacearum*
451 A1-9^{Rif} deveria ter viabilidade neste habitat, o que foi comprovado tanto em solo
452 esterilizado quanto em solo natural. Nessas duas condições observou-se que a
453 concentração da suspensão adicionada ao solo correlacionou-se diretamente com a
454 população de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} recuperada do mesmo. A esterilização do
455 solo A fez com que a bactéria fosse ainda recuperada na concentração 10¹ UFC ml⁻¹,
456 o que pode ser explicado pela ausência da microflora natural deste solo autoclavado,

457 o que favoreceu o crescimento populacional de *R. solanacearum* A1-9^{Rif}. Este fato
458 concorda com os resultados encontrados por Cintas et al. (2006) para sobrevivência
459 de *P. syringae* pv. *alisalensis*^{Rif} em nabo. Não foram encontrados outros relatos
460 sobre viabilidade de bactérias resistentes a antibióticos para estudos de sobrevivência
461 em solo. Portanto, é possível a utilização do mutante *R. solanacearum* A1-9^{Rif} para
462 os estudos de sobrevivência desta bactéria nos solos de Pernambuco, recomendando-
463 se a aplicação em concentrações $\geq 1 \times 10^7$ UFC ml⁻¹.

464

465 4.2. *Sobrevivência de Ralstonia solanacearum em tecidos infectados no solo*

466 Os maiores valores de duração da sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif},
467 área abaixo da curva de população, população aos 7 e 21 dias em tecidos de raízes
468 comparados aos do caule, podem ter resultado de uma maior adaptação dos tecidos
469 das raízes ao solo, seu habitat original, bem como de diferenças estruturais morfo-
470 anatômicas e bioquímicas entre esses dois órgãos (Esau, 1976). Esta última
471 afirmação pode estar relacionada aos índices de decomposição encontrados nesses
472 dois tecidos vegetais, pois os tecidos do caule apresentaram maior índice de
473 decomposição do que os da raiz, provavelmente devido ao maior teor de água
474 encontrado no caule ou às suas estruturas morfo-anatômicas (Esau, 1976). A
475 decomposição dos tecidos além da composição da planta depende também da
476 proporção de diferentes grupos de organismos habitantes do solo (Moreira e
477 Siqueira, 2006).

478 As concentrações de actinomicetos, bactérias copiotróficas, bactérias totais e
479 fungos totais detectados foram consideradas normais e a ação antagônica desses
480 microrganismos pode ter influenciado tanto o nível populacional quanto a duração da

481 sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} nos tecidos infectados de caule e raiz. A
482 não detecção de populações de bactérias oligotróficas, *Bacillus* spp., *Pseudomonas*
483 spp. fluorescentes e *Trichoderma* spp. não significa que sejam inexistentes, mas que
484 estão em níveis não detectáveis pelos métodos empregados. Moreira e Siqueira
485 (2006) relataram que entre os microrganismos habitantes do solo com papel
486 fundamental na decomposição da matéria orgânica, os fungos são os mais eficientes,
487 pois degradam tanto lignina quanto celulose. Entre as bactérias, as mais eficientes
488 são *Bacillus* spp. e actinomicetos que degradam complexos ligno-celulolíticos.
489 Também a *R. solanacearum* produz enzimas celulolíticas (Zuleta et al., 2006).

490 A maior sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} nas raízes do que no caule
491 pode estar também relacionada às diferenças de pH que foram significativas aos 42
492 dias após instalação do experimento. O papel do pH na persistência de *R.*
493 *solanacearum* no hospedeiro foi citado por Elphinstone et al. (2006). No presente
494 trabalho foi confirmado que pHs dos tecidos vegetais mais altos reduzem a duração
495 da sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif}, a área abaixo da curva de população e
496 a população aos 7 e 21 dias. Michel e Mew (1997) observaram que “in vitro” houve
497 uma redução na população de *R. solanacearum* em pH 5 e 8, enquanto que o
498 crescimento populacional foi normal em pH 6. Sabe-se que este patógeno apresenta
499 os fenômenos de conversão fenotípica, mudando espontaneamente do estado
500 virulento para o avirulento e VMNC, conversão de células viáveis para células
501 viáveis, mas não cultiváveis. Estes dois tipos de conversão podem ser influenciados
502 por vários fatores, entre eles o estresse nutricional e o pH (van Elsas et al. 2000;
503 Grey e Steck, 2001; van Overbeek et al., 2004). Segundo Shekhawat et al. (1992) a

504 conversão do estado avirulento para o virulento pode ter papel importante na
505 sobrevivência de *R. solanacearum*.

506 De maneira geral, a temperatura pode ter influenciado a durabilidade da
507 sobrevivência e o comportamento das populações de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} em
508 tecidos infectados de caule e raiz. A temperatura do solo registrada durante o
509 experimento foi em média de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. McCarter et al. (1983) verificaram um rápido
510 declínio na duração da sobrevivência de *P. syringae* pv. *tomato* influenciado pela
511 temperatura; o patógeno sobreviveu em tecidos de tomateiro infectados durante 27
512 dias a 18 e 23°C , e apenas durante 7 dias a 28°C .

513 A não detecção de células de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} no solo adjacente aos
514 restos culturais, 13 semanas após sua incorporação, pelo isolamento em meio de
515 cultura não é indicativo da ausência do patógeno no solo, que pode sobreviver em
516 níveis não detectáveis por meios convencionais, porém em quantidades suficientes
517 para causar doença. Este foi o motivo da realização do bioensaio no qual a ausência
518 de sintomas nas plantas teste comprovou a ausência de células viáveis mais não
519 cultiváveis nesse solo. Por outro lado, o patógeno foi detectado no solo adjacente aos
520 restos culturais na 6^a semana após incorporação, não sendo necessário realizar o
521 bioensaio. É interessante o fato de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} ser encontrada na 6^a
522 semana em solo adjacente aos restos culturais nas três profundidades e não nos
523 próprios restos. Isto pode ter acontecido pelo escape de tecidos muito decompostos
524 através das malhas plásticas dos sacos para o solo próximo ou pela lixiviação destes
525 tecidos ou células bacterianas para o solo imediatamente abaixo da bolsa, já que as
526 colunas de solo foram irrigadas periodicamente para manutenção de umidade
527 próxima a capacidade de pote.

528 4.3. *Sobrevivência de Ralstonia solanacearum em diferentes tipos de solo*

529 A ausência de relação da área abaixo da curva da população com locais
530 (municípios), cobertura vegetal e textura dos solos coletados também foi relatada por
531 Alvarado et al. (2007) ao caracterizar 24 tipos de solo representativos do Estado de
532 Pernambuco quanto a supressividade a *Pectobacterium carotovorum* subsp.
533 *carotovorum* na ausência da planta hospedeira. Entre as coberturas vegetais
534 encontradas no presente trabalho estão o milho e a cana-de-açúcar, gramíneas
535 indicadas para rotação de cultura visando redução da população de *R. solanacearum*
536 no solo (Jabuonski e Hidalgo, 1987), o que não foi observado neste trabalho.

537 Algumas características físicas e químicas do solo, como teor de matéria
538 orgânica, pH, macro e micronutrientes, estrutura e textura, tipo e porcentagem de
539 argila, retenção de água, condutividade elétrica, nitrogênio, carbonato de cálcio
540 (CaCO_3), areia grossa, areia fina e silte, atuam na supressividade do patógeno
541 reduzindo a densidade de inóculo e suas atividades saprofíticas, ou da doença
542 restringindo a severidade da mesma, mesmo em alta densidade de inóculo e longa
543 sobrevivência do patógeno (Bashan et al., 1995; Bettiol e Ghini, 2005; Prado, 2005).

544 De modo geral, os solos S3, S4 e S6, caracterizados como condutivos ao
545 patógeno apresentaram altos níveis de argila, umidade residual e água disponível. A
546 argila tem uma grande capacidade de retenção de água, o que promove uma
547 expansão do solo. Essa característica atenua o efeito das chuvas irregulares e também
548 favorece a vida microbiana (Davet, 2004). Moffett et al. (1983) verificaram que a
549 duração da sobrevivência de *R. solanacearum* foi influenciada pela umidade e tipo de
550 solo. Em solo argiloso-arenoso, arenoso e argiloso a sobrevivência foi de 6, 52 e 86
551 semanas, respectivamente e o declínio da população foi diretamente proporcional a

552 evaporação da água, sendo maior no solo argilo-arenoso, seguido dos solos arenoso e
553 argiloso. Segundo Davet (2004), o baixo nível de água no solo compromete as
554 atividades metabólicas dos microrganismos, implicando no declínio da
555 sobrevivência, sendo as bactérias mais sensíveis que os fungos.

556 Ao contrário do observado no presente trabalho, Granada e Sequeira (1983)
557 constataram que em solo arenoso a 28°C, isolados de *R. solanacearum* raças 1, 2 e 3
558 foram detectados até 20, 16 e 8 semanas respectivamente. Já van Der Wolf et al.
559 (1998) observaram que em solo arenoso com temperatura de 4 e 20°C, a população
560 de *R. solanacearum* raça 3 declinou em 92 dias para níveis não detectáveis, enquanto
561 a 15°C ainda foi recuperada, evidenciando que a temperatura é um fator importante
562 na sobrevivência de *R. solanacearum* em solo arenoso e que o declínio mais rápido
563 da população a 20°C do que a 15°C foi possivelmente devido ao aumento da
564 atividade de antagonistas e predadores. Também Van Elsas et al. (2000)
565 comprovaram o efeito da temperatura x tipos de solos. A sobrevivência de *R.*
566 *solanacearum* raça 3 biovar 2 em microcosmos de um solo argiloso-arenoso e dois
567 argilosos-siltosos, submetidos a 12°C, 15°C ou 20°C foi gradualmente reduzida,
568 chegando em alguns casos ao limite de detecção em aproximadamente 90 a 210 dias.
569 O tipo de solo afetou a população a 20°C, com maior declínio em solo argiloso-
570 arenoso. Já a 4°C, nos três tipos de solos, a sobrevivência foi severamente afetada e o
571 patógeno não foi mais detectado de 14 a 28 dias após a incubação (van Elsas et al.,
572 2000). Também Prior et al. (1993) compararam um vertisolo e um oxisolo, relatando
573 que a supressividade do primeiro à murcha-bacteriana do tomateiro estava associada
574 ao tipo de argila encontrado nesses solos.

575 Quantidades de silte e areia podem influenciar a sobrevivência de
576 fitopatógenos no solo. Solos com maiores teores de silte apresentam mais
577 dificuldades de infiltração de água em profundidade (Prado, 2005) e,
578 conseqüentemente, aumentam a disponibilidade desta nas camadas superiores,
579 podendo favorecer a duração da sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif}, fato
580 observado dentro do conjunto dos solos supressivos, nos quais quanto maior o teor
581 de silte maior a duração da sobrevivência do patógeno. Solos com maior
582 porcentagem de areia são os que possuem maiores quantidades de matéria orgânica
583 (Davet, 2004), sendo os mais supressivos (Bettiol e Ghini, 2005).

584 No presente trabalho também foi observado, para os solos condutivos, que
585 maior sobrevivência de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} esteve correlacionada a valores de
586 pH entre 5,2 e 6,1, mas não houve correlação com a matéria orgânica dos solos. De
587 maneira geral, o pH é um fator abiótico que influencia todas as reações biológicas
588 que se processam no solo, incluindo a sobrevivência de microrganismos (Moreira e
589 Siqueira, 2006). A presença de H+Al (acidez potencial) no solo atua diretamente na
590 regulação do pH (Vieira et al., 1988) que promove o declínio ou aumento da
591 microbiota natural do solo (Davet 2004) favorecendo ou não a sobrevivência de
592 patógenos. Segundo Kelman (1953) *R. solanacearum* suporta ambientes com pH em
593 torno de 5,6 a 8,4. Ramesh e Bandyopadhyay (1993) confirmaram que solos com
594 baixo pH e baixo conteúdo de matéria orgânica suportam a multiplicação de *R.*
595 *solanacearum*.

596 A presença de fósforo no solo se correlacionou com supressividade, sendo os
597 solos que apresentaram maiores teores deste elemento os que suportaram menores
598 valores da área abaixo da curva da população. O fósforo é elemento importante para

599 todas as formas de vida por constituir as biomoléculas de ácidos nucleicos e ATP. A
600 detecção dos solubilizadores de fósforo *Aspergillus*, *Bacillus*, *Fusarium* e
601 *Penicillium* (Moreira e Siqueira, 2006) nos solos estudados pode indicar uma intensa
602 atividade antagônica desses microrganismos contra *R. solanacearum* A1-9^{Rif}.

603 Diferente do que ocorreu com os solos supressivos, não foi possível destacar
604 uma ou um conjunto de características responsável pela possível condutividade dos
605 solos estudados. Alvarado et al. (2007) também verificaram que não houve correlação
606 significativa entre a TERP (taxa de extinção relativa da população) e as
607 características físicas, químicas e microbiológicas dos solos condutivos estudados.

608 Os gêneros de fungos mais comumente encontrados no solo são *Fusarium*,
609 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Pythium*, *Verticillium* e *Mucor*
610 (Moreira e Siqueira, 2006), sendo os cinco primeiros detectados nesse trabalho. As
611 bactérias mais encontradas nos solos com capacidade antagonística a fitopatógenos
612 são *Pseudomonas*, *Bacillus* (Bettioli e Ghini, 2005) e actinomicetos, sendo os dois
613 últimos grupos também detectados nos solos estudados. Nesmith e Jenkins (1985)
614 observaram redução significativa na sobrevivência de *R. solanacearum*, que persistiu
615 por 12 semanas em solo autoclavado previamente infestado com *T. viride*, *F. roseum*,
616 *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., e duas espécies de *Streptomyces*, sugerindo que esses
617 microrganismos exerceram ação antagonista sobre o patógeno.

618 Todos os solos utilizados neste trabalho passaram por um processo de
619 secagem ao ar. Esse procedimento pode ter promovido severa dessecação, reduzindo
620 significativamente a população de alguns grupos de microrganismos, que não
621 puderam ser detectados. Segundo Davet (2004) a taxa de sobrevivência dos
622 microrganismos depende grandemente do seu estado fisiológico quando da

623 desidratação. A fração da população em crescimento exponencial é mais vulnerável à
624 dessecação do que a população em estágio de dormência ou estacionário. Esta pode
625 ser uma das causas para não detecção neste trabalho de certos microrganismos
626 desejáveis, como o grupo das *Pseudomonas* fluorescentes e bactérias oligotróficas.
627 Davet (2004) afirma ainda que a reidratação do solo favorece um rápido
628 estabelecimento da microbiota nativa do solo em poucos dias. Portanto, a adição de
629 50 ml da suspensão de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} em ADE ao solo, poderia explicar
630 um posterior aumento na população de *Trichoderma*, fungos totais, bactérias totais,
631 actinomicetos e *Bacillus*, com menor duração da sobrevivência e declínio da
632 população de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} nos solos considerados supressivos. O
633 isolamento desta microbiota em meios de cultura adequados poderia ter detectado
634 estas populações, mas não foi realizado.

635 Concluindo, *R. solanacearum* A1-9^{Rif} sobreviveu por curto período de tempo,
636 em tecidos infectados de caule e raiz de pimentão, persistindo mais em tecidos de
637 raiz (17,1 dias), considerados potencial fonte primária de inóculo. Também o solo
638 tem este papel já que a 25°C o patógeno sobreviveu na ausência do hospedeiro por 42
639 a 77 dias, dependendo do tipo de solo.

640

641 **5. Agradecimentos**

642

643 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
644 (CNPq), pela bolsa de estudos concedida.

645

646

647 **6. Referências**

648

649 Alvarado, ICM., Michereff, SJ., Mariano, RLR., Silva, AMF., Nascimento, CWA.,
650 2007. Caracterização de solos de Pernambuco quanto à supressividade a
651 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Fitopatologia Brasileira 32, 222-
652 228.

653

654 Assis, SMP., Mariano, RLR., Michereff, SJ., Coelho, RSB., 1996. Survival and
655 redistribution of *Bacillus* spp., potencial biocontrol agents of black rot, on kale
656 phylloplane. In: Wenhua, T., Cook, RJ., Rovira, A (Eds.), International Workshop on
657 Biological Control of Plant Disease. Advances in Biological Control of Plant Disease
658 1, 374-379.

659

660 Bashan, Y., Puente, ME., Rodriguez-Mendoza, MN., Toledo, G., Holguin, G.,
661 Ferrera-Cerrato, R., Pedrin, S., 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk
662 soil and rizosphere of 23 soil types. Applied and Environmental microbiology 61,
663 1938-1945.

664

665 Bettiol, W., Ghini, R., 2005. Solos supressivos. In: Michereff, SJ., Andrade, DEGT.,
666 Menezes, M (Eds.) Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais.
667 Imprensa Universitária UFRP, Recife, PE, pp. 125-152.

668

669 Buddenhagen, IW., Kelman, A., 1964. Biological and physiological aspects of
670 bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of
671 Phytopathology 2, 203-230.

672

673 Cintas, NA., Koike, ST., Bunch, RA., Bull, CT., 2006. Holdover inoculum of
674 *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* from broccoli raab causes disease in subsequent
675 plantings. Plant Disease 90, 1077-1084.

676

677 Coutinho, TA., 2005. Introduction and prospectus on the survival of *R.*
678 *solanacearum*. In: Allen, C., Prior, P., Hayward, AC (Eds.), Bacterial wilt disease
679 and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, St. Paul, MN, pp. 29-
680 38.

681

682 Davet, P., 2004. Microbial Ecology of the Soil and Plant Growth. Science Publishers,
683 Paris, 392 pp.

684

685 Elphinstone, JG., Parkinson, NM., Tomlinson, DL., Bew, J., Stanford, H., 2006.
686 Ecology and management of the *Ralstonia solanacearum* phylotype II, sequevar 1
687 strain, pandemic on potato. In: Saddler, G., Elphinstone, JG., Smith, J. (Eds.), The 4th
688 International Bacterial Wilt Symposium. British Society for Plant Pathology 4, 43.

689

690 Esau, K., 1976. Anatomia das Plantas com Sementes, Edgard Blücher, São Paulo,
691 293 pp.

692

- 693 Graham, J., Jones, DA., Lloyd, AB., 1979. Survival of *Pseudomonas solanacearum*
694 race 3 in plant debris and in latently infected potato tubers. *Phytopathology* 69, 1100-
695 1103.
- 696
- 697 Granada, GA., Sequeira, L., 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil,
698 rhizosphere, and plant roots. *Canadian Journal of Microbiology* 29, 433-440.
- 699
- 700 Grey, BE., Steck, TR., 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia*
701 *solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied*
702 *and Environmental Microbiology* 67, 3866-3872.
- 703
- 704 Halfeld-Vieira, BA., Nechet, KL., Pereira, PRVS., Mourão Jr., M., 2005. Aspectos
705 agronômicos de híbridos de pimentão em cultivo protegido em Roraima. Embrapa,
706 Boa Vista, 15 pp.
- 707
- 708 Hashimoto, T., Whang, KS., Nagaoka, K., 2006. A quantitative evaluation and
709 phylogenetic characterization of oligotrophic denitrifying bacteria harbored in
710 subsurface upland soil using improved culturability. *Biology and Fertility of Soils*
711 42, 179–185.
- 712
- 713 Jacomine, PKT., Cavalcanti, AC., Burgos, N., Pessoa, SCP., Silveira, CO., 1972.
714 Levantamento exploratório: reconhecimento de solos do Estado de Pernambuco.
715 Mousinho artefatos de papel limitada, Recife, 354 pp.
- 716

- 717 Jabuonski, RE., Hidalgo, OA., 1987. Doenças Bacterianas da Batata. In:
718 Reifschneider, FJB (Eds.). Produção de batata. Linha Gráfica, Brasília, DF, pp. 83-
719 87.
720
- 721 Janse, JD., Arulappan, FAX., Schans, J., Wenneker, M., Westerhuis, W., 1998.
722 Experiences with bacterial brown rot *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in The
723 Netherlands. In: Prior, CA., Elphinstone, JG. (Eds.), Bacterial wilt disease: molecular
724 and ecological aspects. Spring-Verlag, Berlin, GER, pp. 146-152.
725
- 726 Kelman, A., 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: A
727 literature review and bibliography. Agricultural Experiment Technical Bulletin,
728 North Carolina, 194 pp.
729
- 730 Lopes, CA., Quezado-Soares, AM., 1997. Doenças bacterianas das hortaliças -
731 diagnose e controle. Embrapa – CNPH, Brasília, 70 pp.
732
- 733 Malavolta Jr., VA., Beriam, LOS., Almeida, IMG., Rodrigues Neto, J., Robbs, CF.,
734 2008. Bacterias fitopatogênicas no Brasil: uma atualização. Summa
735 Phytopathologica 34, 1-88.
736
- 737 Mariano, RLR., Cabral, GB., Silva, MSSG., 1988. Levantamento das fitobacterioses
738 do Estado de Pernambuco em 1987. Fitopatologia Brasileira 13, 130.
739

- 740 Mariano, RLR., Melo, RAG., Holanda, VT., Cabral, GB., Silva, MSSG., 1989.
741 Levantamento das fitobacterioses do Estado de Pernambuco no biênio 1987-1988.
742 Fitopatologia Brasileira 14, 158.
743
- 744 Mariano, RLR., McCarter, SM., 1991. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae*
745 pv. *tomato* on tomato and weeds. Fitopatologia Brasileira 16, 86-91.
746
- 747 Marques, ASA., Robbs, CF., Boiteux, LS., Parente, PMG., 1994. Índice de
748 Fitobacterioses Assinaladas no Brasil. Embrapa/Cenargem, Brasília, 65 pp.
749
- 750 McCarter, SM., Jones, JB, Gitaitis, RD, Smitley, DR., 1983. Survival of
751 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue,
752 and epiphytic weed hosts in Georgia. Phytopathology 73, 1393-1398.
753
- 754 Menezes, M., Assis, SMP., 2004. Guia Prático para Fungos Fitopatogênicos.
755 Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife, 187 pp.
756
- 757 Miranda, EFO., Takatsu, A., Uesugi, C. H., 2004. Colonização de raízes de plantas
758 daninhas cultivadas *in vitro* e em vasos por *Ralstonia solanacearum*, biovars 1, 2 e
759 3. Fitopatologia Brasileira 29, 121-127.
760
- 761 Michel, W., Mew, TW., 1997. Effect of a soil amendment on the survival of
762 *Ralstonia solanacearum* in different soils. Phytopathology 88, 300-305.
763

764 Moffett, ML., Giles, JE., Wood, BA., 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum*
765 biovar 2 and 3 in soil: Effect of moisture and soil type. Soil Biology and
766 Biochemistry 15, 587-591.

767

768 Moreira, FMS., Siqueira, JO., 2006. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Editora
769 UFLA, Lavras, 729 pp.

770

771 Nesmith, WC., Jenkins, Jr., SF., 1985. Influence of antagonists and controlled matrix
772 potencial on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils.
773 Phytopathology 75, 1182-1187.

774

775 Prado, H., 2005. Ambientes de produção de cana-de-açúcar na região Centro-sul do
776 Brasil. Encarte do Informações Agrônomicas 110, 12-17.

777

778 Prior, P., Beramis, M., Clairon, M., Quiquampoix, H., Robert, M., Schmit, J., 1993.
779 Contribution to integrated control against bacterial wilt in different pedoclimatic
780 situations: Guadeloupe experience. In: Hayward, AC., Hartman, GL (Eds.), Bacterial
781 wilt. Aciar Proceedings, Canberra, ACT, pp. 294-304.

782

783 Quimio, AJ., Chan, HH., 1979. Survival of *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith
784 in the rhizosphere of some weeds and economic plant species. Philippine
785 Phytopathology 15, 108-121.

786

- 787 Ramesh, CR., Bandyopadhyay, AK., 1993. Bacterial wilt potencial of soils of
788 Andaman and Nicobar Islands. In: Hayward, AC., Hartman, GL (Eds.), Bacterial
789 wilt. Aciar Proceedings, Canberra, ACT, pp. 355-361.
790
- 791 Shaner, G., Finney, RE., 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression
792 of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* 15, 1051-1056.
793
- 794 Shekhawat, GS., Gadewar, AV., Chakrabarti, SK., 1992. Spontaneous phenotypic
795 reversion from afluidal to fluidal state in strains of *Pseudomonas solanacearum*.
796 Bacterial Wilt Newsletter 8, 5-6.
797
- 798 Sequeira, L., 1993. Bacterial wilt: past, present, and future. In: Hayward, AC.,
799 Hartman, GL (Eds.), Bacterial wilt. Aciar Proceedings, Canberra, ACT, pp. 12-21.
800
- 801 Sequeira, L., 1994. Epilogue: life with a “mutable and treacherous tribe”. In:
802 Hayward, AC., Hartman, GL (Eds.), Bacterial wilt: the disease and its causative
803 agent *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, GB, pp. 235-248.
804
- 805 Silva VAV., Silveira EB., Mariano RLR., 2006. Sobrevivência de *Acidovorax*
806 *avenae* subsp. *citrulli* em meloeiro. *Fitopatologia Brasileira* 3, 381-386.
807
- 808 Tavares, LA., Michereff, SJ., Souza, RM., Mariano, RLR., 2000. Análise de solo
809 para detecção de riscos de infecção de tomate por *Ralstonia solanacearum*. *Summa*
810 *Phytopathologica* 26, 311-316.

811 Toyota, K., Kimura, M., 1996. Growth of the bacterial wilt pathogen *Pseudomonas*
812 *solanacearum* introduced into soil colonized by individual soil bacteria. *Soil Biology*
813 *& Biochemistry* 28, 1489-1494.

814

815 van Der Wolf, JM., van Bekkum, PJ., van Elsas, JD., Nijhuis, EH., Vriend, SGC.,
816 Ruissen, MA., 1998. Immunofluorescence colony staining and selective enrichment
817 in liquid medium for studying the population dynamics of *Ralstonia solanacearum*
818 (race 3) in soil. *Bulletin OEPP/EPPO Boletín* 28, 71-79.

819

820 van Elsas, JD., Kastelein, P., van Bekkum, P., van Der Wolf, JM., Vries, PM., van
821 Overbeek, LS., 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative
822 agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates.
823 *Phytopathology* 90, 1358-1366.

824 van Overbeek, LS., Bergervoet, JHW., Jacobs, FHH., van Elsas, JD., 2004. The low-
825 temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia*
826 *solanacearum* biovar 2. *Phytopathology* 94, 463-469.

827

828 van Veen, JA., van Overbeek, LS., van Elsas, JD., 1997. Fate and activity of
829 microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*
830 61, 121-135.

831

832 Vieira, LS., Santos, PCT., Vieira, MN., 1988. Solos propriedades, classificação e
833 manejo. MEC/ABEAS, Brasília, 154 pp.

834

835 Wenneker, M., Verdel, MSW., Groeneveld, RMW., Kempenaar, C., van Beuningen,
836 AR., Janse, JD., 1999. *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in
837 surface water and natural weed hosts: First report on stinging nettle (*Urtica dioica*).
838 European Journal of Plant Pathology 105, 307-315.

839

840 Zuleta, MC., Liu, H., Schell, MA., Denny, TP., 2006. Identification of *Ralstonia*
841 *solanacearum* proteins secreted through alternative type II secretion systems.
842 Phytopathology 96, 131.

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860 **Tabela 1**

861 Identificação e localização dos diferentes solos coletados no Estado de Pernambuco

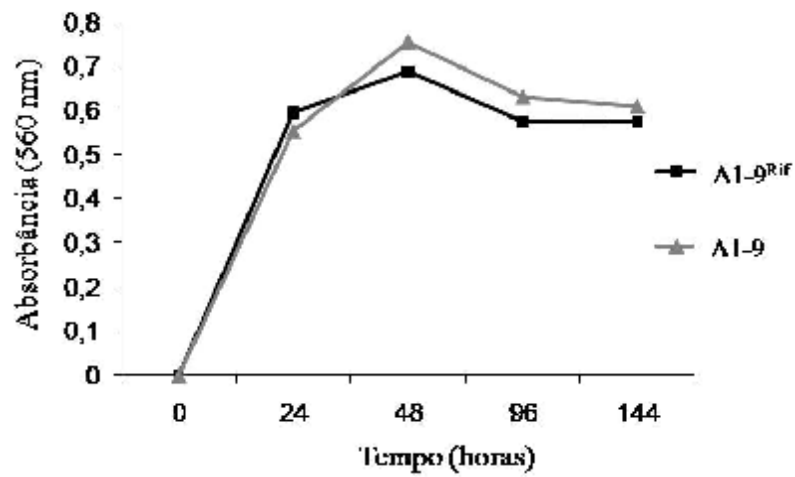
862 utilizados no estudo de sobrevivência de *Ralstonia solanacearum*

Código do solo	Local (Município)	Cobertura ¹	Classificação do tipo de solo ²	Textura	AACPOP ³
S1-AL	Abreu e Lima	Milho	Latosol amarelo	Franco argiloso arenoso	1,28 d
S2-CV	Trevo Carne de Vaca	Cana-de-açúcar	Podzólico vermelho e latosol vermelho amarelo distrófico	Franco arenoso	0,77 d
S3-GO	Goiana	Cana-de-açúcar	Solos gley indiscriminados e solos orgânicos distróficos e eutróficos	Franco argiloso	4,15 bc
S4-AN	Aliança	Cana-de-açúcar	Podzólico vermelho amarelo equivalente eutrófico e terra roxa eutrófica	Franco argiloso arenoso	5,82 a
S5-TB	Timbaúba	Cana-de-açúcar	Bruno não cálcico	Argiloso arenoso	3,59 c
S6-BZ	Bizarra	Milho	Terra roxa estruturada eutrófica	Argiloso	5,26 ab
S7-PB	Pombos	Milho	Solos litólicos eutróficos e Bruno não cálcico	Franco arenoso	4,05c
S8-BE	Bezerros	Milho/Feijão	Podzólico vermelho amarelo equivalente eutrófico e solos litólicos eutróficos	Franco arenoso	1,20 d
S9-CF	Camocim de São Félix	Milho/Feijão	Podzólico vermelho amarelo equivalente eutrófico; latosol vermelho amarelo distrófico e solos litólicos eutróficos	Franco arenoso	3,11 c
S10-CA	Cachoeirinha	Milho	Planosol solódico	Franco arenoso	3,71 c
CV(%)					30,27

863 ¹ Tipo de cobertura do solo na época da coleta.864 ² Classificação do tipo de solo baseado em Jacomine et al. (1972).865 ³ Área abaixo da curva populacional de *R. solanacearum* A1-9^{Rif}

866

867



868

869

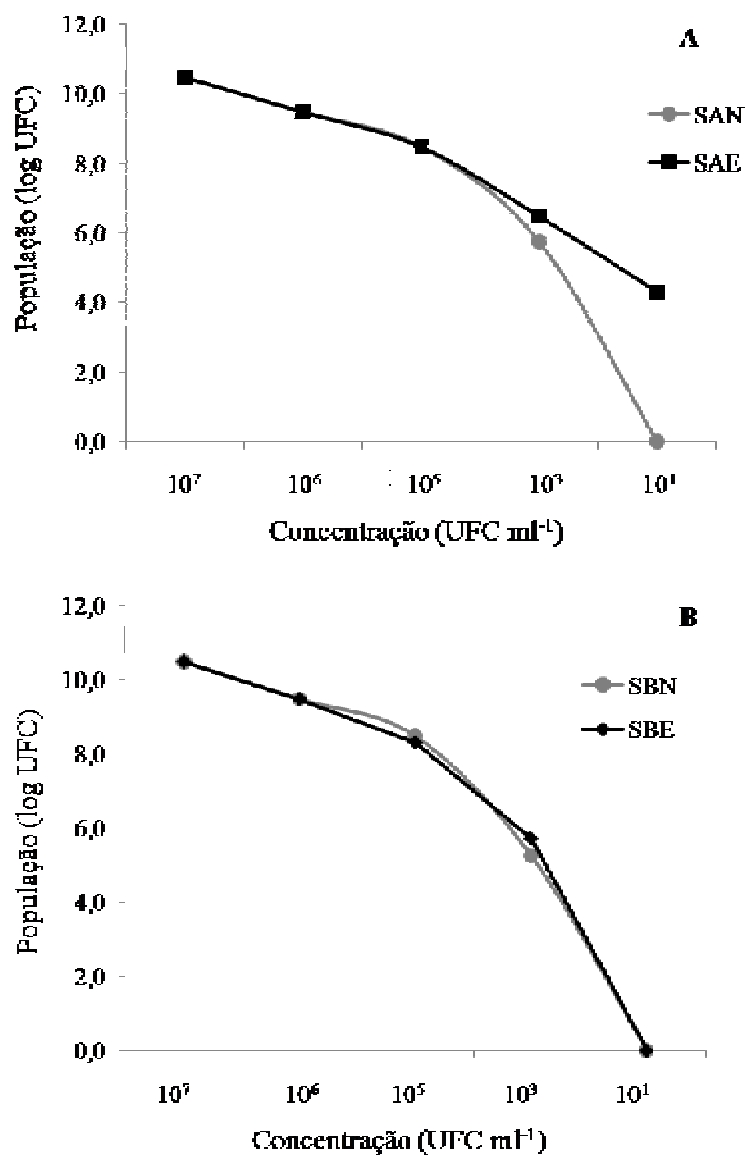
870

871

872

873

Figura 1. Comparação entre os isolados de *Ralstonia solanacearum* selvagem (A1-9) e mutante (A1-9^{Rif}) quanto ao crescimento em meio de cultura Caldo nutritivo-dextrose-extrato de levedura (NYD) incubados a 28°C.



874

875

876

877

878

879

880

Figura 2. População de *Ralstonia solanacearum* A1-9^{Rif} em solo A e B natural e esterilizado incubado a 25°C durante 7 dias. **A)** Solo A, SAN – solo A natural e SAE – solo A esterilizado; **B)** solo B, SBN – solo B natural e SBE – solo B esterilizado.

881 **Tabela 2**

882 Sobrevivência de *Ralstonia solanacearum* A1-9^{Rif} em tecido infectado de caule e raiz de
 883 pimentão híbrido cv. Atlantis, avaliada pela duração, área abaixo da curva populacional
 884 (AACPOP), níveis populacionais aos 7 (POP7) e 21 dias (POP21), índice de
 885 decomposição dos tecidos incorporados ao solo e potencial hidrogeniônico (pH) dos
 886 tecidos de caule e raiz

887

Tecido vegetal	Duração da sobrevivência (dias) ¹	AACPOP ¹ x10 ⁴	POP7 ^{1*} (UFC g ⁻¹ tecido x10 ⁴)	POP21 ^{1*} (UFC g ⁻¹ tecido x10 ⁴)	Índice de decomposição (%) ^{2**}	pH ^{2**}
Caule	7,0 b ³ ± 9,0	3,8 b	0,35 b ± 1,8	0,48 b ± 1,5	81,3 a ± 9,0	7,7 a ± 0,7
Raiz	17,1 a ± 9,0	430,0a	5,00 a ± 2,2	3,10 a ± 1,8	68,9 b ± 12,5	6,8 b ± 0,4

888 *Populações detectadas em meio NYDA+RIF (ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura + 100 mg l⁻¹ de
 889 rifampicina).

890 **Determinações realizadas 42 dias após a incorporação dos tecidos ao solo, a partir do macerado dos tecidos.

891 ¹Média de oito repetições.

892 ²Média de cinco repetições.

893 ³Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste T (P≤0,05).

894

895

896 **Tabela 3**

897 Sobrevivência de *Ralstonia solanacearum* A1-9^{Rif} em dez solos representativos
 898 do Estado de Pernambuco avaliada pela duração, área abaixo da curva
 899 populacional (AACPOP) e níveis populacionais aos 14 (POP14) e 42 dias
 900 (POP42) detectados em meio de cultura NYDA+RIF (ágar nutritivo-dextrose-
 901 extrato de levedura + 100 mg l⁻¹ de rifampicina)

Solos	Duração da sobrevivência (dias)	AACPOP ¹	POP14 (log UFC g ⁻¹ solo)	POP42 (log UFC g ⁻¹ solo)
S1	42 ² c	1,28 d	5,90 cd	5,83 cd
S2	42 c	0,77 d	5,59 e	5,60 cd
S3	59,5 b	4,15 bc	6,44 a	6,49 a
S4	77 a	5,82 a	6,22 ab	6,46 a
S5	42 c	3,59 c	6,17 b	6,31 ab
S6	42 c	5,26 ab	6,38 ab	6,49 a
S7	42 c	4,05 c	5,73 de	5,95 bc
S8	45,5 c	1,20 d	5,71 de	5,44 d
S9	49 c	3,11 c	6,14 bc	5,89 bc
S10	49 c	3,71 c	6,18 b	5,44 d
CV(%)	13,30	30,27	3,05	4,98

903 ¹AACPOP = Área abaixo da curva populacional calculada conforme Shaner e Finney (1977) utilizando
 904 os dados semanais da população de *R. solanacearum* A1-9^{Rif}. Dados transformados.

905 ²Média de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si
 906 pelo Teste LSD (P≤0,05).

907

908

909

910 **Tabela 4**

911 Características físicas de dez solos representativos do Estado de Pernambuco utilizados
 912 para estudo de sobrevivência de *Ralstonia solanacearum*A1-9^{Rif}

913

Solos	Composição Granulométrica (%)						Textura ¹	Umidade (%)			Água disponível	
	Areia		Silte	Argila		Floculação		Residual	0,33 atm	15 atm	(%)	(mm/cm)
	Grossa	Fina		Natural (%)	Grau (%)							
S1	59	12	8	21	6	71	FGA	1,65	23,04	12,63	10,41	1,27
S2	58	24	3	15	2	87	FA	1,70	16,04	8,79	7,25	0,96
S3	22	9	29	40	4	90	FG	3,25	32,51	17,93	14,58	1,94
S4	37	18	11	34	16	53	FGA	2,35	26,51	13,37	13,14	1,75
S5	31	28	1	40	6	85	GA	1,90	15,89	6,99	8,90	1,26
S6	28	13	9	50	20	60	G	2,25	26,27	14,38	11,89	1,52
S7	43	24	16	17	6	65	FA	1,45	12,12	5,72	6,40	0,92
S8	38	32	15	15	2	87	FA	1,35	8,6	4,52	4,08	0,60
S9	43	18	22	17	4	76	FA	1,55	15,17	7,09	8,08	1,10
S10	38	27	16	19	6	68	FA	1,50	13,80	6,33	7,47	1,03

914 ¹A= Argila, AF = Areia Franca, F = Franco, FA = F. arenoso, G = Argila, FGA = Franco Argiloso Arenoso, FG =
 915 Franco Argiloso, GA = Argiloso Arenoso.

916

917

918

919

920 **Tabela 5**

921 Características químicas de dez solos representativos do Estado de Pernambuco

922 utilizados para estudo de sobrevivência de *Ralstonia solanacearum*A1-9^{Rif}.

923

Solos	C.O. ¹	M.O.	pH	P	Ca ⁺²	Ca ⁺² +Mg ⁺²	K ⁺	Na ⁺	H+Al	Al ⁺³	SB	STB	STAl
	---(g kg ⁻¹)---		(água 1:2,5)	mg.dm ⁻³	------(cmol _c .dm ⁻³)-----								
1	18,12	31,24	6,5	189	6,65	10,00	0,43	0,57	3,73	0,25	17,65	0,83	0,0140
2	20,16	34,76	6,9	211	6,15	9,15	0,22	0,44	4,19	0,10	15,95	0,79	0,0062
3	37,20	64,13	6,0	62	7,40	13,75	0,72	0,66	5,50	0,50	22,53	0,80	0,0217
4	15,00	25,86	6,1	236	5,45	11,75	0,21	0,66	4,95	0,15	18,07	0,78	0,0082
5	9,90	17,07	5,4	39	4,20	9,75	0,30	0,48	6,41	0,30	14,73	0,70	0,0200
6	8,40	14,48	5,2	3	2,00	5,25	0,24	0,57	4,68	0,20	8,06	0,63	0,0242
7	10,20	17,58	5,9	6	2,90	6,15	0,22	0,57	3,51	0,15	9,84	0,74	0,0150
8	10,74	18,52	6,4	25	2,75	6,65	0,33	0,48	4,68	0,25	10,21	0,69	0,0239
9	16,20	27,93	6,0	44	7,00	7,80	0,66	0,57	3,51	0,10	16,03	0,82	0,0062
10	9,24	15,93	6,2	59	3,85	13,85	0,22	1,39	3,73	0,20	19,31	0,84	0,0103

924 ¹ C.O = Carbono orgânico, M.O = Matéria orgânica, SB = Somas das bases, STB = Saturação das bases, STAl = Saturação de

925 alumínio.

926

927

928

929 **Tabela 6**

930 Correlação entre as variáveis relacionadas à sobrevivência de *Ralstonia solanacearum*
 931 A1-9^{Rif} e características físicas e químicas dos solos representativos do Estado de
 932 Pernambuco, considerando todos os solos analisados (geral) e os classificados como
 933 supressivos

Características do solo	Coeficiente de correlação ¹					
	Duração da sobrevivência		AACPOP ²		POP42 ²	
	Geral	Supressivos	Geral	Supressivos	Geral	Supressivos
Areia grossa	-0,33	-0,36	-0,69*	-0,66*	-0,61*	-0,24
Areia fina	-0,28	0,11	-0,32	0,15	-0,62*	-0,23
Silte	0,35	0,75*	0,23	0,34	0,06	-0,34
Argila	0,24	-0,31	0,68*	0,38	0,88**	0,77*
Argila natural	0,33	-0,08	0,75**	0,70*	0,64*	0,53
Floculação	-0,34	-0,19	-0,64*	-0,57	-0,28	-0,03
Umidade residual	0,55*	-0,46	0,52	0,02	0,78**	0,68*
Água disponível	0,62*	-0,18	0,60*	0,27	0,86**	0,66
C.O. ³	0,35	-0,23	-0,09	-0,69*	0,28	-0,09
M.O.	0,35	-0,23	-0,09	-0,69*	0,28	-0,09
pH	0,04	-0,05	-0,72*	-0,82*	-0,68*	-0,75*
P	0,45	-0,38	-0,20	-0,72*	-0,02	-0,20
Ca ⁺²	0,34	0,05	-0,23	-0,36	0,09	0,14
Ca ⁺² + Mg ⁺²	0,54	0,32	0,14	0,14	0,06	-0,21
K ⁺	0,12	0,42	-0,09	0,05	0,19	0,21
Na ⁺	0,19	0,62	0,27	0,44	-0,28	-0,43
H+Al	0,23	-0,35	0,27	0,03	0,58*	0,48
Al ⁺³	0,13	-0,25	0,10	0,03	0,38	0,25
SB	0,52	0,33	0,01	-0,30	0,07	-0,11
STB	0,31	0,41	-0,20	-0,03	-0,30	-0,25
STAl	-0,25	-0,30	0,12	-0,01	0,31	0,14

934 ¹ Coeficientes de correlação de Pierson seguidos por * são significativos a P≤0,05 e por ** a P≤0,01.

935 ² AACPOP = Área abaixo da curva populacional de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} calculada conforme Shaner & Finney
 936 (1977) utilizando os dados semanais da população do patógeno; POP42 = população de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} aos
 937 42 dias.

938 ³ C.O.= Carbono orgânico, M.O. = Matéria orgânica, SB = Soma das bases, STB = Saturação de bases, STAl =
 939 Saturação do Alumínio.

940

941

942 **Tabela 7**
 943 Características microbiológicas de dez solos representativos do Estado de
 944 Pernambuco utilizados para estudo de sobrevivência de *Ralstonia*
 945 *solanacearum* A1-9^{Rif}

Solos	Actinomicetos (log UFC g ⁻¹)	Bactérias copiotróficas (log UFC g ⁻¹)	<i>Bacillus</i> spp. (log UFC g ⁻¹)	Bactérias totais (log UFC g ⁻¹)*	Fungos totais (log UFC g ⁻¹)
S1	3,86 ¹ ab	5,49 a	5,49 a	5,42 a	4,68 a
S2	4,38 a	6,24 a	5,49 a	5,43 a	3,43 a
S3	1,33 bc	6,48 a	5,49 a	5,42 a	3,74 a
S4	0,30 c	6,30 a	5,49 a	5,27 a	3,52 a
S5	1,41 bc	5,67 a	5,49 a	5,33 a	3,81 a
S6	0,30 c	8,36 a	4,00 a	3,06 ab	3,63 a
S7	1,76 bc	5,49 a	6,32 a	1,33 b	4,32 a
S8	5,12 a	6,34 a	5,49 a	5,34 a	4,63 a
S9	0,30 c	5,58 a	4,33 a	3,43 ab	4,64 a
S10	1,44 bc	6,08 a	5,49 a	5,48 a	4,07 a
CV(%)	68,57	---	---	36,26	---

946 ¹Média de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem
 947 significativamente entre si pelo Teste de Duncan (P_≤0,05).
 948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

1. *Ralstonia solanacearum* A1-9^{Rif} sobrevive por curto período de tempo em tecidos infectados de caule e raiz de pimentão incorporados ao solo, independente da profundidade. A sobrevivência é mais longa em tecidos de raízes do que em tecidos de caule;
2. *Ralstonia solanacearum* A1-9^{Rif} tem capacidade de migrar dos tecidos infectados para o solo adjacente e se manter viável, pelo menos até seis semanas;
3. Tecidos infectados de caule e raiz e solos aos quais estes tecidos foram incorporados são fonte primária de inóculo da murcha-bacteriana do pimentão, em plantios consecutivos;
4. Os solos S3, S4 e S6 são considerados condutivos ao patógeno por apresentarem maior área abaixo da curva da população, maiores populações aos 14 e 42 dias e maior duração da sobrevivência;
5. Entre as características físicas e químicas dos solos em geral ou supressivos, que apresentaram correlação positiva com a sobrevivência do patógeno, destacaram-se argila, umidade residual e água disponível, enquanto que correlação negativa foi encontrada para o pH;
6. As características físicas e químicas não se correlacionam com a sobrevivência do patógeno nos solos condutivos;
7. A microbiota natural dos solos utilizados não afetou a sobrevivência do patógeno;
8. *R. solanacearum* A1-9^{Rif} sobrevive por 6 a 11 semanas em solos de Pernambuco na ausência do hospedeiro, portanto o solo deve ser considerado como fonte de inóculo primário.