

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

VANESSA CASIRAGHI ZANON

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Ralstonia* sp.
DA CULTURA DO TOMATEIRO NO SUDOESTE DO PARANÁ

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2019

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

VANESSA CASIRAGHI ZANON

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Ralstonia* sp.
DA CULTURA DO TOMATEIRO NO SUDOESTE DO PARANÁ**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2019

VANESSA CASIRAGHI ZANON

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Ralstonia* sp.
DA CULTURA DO TOMATEIRO NO SUDOESTE DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Thiago de Oliveira Vargas

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rosangela Dallemole Giaretta;

Coorientador: Prof. Dr. Maurício Rossato

PATO BRANCO

2019

Z33i Zanon, Vanessa Casiraghi.
Identificação molecular de isolados de *Ralstonia* sp. da cultura do
tomateiro no sudoeste do Paraná / Vanessa Casiraghi Zanon. -- 2019.
47 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Thiago de Oliveira Vargas
Coorientadora: Profa. Dra. Rosangela Dallemole Giaretta
Coorientador: Prof. Dr. Maurício Rossato
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2019.
Bibliografia: f. 42 - 47.

1. Tomate - Melhoramento genético. 2. Reação em cadeia de
polimerase. 3. DNA. I. Vargas, Thiago de Oliveira, orient. II. Giaretta,
Rosangela Dallemole, coorient. III. Rossato, Maurício, coorient. IV.
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-
Graduação em Agronomia. V. Título.

CDD (22 ed.) 630

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 191

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Ralstonia* sp. DA CULTURA DO TOMATEIRO NO SUDOESTE DO PARANÁ

por

VANESSA CASIRAGHI ZANON

Dissertação apresentada às oito horas trinta minutos do dia vinte e nove de março de 2019, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRA EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistema de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo designados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Dr. Carlos Lopes
Embrapa Hortaliças/Brasília

Prof^a. Dr^a Taciane Finatto
UTFPR/Pato Branco

Prof. Dr. Thiago de Oliveira Vargas
UTFPR/Pato Branco
Orientador

Prof. Dr. Alcir José Modolo
UTFPR/Pato Branco
Coordenador do PPGAG

Aos meus familiares, em especial meu pai Alvino "*in memoria*" e minha mãe Ana Maria pelo incentivo, ao meu esposo Ioannes e minha filha Beatriz, pela compreensão e apoio em todos os momentos!

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me iluminar e fortalecer nos momentos de decisões difíceis da minha vida profissional;

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade do retorno e realização do curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de mestrado;

Ao meu orientador Thiago de Oliveira Vargas, exemplo de profissionalismo e competência, pela oportunidade, paciência, amizade e confiança em mim depositada;

Agradeço a minha coorientadora Rosangela Dallemole Giaretta;

À professora Taciane Finatto pela imensa paciência e orientação na condução das análises moleculares;

Ao meu coorientador Prof. Mauricio Rossato que mesmo distante me orientou e compartilhou seus conhecimentos e sabedoria na condução deste trabalho;

A Embrapa Hortaliças, em especial ao Dr. Carlos Lopes pela contribuição no desenvolvimento dessa dissertação;

Ao Engenheiro Agrônomo Cleverson Bruneto, pela ajuda na coleta das plantas de tomate com sintomas de murcha, você foi essencial ao meu trabalho meu muito obrigado;

A Paula Stellmann, Eliane Carneiro e João Kafer, pela amizade, apoio e ensinamento com as análises no Laboratório de Fitopatologia e com as análises moleculares, aprendi muito com vocês, muito obrigada;

A todos meus amigos, Jessica Cardoso, John Modesto Suélen Mazon, Talita Kutz e Helter Carlos Pereira, que me acolheram com carinho, obrigada pela paciência, ensinamento e amizade.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus não sou o que era antes”. (Marthin Luther King).

RESUMO

ZANON, Vanessa Casiraghi. Identificação molecular de isolados de *Ralstonia* sp. da cultura do tomateiro no Sudoeste do Paraná. 47f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2019.

Uma das principais doenças do tomateiro é a murcha bacteriana, causada pelas espécies *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*. São espécies complexas, formadas por variantes com alta diversidade em termos de adaptação a diferentes condições climáticas, círculo de hospedeiras e agressividade, dentre outras, características que interferem na recomendação de controle da doença. O controle da doença é difícil, sendo que a principal medida é evitar a entrada da bactéria na área de plantio. O objetivo deste trabalho foi identificar molecularmente 46 isolados do agente causador da murcha verde de plantas de tomate cultivadas na região Sudoeste do Paraná. Os isolados de *Ralstonia* sp. foram obtidos de plantas com sintomas de murcha cultivadas em sistema de cultivo protegido e campo aberto. Para o isolamento foi utilizado o meio Kelman a partir exsudação do filete leitoso das porções de caule da planta infectada quando colocados em contato com água autoclavada. A extração do DNA de 46 isolados foi realizado segundo a metodologia de Mahuku (2004) e em seguida utilizado nas análises moleculares. Inicialmente, para confirmar se os isolados pertenciam ao complexo de *R. solanacearum*, foram utilizados os iniciadores específicos 759/760. A seguir, para identificar a qual filotipo os isolados bacterianos pertenciam, foi utilizado um conjunto de cinco primers Nmult, que geram fragmentos de tamanhos diferentes para cada filotipo. Por fim, foi utilizada a técnica de BOX-PCR para caracterização de 21 isolados que confirmaram a etiologia usando os primers 759/760, que possibilitou a construção de uma matriz binária com os fragmentos gerados na amplificação. Em seguida foi construído um dendrograma pelo método UPGMA a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard. A amplificação do DNA de 28 isolados que apresentaram fragmentos de 280 pbs indicaram o patógeno como pertencente à espécie *R. solanacearum* e a amplificação do DNA de 26 isolados posicionaram todos os isolados no filotipo II, de origem da América. A comparação entre os padrões de bandas de DNAs genômicos amplificados por BOX-PCR indicou diversidade molecular na população com a formação de cinco grupos ao nível de 0,31 de similaridade, que podem ou não estar associados a padrões diferenciados de agressividade ou virulência. Os resultados deste trabalho contribuirão para melhor entender a distribuição geográfica do patógeno na região e auxiliar em trabalhos de melhoramento genético para obtenção de cultivares de tomateiro resistente a *R. solanacearum*.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*. PCR-multiplex. BOX- PCR

ABSTRACT

ZANON, Vanessa Casiraghi. Molecular identification of *Ralstonia* sp. of the tomato crop in the Southwest of Paraná. 47f. Dissertation (Master in Agronomy) - Postgraduate Program in Agronomy (Area of Concentration: Plant Production), Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2019.

One of the main diseases of tomato is bacterial wilt, caused by the species *Ralstonia solanacearum* and *R. pseudosolanacearum*. They are complex species, formed by variants with high diversity in terms of adaptation to different climatic conditions, host circle and aggressiveness, among others, characteristics that interfere in the recommendation of disease control. The control of the disease is difficult, and the main measure is to avoid the entrance of the bacterium in the area of planting. The objective of this work was to molecularly identify 46 isolates of the agent responsible for the green wilt of tomato plants grown in the Southwest region of Paraná. The isolates of *Ralstonia* sp. were obtained from plants with wilt symptoms cultivated in a protected field system and open field. For isolation the Kelman medium was used from millet filament exudation of the stem portions of the infected plant when placed in contact with autoclaved water. DNA extraction from 46 isolates was performed according to the methodology of Mahuku (2004) and then used in the molecular analyzes. Initially, to confirm whether the isolates belonged to the *R. solanacearum* complex, specific primers 759/760 were used. Then, to identify which phylotype the bacterial isolates belonged to, a set of five Nmult primers were used, which generate fragments of different sizes for each phylotype. Finally, the BOX-PCR technique was used to characterize 21 isolates that confirmed the etiology using primers 759/760, which allowed the construction of a binary matrix with the fragments generated in the amplification. A dendrogram was then constructed using the UPGMA method using the Jaccard coefficient of similarity. DNA amplification of 28 isolates with fragments of 280 bp indicated the pathogen as belonging to the *R. solanacearum* species and the DNA amplification of 26 isolates positioned all the isolates in the phylotype II, from the Americas. The comparison between the standards of BOX-PCR amplified genomic DNA bands indicated molecular diversity in the population with the formation of five groups at the level of 0.31 of similarity, which may or may not be associated with differentiated patterns of aggressiveness or virulence. The results of this work contributed to a better understanding of the geographical distribution of the pathogen in the region and to help in genetic improvement work to obtain tomato cultivars resistant to *R. solanacearum*.

Keywords: *Solanum lycopersicum*. PCR-multiplex. BOX-PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – (A) Exsudação do pus bacteriano através do teste do copo; (B) Necrose dos vasos xilemáticos; (C) Sintoma de murcha verde em plantas de tomate. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2019.....18
- Figura 2 – Distribuição geográfica dos isolados de *R. solanacearum* utilizados no estudo. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2019.....25
- Figura 3 – Teste do copo para visualização do pus bacteriano, característica da bactéria *R. solanacearum*. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2019.....27
- Figura 4 – Eletroforese com gel de agarose com o resultado da PCR com iniciadores 759/760, para identificação de etiologia. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2019.....34
- Figura 5 – Eletroforese com gel de agarose com o resultado da PCR multiplex para identificação do filotipo de isolados do complexo de espécies de *Ralstonia solanacearum*. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2019.....35
- Figura 6 – Eletroforese com gel de agarose com o resultado da PCR de isolados de *Ralstonia solanacearum* utilizando o primer BOX. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2019.....37
- Figura 7 – Dendrograma obtido a partir da análise de similaridade genética de isolados de *Ralstoniasolanacearum* quanto aos perfis genômicos obtidos por BOX-PCR, utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard e agrupamento pelo método UPGMA. Similaridade média 0,31. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.....37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Origem geográfica de cada filotipo e tamanho dos fragmentos da região ITS. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.....22
- Tabela 2 - Esquema de classificação de *Ralstonia solanacearum* (Fegan e Prior, 2005). UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2019.....22
- Tabela 3 – Informações sobre os isolados utilizados no estudo. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2019.....26
- Tabela 4 - Iniciadores (primers) utilizados para análise molecular de *R. solanacearum*. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.....32

LISTA SIGLAS E ABREVIATURAS

DERAL	Departamento de Economia Rural
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SEAB	Secretaria da Agricultura e Abastecimento
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
UPGMA	<i>Unweighted Pair-Group Nethod Using na Arithmetic Average</i>
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 CULTURA DO TOMATE.....	15
2.2 A MURCHA BACTERIANA.....	17
2.3 A BACTERIA <i>Ralstonia solanacearum</i>	19
2.4 CLASSIFICAÇÃO DO PATÓGENO <i>Ralstonia solanacearum</i>	20
3 OBJETIVOS	24
3.1 GERAL	24
3.2 ESPECÍFICOS.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>R. solanacearum</i>	25
4.2 TESTE DO COPO.....	27
4.3 ISOLAMENTO E ARMAZENAMENTO DA BACTÉRIA.....	27
4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS.....	29
4.4.1 Obtenção do material para extração do DNA.....	29
4.4.2 Extração, integridade e quantificação do DNA.....	29
4.4.3 Reações de PCR.....	30
4.4.4 Análise de Dados	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	33
6 CONCLUSÕES	40
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

No Brasil o setor produtivo de tomate de mesa é um ramo da economia agrícola considerada como uma atividade produtiva e lucrativa que atua com técnicas modernas e eficientes. A cadeia produtiva de tomate tem assumido grande importância socioeconômica na agricultura, devido à geração de emprego e alimento, é classificado como segunda hortaliça mais consumida no mundo (NICK; SILVA, 2016).

Problemas relacionados com a sanidade da cultura do tomateiro podem limitar o sistema de produção, onde distúrbios bióticos e abióticos podem levar a perdas de até 100% da produção (DENNY, 2006). O cultivo sucessivo, manejo inadequado da irrigação e degradação das características físicas e químicas do solo podem levar ao desequilíbrio nutricional da planta e o aparecimento de diversas doenças causadas por bactérias, fungos, vírus e nematoides (LOPES; AVILA, 2005).

A murcha bacteriana causada pelo gênero *Ralstonia* é um dos fatores bióticos que mais afeta lavouras de tomate. Nas regiões Sul e Sudeste devido à expansão do cultivo protegido, temperatura elevada, verão chuvoso e manejo inadequado do solo, inúmeras lavouras vem apresentando problema com murcha, com perdas expressivas da produção comercial e de subsistência (LOPES *et al.*, 2015).

A bactéria *R. solanacearum* é um patógeno habitante de solo e adapta-se facilmente a diferentes condições de ambiente (DENNY, 2006; PRIOR *et al.*, 2016). Pode permanecer no solo ou em plantas daninhas hospedeiras por vários anos. A dispersão da bactéria ocorre pelo solo aderido em máquinas e implementos, irrigação, material de propagação vegetativo, além de ser endêmica em regiões tropicais, subtropicais e temperados (DENNY, 2006).

O principal sintoma observado em tomateiro é a murcha verde, devido à produção de polissacarídeos extracelulares que obstruem os vasos xilemáticos, afetando o transporte de água e nutrientes para a parte aérea da planta. (BEDENDO, 2011).

Devido à falta de produtos químicos e a complexidade no controle de *R. solanacearum*, medidas preventivas e alternativas, como utilização de cultivares resistentes, devem ser levadas em consideração para a implantação de lavouras de produção (ROMEIRO, 2005; BAPTISTA *et al.*, 2007).

Apesar de existirem pesquisas voltadas em desenvolver cultivares de tomateiro resistente, a murcha bacteriana continua sendo um dos principais problemas na produção, pois existem grande diversidade patogênica dentro da espécie presente nos solos brasileiros (LOPES *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2013).

O conhecimento sobre a ocorrência da variabilidade de *Ralstonia* em regiões brasileiras é fundamental para a compreensão da resistência de cultivares, na tomada de decisões e de estratégias de controle do patógeno.

Atualmente a utilização de técnicas moleculares para estudos da diversidade de *R. solanacearum* tem se tornado um procedimento importante devido sua capacidade de diferenciar essas variações fenotípicas e genotípicas, permitindo uma avaliação mais completa e eficiente para melhor entender essa variabilidade e, conseqüentemente, auxiliar na busca de medidas de controle (MOON *et al.*, 2016).

Diante do exposto, o objetivo do estudo é identificar isolados do agente causador da murcha bacteriana de plantas de tomate, cultivados na região Sudoeste do Paraná.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DO TOMATE

O tomateiro cuja espécie é *Solanum lycopersicum* L. tem a sua origem na zona andina de América do Sul, foi domesticado no México e introduzido na Europa no ano de 1544. Mais tarde, propagou-se para a Ásia meridional e oriental, África e Oriente Médio, e para outras partes da América do Sul e do México. No Brasil, foi introduzido no final do século XIX por imigrantes europeus (ALVARENGA, 2004).

O tomate pertence à família solanaceae, é uma das hortaliças mais produzidas e a segunda mais consumida no mundo, assumindo grande importância socioeconômica principalmente pelo volume de produção, geração de emprego e renda, (NICK; SILVA, 2016), principalmente para o agricultor familiar, haja vista que é uma cultura que demanda mão-de-obra desde a sementeira até a comercialização (PEREIRA *et al.*, 2007).

Considerada uma planta com uma ampla capacidade de adaptação, o tomateiro pode ser cultivado em diferentes latitudes geográficas. Seu cultivo pode ser a campo ou em ambiente protegido, utilizando-se de diferentes e modernas tecnologias (FARIAS, 2012),

A China se destaca como o maior produtor mundial, com 55,5 milhões de toneladas, enquanto o Brasil é líder de produção da América Latina ocupando o nono lugar com 4,2 milhões de toneladas. No Brasil, segundo dados do IBGE (2018) a safra de tomate foi de 4,5 milhões de toneladas em 2018, um aumento de 3,1% em relação a 2017. Com área plantada de 64,6 mil hectares em todo território brasileiro, o Estado de Goiás liderou com 32,4% da produção do Brasil, São Paulo com 21,1%, Minas Gerais com 16,7%, Bahia com 4,5% e o Estado de Santa Catarina com 4,4% da produção de tomate do Brasil.

No Estado do Paraná, segundo dados da SEAB/DERAL (2017), a região de Ponta Grossa cultivou 836 hectares de área com uma produção de 53.255 toneladas de tomate. Já, no Sudoeste do Paraná, a região de Francisco Beltrão

cultivou 100 hectares de área e produziram 5.000 toneladas de tomate e a região de Pato Branco com uma produção 38 hectares produziu 2.340 toneladas de tomate.

A produção mundial da cultura do tomate cresceu muito nos últimos anos, sendo que os principais fatores para essa expansão estão no aumento do consumo devido sua importância nutritiva e na inovação e acesso a novas tecnologias de cultivo (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007).

A procura pelo consumidor por produtos mais saudáveis, com maior valor nutricional, livres de produtos químicos, tem favorecido o aumento do cultivo de tomate no sistema de manejo orgânico (PEREZ, *et al.*, 2016). A produção de tomate orgânico representa menos de 4% do total da área cultivada, portanto é uma das culturas que reflete uma ótima oportunidade de negócio para o setor produtivo, porém ainda é um grande desafio aos produtores e pesquisadores devido a inúmeros problemas que pode acometer a produção (MELO *et al.*, 2017).

Os principais desafios da produção de tomate principalmente no sistema orgânico estão relacionados com o controle das diversas doenças causadas por bactérias, fungos, vírus e nematóides. Dentre as doenças bacterianas estão: cancro-bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*); mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*); pinta-bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*); murcha-bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), talo-oco e podridão mole dos frutos (*Pectobacterium* spp e *Dickeya* spp.). Enquanto que as doenças fúngicas são: mancha-de-estenfílio (*Stemphyllium* spp.); mela-de-rizoctonia (*Rhizoctonia solani*); murcha-de-fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*); murcha-de-verticílio (*Verticillium dahliae*); pinta-preta (*Alternaria tomatophila*); podridão-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii*); podridão-de-esclerotínia (*Sclerotinia sclerotiorum*); requeima (*Phytophthora infestans*) e septoriose (*Septoria lycopersici*) (SILVA *et al.*, 2013). Além de nematóides de galhas (*Meloidogyne* spp.) algumas viroses do complexo do vira-cabeça do tomateiro como, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) também podem trazer problemas a cultura (LOPES; AVILA, 2005; SILVA *et al.*, 2013).

O controle das doenças do tomateiro normalmente é complexo e muitas vezes sem resultados positivos. O conhecimento da etiologia, da

sintomatologia pode facilitar o produtor na prevenção da ocorrência de doenças na cultura, por isso da importância de vistorias constante na lavoura, na identificação de anomalias como crescimento deficiente, plantas murchas, mofos, manchas nas folhas, frutos deformados (SILVA *et al.*, 20013). Assim possibilitará ao produtor a eliminação de plantas doentes, utilização de tratamentos preventivos, aplicação de medidas alternativas, medidas culturais e tecnologia capaz de reduzir ou suprimir os problemas (LOPES; ROSSATO, 2013). Pois ainda não foram desenvolvidos produtos químicos eficientes, economicamente e ambientalmente viáveis para o controle da murcha bacteriana. (ROMEIRO, 2005).

Outra alternativa simples e eficiente que pode ser utilizada para o controle da bactéria *Ralstonia* sp. são as cultivares resistente, além da utilização de porta-enxertos comerciais de tomate (LOPES *et al.*, 2015). Porém devido às variações climáticas e a variabilidade genética da bactéria, a resistência genética não tem demonstrado estabilidade, como é o caso da utilização da enxertia em porta enxerto comercial resistente (RIVARD *et al.*, 2012).

Diante da grande complexidade do controle da murcha bacteriana o manejo integrado através de medidas preventivas e alternativas, a escolha de área menos propícia ou livre do patógeno deve ser levada em consideração para implantação de culturas suscetíveis a murcha bacteriana (BAPTISTA *et al.*, 2007).

2.2 A MURCHA BACTERIANA

A murcha bacteriana causada pelo complexo de espécies de *Ralstonia solanacearum* é considerada uma das principais doenças de plantas de tomate. O primeiro relato desta bactéria a nível mundial foi no Japão do final do século XVII, na cultura do fumo (KELMANN, 1953). Já, no Brasil foi Von Parseval em 1922 no Estado do Rio Grande do Sul quem, relatou os primeiros casos da murcha bacteriana em plantas de fumo e batata (TAKATSU; LOPES, 1997).

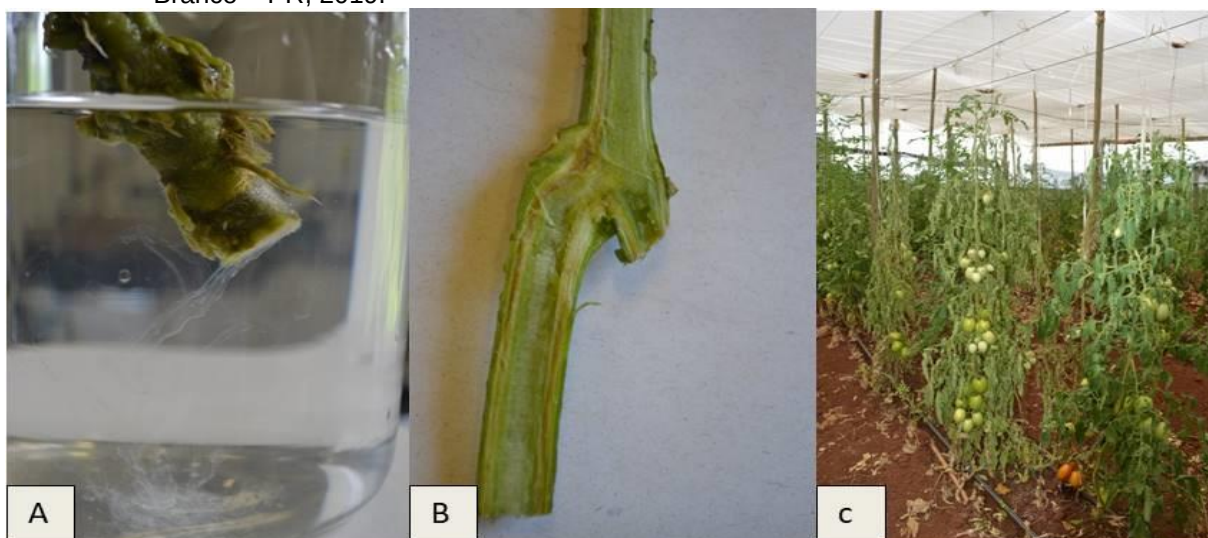
As bactérias do gênero *Ralstonia* que causam a murcha em plantas são habitantes do solo, apresentam flagelos polares, que facilita a locomoção e penetração na planta através do xilema, que é um tecido vascular vegetal condutor da seiva. A emergência de raízes secundárias, aberturas naturais ou lesões

causadas por práticas culturais também favorecem a penetração da bactéria (LIU *et al.*, 2005).

Devido à colonização dos vasos xilemáticos pela bactéria e a produção de exopolissacarídeos (EPS), o fluxo de seiva da planta pode ser bloqueado total ou parcialmente, afetando o transporte de água e nutrientes para a parte aérea da planta, resultando a murcha da planta por estresse hídrico (BEDENDO, 2011).

No tomateiro, os sintomas típicos são a murcha verde, necrose dos vasos e nanismo da planta. Sendo que o principal sinal da presença da bactéria na planta é a exsudação do pus bacteriano (células bacterianas e exopolissacarídeo), que pode ser visualizado através do teste do copo (Figura 1). A doença pode se manifestar em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo mais comum no estágio de formação do primeiro cacho de frutos, sendo que o dano causado é irreversível levando a morte da planta, resultando em grande prejuízo econômico (LOPES, 2009).

Figura 1 - (A) Exsudação do pus bacteriano através do teste do copo; (B) Necrose dos vasos xilemáticos; (C) Sintoma de murcha verde em plantas de tomate. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.



A murcha bacteriana é encontrada em solos de todos os Estados brasileiros, principalmente nas Regiões Nordeste e Norte, com predominância de clima tropical e subtropical, onde as condições climáticas são de alta umidade e

temperaturas elevadas, ideal para desenvolvimento da bactéria (SANTIAGO *et al.*, 2017).

Com a expansão do cultivo do tomate nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, a murcha bacteriana passou a ser um dos principais problemas, principalmente no sistema de plantio em estufa ou “mulch” de plástico (LOPES *et al.*, 2015). A dificuldade do manejo, rotação de culturas, temperatura elevada, excesso de umidade, são alguns fatores que tem contribuído com aumento gradativo da população bacteriana no solo, agravando a intensidade da doença (MENDONÇA, 2014). A utilização de implementos contaminados, água da chuva ou irrigação também contribuem para a disseminação, até mesmo em áreas recém desmatadas, com a prática de rotação de culturas com pastagem ou outras espécies não hospedeiras. (LOUWS *et al.*, 2010).

Acredita-se que a medida que o aquecimento global do planeta se intensifica é muito provável que os danos causados pela bactéria *R. solanacearum* venha ser ainda mais devastador, devido ao fato da sua capacidade de sobrevivência e adaptação a diferentes tipos de solos e ambientes (JEONG *et al.*, 2007).

2.3 A BACTÉRIA *Ralstonia solanacearum*.

A bactéria *Ralstonia solanacearum* é considerada um patógeno cosmopolita altamente agressivo e bastante variável, é hospedeira de aproximadamente 200 espécies e estão distribuídas em cerca de 50 famílias botânicas (WICKER, 2007; PRIOR *et al.*, 2016). Dentre as espécies hospedeiras encontram-se as solanáceas: batata (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Outras espécies, como a banana (*Musa* spp.), amora (*Morus alba* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), além de plantas daninhas, também são consideradas hospedeiras (MIRANDA *et al.*, 2004; XU, 2009).

Ralstonia solanacearum são bactérias Gram-negativas, habitantes de solo, possuem formato de bastonetes retos ou levemente curvos, medem 0,5-1,0 x 1,5-4 µm, não formam esporos, são aeróbicas, não fluorescentes, tendo seu melhor

crescimento em temperaturas entre 25 a 35°C (AGRIOS, 2005). Apresentam flagelos polares para se locomoverem, catalase e oxidase positiva (com acúmulo de poli- β -hidroxibutirato) (DENNY; HAYWARD, 2001). São classificadas taxonomicamente da seguinte maneira: Domínio: Bactéria; Ramo ou Filo: Proteobacteria; Classe: Betaproteobacteria; Ordem: Burkholderiales; Família: Burkholderiaceae; Gênero: *Ralstonia*; Espécie: *R. solanacearum* (Smith) (YABUUCHI, 1995).

A bactéria *R. solanacearum* quando cultivada em meio de cultura, pode apresentar dois tipos de colônias: fluida ou mucoide (devido à produção de exopolissacarídeo) e afluída ou não mucoide (mais seca) (KELMAN, 1953; EPPO, 2004). Quando isoladas em meio de cultura Kelman contendo cloreto de trifenil tetrazólio, as colônias mais secas que está associada à perda de virulência do isolado o centro das colônias apresentam uma coloração avermelhada e as colônias virulentas apresentam colônias brancas com centros róseos (KELMAN, 1954).

O controle da murcha bacteriana é muito difícil, pois *R. solanacearum* é um patógeno que vive saprofiticamente por longos períodos em diferentes tipos de solo, em associação com plantas hospedeiras, restos culturais e podem persistir por vários anos nas lavouras (DENNY, 2005). A sobrevivência desta bactéria pode estar relacionada com a capacidade da utilização de compostos orgânicos como fonte de energia ou pela capacidade de entrar em dormência no solo (GREY; STECK, 2001). Genin e Boucher (2002) relataram que o patógeno utiliza compostos como açúcares, ácidos graxos e compostos aromáticos resultante da degradação da lignina, tornando o solo um ambiente favorável para sua sobrevivência mesmo após a morte do hospedeiro, dificultando um prévio diagnóstico.

2.4 CLASSIFICAÇÃO DO PATÓGENO *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum foi descrita pela primeira vez por Smith em 1896, como *Bacillus solanacearum*. Em 1914, Smith classificou-a como *Pseudomonas solanacearum*, sendo que foi então reclassificada como *Burkholderia solanacearum* (Smith) por Yabuuchi em 1922 e somente três anos depois a espécie foi novamente classificada como um novo gênero denominado *Ralstonia*.

Devido sua ampla gama de hospedeiros, propriedades fisiológicas e genéticas, *R. solanacearum* foi considerada como um complexo de espécies (CER) (DENNY, 2006). Porém, a classificação inicial proposta para essa variabilidade dos isolados pertencentes a esse gênero foi em raças e biovars. A classificação em raça está na capacidade do patógeno em infectar diferentes hospedeiros, atualmente cinco raças são conhecidas. A raça 1 representa isolados patogênicos ao tomate, outras solanáceas, fumo e algumas bananas; a raça 2 é patogênica às bananeiras triplóides e helicônias; enquanto a raça 3 é patogênica à batata e tomate; a raça 4 patogênica ao gengibre e a raça 5 à amoreira, sendo que as raças 4 e 5 não foram ainda detectadas no Brasil. (HAYWARD, 1994).

A classificação em biovars foi definida como grupos fisiológicos que diferem quanto à capacidade em utilizar diferentes fontes de açúcar (lactose, maltose e celobiose) e álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol), atualmente são conhecidas as biovars 1, 2A, 2T, 3, 4, e 5 (HAYWARD, 1994). No Brasil foi relatado a existência da biovar 1 em todas as regiões e está associada principalmente a tomate, pimentão, pimenta e eucalipto. Já a biovar 2 predomina nas regiões de climas amenos do Sul, Sudeste e Centro-Oeste. A biovar 2T é encontrada principalmente em regiões tropicais de baixa altitude enquanto a biovar 2A em regiões temperadas de altas altitudes. A biovar 3, reclassificada como *R. pseudosolanacearum*, ocorre com maior frequência nas regiões Norte e Nordeste onde o clima é mais quente, com relatos na região central. Já as biovars 4 e 5 não foram relatadas no Brasil (SANTIAGO *et al.*, 2016).

Apesar da classificação em raças e biovars terem sido muito utilizadas em estudos nos últimos anos, são relatadas algumas desvantagens com relação a essas técnicas: são demoradas, incapazes de definir estirpes em nível sub-específico, e não apresentam resultados que liguem a origem geográfica das espécies, tornando muitas vezes os resultados não específico (SILVEIRA *et al.*, 2005).

Além da classificação em raças e biovars, Fegan e Prior (2005) propuseram uma nova classificação em filotipos, usado para designar grupos maiores no nível de subespécies e é identificado por PCR multiplex, baseada na variação de tamanho de *amplicons*, gerados da sequência da região espaçadora

intergênica (ITS) entre os genes de RNA ribossomal 16S-23S. Também foi abordado nessa classificação, o relacionamento dos grupos de isolados com as regiões geográficas (tabela 1), (PRIOR *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Origem geográfica de cada Filotipo e tamanho dos fragmentos da região ITS. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.

Filotipo	Origem	Tamanho do ITS (pb)
I	Ásia	144
II	América	372
III	África	91
IV	Indonésia	231

Recentemente Safni *et al.* (2014) sugeriram uma nova revisão taxonômica de *R. solanacearum* onde dividiram em três espécies: *R. solanacearum* (filotipo II), *R. pseudosolanacearum* sp. nov. (filotipo I e III) e *R. syzygii* dividido em três subespécies: *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., o qual pertence o filotipo IV causador da murcha bacteriana; *R. syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov que está associado a doença de Sumatra do cravo na Indonésia; e *R. syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov associada a doença Blood Disease Bacteria.

As sequevares são determinadas por agrupamento de isolados que apresentam variações no sequenciamento do gene *egl*, que codifica a enzima endoglucanase. Atualmente são conhecidos 4 filotipos e 57 sequevares (SANTIAGO *et al.*, 2016). Essa nova classificação proposta por Fegan e Prior (2005), resultou em quatro níveis taxonômicos, espécies, filotipos, sequevar e clone (Tabela 2).

Tabela 2 - Esquema de classificação de *Ralstonia solanacearum* (Fegan e Prior, 2005). UTFPR, Câmpus Pato Branco - PR, 2019.

Nível Taxonômico	Equivalência Taxonômica	Nomenclatura	Modo de Identificação
Espécie	Espécie	Complexo <i>R. solanacearum</i>	"Primers" PCR
Filotipo	Subespécie	Filotipos I, II, III e IV	Multiplex PCR (Região ITS)
Sequevar	Grupos infra-subespecíficos	Sequevar 1-N	Gene endoglucanase
Clone	Linhagens Clonais		"Fingerprinting" (rep-PCR, RAPD, AFLP, PFGE, etc)

Para o estudo da diversidade de *R. solanacearum* tem sido utilizado elementos repetitivos para a análise de genomas bacterianos, que mostrou ser um método eficiente, pois amplicons de diferentes tamanhos são gerados por PCR com primers direcionados a elementos repetitivos do DNA genômico total (XUE, *et al.*, 2011). A utilização dessa técnica é fundamental para a caracterização da estrutura e diversidade genética de *R. solanacearum*, pois aborda questões relacionadas com sua origem geográfica (CHO; TIEDJE, 2000).

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é baseada na duplicação quantitativa da molécula de DNA por meio de sua replicação *in vitro*. Segundo Moon *et al.* (2016), é uma técnica que possibilitou o desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares, que são sequências específicas de DNA capazes de diferenciar dois ou mais indivíduos. São fundamentais na caracterização de espécies e em programas de melhoramento, permitindo explorar a biodiversidade, reconstruir relações filogenéticas e compreender a estrutura, e evolução das espécies de plantas, microrganismos e suas populações (FALEIRO, 2011).

Diferentes técnicas moleculares como, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), tem permitido o estudo do relacionamento filogenético e evolutivo de *R. solanacearum*, bem como a rápida avaliação da variabilidade genética a nível intraespecífico (HORITA *et al.*, 2005). Porém as técnicas mais utilizadas para caracterização e subdivisão de espécies bacterianas são as sequências repetitivas de DNA presentes no genoma de bactérias. São as denominadas REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e BOX, (GRIFFITHS *et al.*, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Identificar molecularmente isolados de *Ralstonia* sp. de plantas de tomate, cultivados na região Sudoeste do Paraná, com a finalidade de fornecer subsídios no sentido de recomendar estratégias de controle mais efetivas para a região.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar a espécie dos isolados por meio de reação em cadeia de polimerase PCR-multiplex com iniciadores (*primers*) 759/760, específico para *R. solanacearum*;
- Classificar os isolados de *R. solanacearum* em subespécie, por meio de uma reação de PCR-multiplex com conjunto de *primers* Nmult, e
- Utilizar o Box-PCR como um método para separação de linhagens clonais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS de *R. solanacearum*.

Os isolados *R. solanacearum* (Tabela 3) foram obtidos de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) com sintomas de murcha, cultivadas em sistema convencional e orgânico, tanto em ambiente protegido quanto em campo aberto, nas propriedades localizadas nos municípios da região Sudoeste do Paraná (Pato Branco, Francisco Beltrão, Renascença, Itapejara do Oeste, Verê, Nova Prata do Iguaçu, Mariópolis e Palmas). A coleção é composta de 46 isolados.

Figura 2 – Distribuição geográfica dos locais de coleta dos isolados de *R. solanacearum* utilizados no estudo. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.

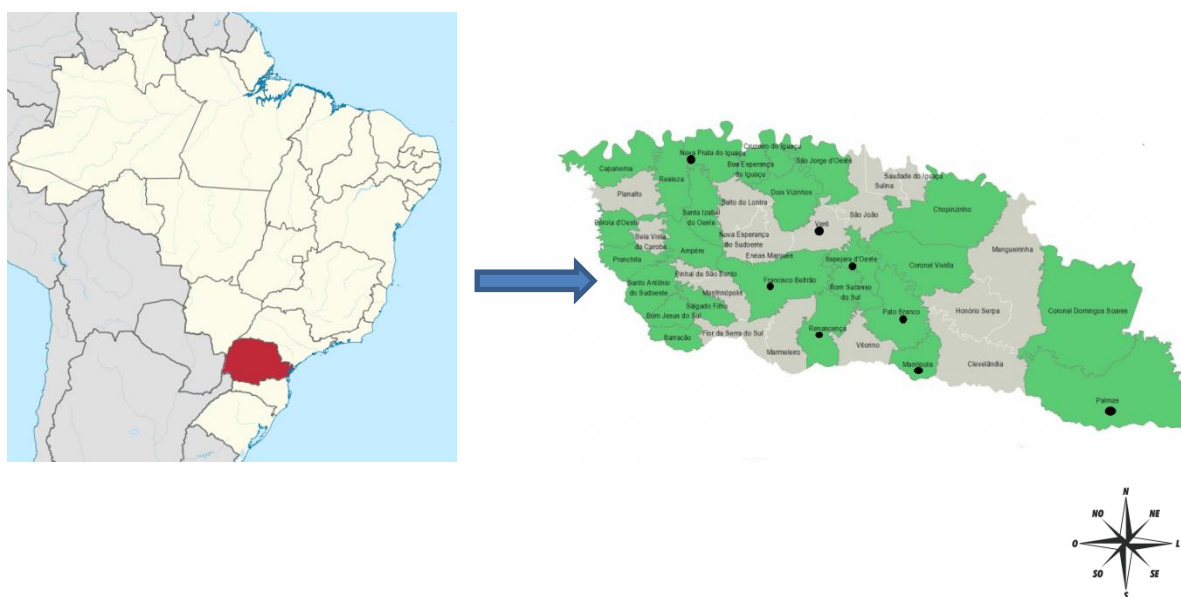


Tabela 3 – Informação sobre os isolados utilizados no estudo. UTFPR, Câmpus Pato Branco - PR, 2019.

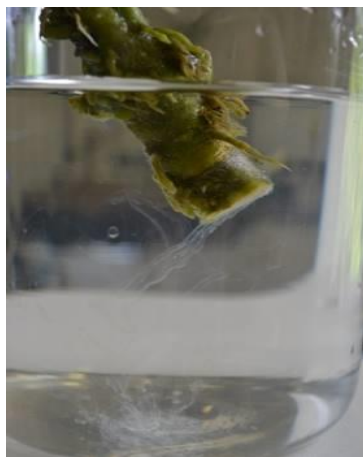
Isolados	Município	Coord. geográficas	Ano	Hospedeiro
REN-1	Renascença/PR	26°12'15.87''S 52°59'46.85''W	2018	Tomate
REN-2	Renascença/PR	26°12'15.87''S 52°59'46.85''W	2018	Tomate
REN-3	Renascença/PR	26°12'15.87''S 52°59'46.85''W	2018	Tomate
REN-4	Renascença/PR	26°12'15.87''S 52°59'46.85''W	2018	Tomate
REN-5	Renascença/PR	26°12'15.87''S 52°59'46.85''W	2018	Tomate
REN-8	Renascença/PR	26°12'15.87''S 52°59'46.85''W	2018	Tomate
REN-9	Renascença/PR	26°12'15.87''S 52°59'46.85''W	2018	Tomate
REN-10	Renascença/PR	26°12'15.87''S 52°59'46.85''W	2018	Tomate
REN-12	Renascença/PR	26°12'15.87''S 52°59'46.85''W	2018	Tomate
MARP-13	Mariópolis/PR	26°18'47.52''S 52°34'17.78''W	2017	Tomate
MARP-14	Mariópolis/PR	26°20'39.46''S 52°40'23.57''W	2017	Tomate
MARP-31R	Mariópolis/PR	26°20'04.73''S 52°33'28.22''W	2017	Tomate
V-18	Verê/PR	25°53'15.31''S 53°00'14.02''W	2017	Tomate
V-20	Verê/PR	25°53'15.31''S 53°00'14.02''W	2017	Tomate
V-30	Verê/PR	25°53'15.31''S 53°00'14.02''W	2017	Tomate
V-34	Verê/PR	25°53'15.31''S 53°00'14.02''W	2017	Tomate
V-35	Verê/PR	25°53'15.31''S 53°00'14.02''W	2017	Tomate
V-37	Verê/PR	25°53'15.31''S 53°00'14.02''W	2017	Tomate
ITA-24/1	Itapejara do Oeste/PR	25°58'45.92''S 52°51'26.54W	2017	Tomate
ITA-38/1	Itapejara do Oeste/PR	25°58'45.92''S 52°51'26.54W	2017	Tomate
ITA-39/1	Itapejara do Oeste/PR	25°58'45.92''S 52°51'26.54W	2017	Tomate
ITA-40/1	Itapejara do Oeste/PR	25°58'45.92''S 52°51'26.54W	2017	Tomate
ITA-64/1	Itapejara do Oeste/PR	25°58'45.92''S 52°51'26.54W	2017	Tomate
ITA-66/1	Itapejara do Oeste/PR	25°58'45.92''S 52°51'26.54W	2017	Tomate
ITA-67/2	Itapejara do Oeste/PR	25°58'45.78''S 52°52'23.87''W	2017	Tomate
ITA-69/2	Itapejara do Oeste/PR	25°58'45.78''S 52°52'23.87''W	2017	Tomate
ITA-71/2	Itapejara do Oeste/PR	25°58'45.78''S 52°52'23.87''W	2017	Tomate
ITA-72/2	Itapejara do Oeste/PR	25°58'45.78''S 52°52'23.87''W	2017	Tomate
ITA-74/3	Itapejara do Oeste/PR	26°00'09.73''S 52°53'18.64''W	2017	Tomate
ITA-76/3	Itapejara do Oeste/PR	26°00'09.73''S 52°53'18.64''W	2017	Tomate
FB-29	Francisco Beltrão/PR	26°03'14.92''S 52°59'22.45''W	2017	Tomate
NPI-43	Nova Prata do Iguaçu/PR	25°38'10.37''S 53°19'38.15''W	2017	Tomate
NPI-44	Nova Prata do Iguaçu/PR	25°38'10.37''S 53°19'38.15''W	2017	Tomate
PB-45	Pato Branco/PR	26°13'56.04''S 52°36'45.16''W	2018	Tomate
PB-46	Pato Branco/PR	26°13'56.04''S 52°36'45.16''W	2018	Tomate
PB-47	Pato Branco/PR	26°13'56.04''S 52°36'45.16''W	2018	Tomate
PA-51	Palmas/PR	26°31'27.44''S 51°58'35.99''W	2018	Tomate
PA-53	Palmas/PR	26°31'27.44''S 51°58'35.99''W	2018	Tomate
PA-54	Palmas/PR	26°31'27.44''S 51°58'35.99''W	2018	Tomate
PA-55	Palmas/PR	26°31'27.44''S 51°58'35.99''W	2018	Tomate
PA-57	Palmas/PR	26°31'27.44''S 51°58'35.99''W	2018	Tomate
PA-58	Palmas/PR	26°31'27.44''S 51°58'35.99''W	2018	Tomate

PA-61	Palmas/PR	26°31'27.44''S 51°58'35.99''W	2018	Tomate
PA-63	Palmas/PR	26°31'27.44''S 51°58'35.99''W	2018	Tomate

4.2 TESTE DO COPO

Como forma de diagnóstico rápido, foi realizado o teste do copo das plantas coletadas com sintoma de murcha. Após a limpeza da planta foi cortada uma pequena porção da parte inferior do caule, em seguida colocou-a submersa em um frasco transparente com água limpa. As amostras que apresentaram um filete leitoso saindo do tecido em direção ao fundo do copo, indicando a presença da exsudação de pus bacteriano, foram separadas para posterior isolamento, as demais foram descartadas (Figura 3).

Figura 3 – Teste do copo para visualização do pus bacteriano, característica da bactéria *Ralstonia solanacearum*. UTFPR, Pato Branco – PR, 2019.



4.3 ISOLAMENTO E ARMAZENAMENTO DA BACTÉRIA

A porção de caule retirada das plantas que apresentaram resultado positivo ao teste do copo, que consiste na presença da exsudação de pus bacteriano, foi lavada com detergente e água corrente para a remoção de partículas de solo e outros contaminantes. Após estes foram secos em papel toalha, e em câmara de

fluxo laminar raspou-se com um bisturi esterilizado a parte mais externa do caule para a remoção de microrganismos e mergulhou-se em álcool comercial flambando-o ligeiramente. Em seguida com um bisturi esterilizado foi retirada de uma das extremidades uma porção de aproximadamente 1 cm do caule e depositado dentro de um tubo de ensaio de 15 x 150 mm, com 3 ml de água autoclavada, deixando em repouso entre 10 a 15 minutos, até a água ficar turva, pela presença de células bacterianas. Logo após, com o auxílio de uma alça de platina, aproximadamente 10 µL da suspensão foram riscadas pelo método de estrias compostas, em placas de Petri contendo 10 ml de meio de cultivo Kelman (Kelman 1954). As placas foram armazenadas em câmara de crescimento a 28°C por 48 horas. Após colônias isoladas da bactéria *R. solanacearum* foram então repicadas para placas de Petri contendo meio de cultivo Keman, sem cloreto de trifênil tetrazólio e mantidas em câmara de crescimento a 28°C por 48 horas, para posterior armazenamento da coleção de isolados.

Para o armazenamento da coleção de isolados de *R. solanacearum* foi utilizado uma alça de repicagem, que após tocada na colônia isolada da bactéria foi mergulhada e agitada em 3 ml de água mineral autoclavada, contida no tubo de criogenia de 5ml. Em seguida os tubos foram agitados por aproximadamente 10 segundos em vortex, para homogeneização da suspensão. Então os tubos foram identificados e armazenados em local fresco para posterior extração de DNA.

O meio de cultivo utilizado foi o Kelman (Kelman 1954) com modificações, onde foi substituída a sacarose pelo glicerol: caseína hidrolisada 1,0 g; peptona 10,0 g; glicerol 5,0 g; ágar 17,0 g, diluídos em 1 litro de água destilada e após autolavagem foi adicionado 5 ml de cloreto de trifênil tetrazólio, preparado a partir de uma solução estoque a 1% em água destilada.

4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

4.4.1 Obtenção do material para extração do DNA

A recuperação dos isolados selecionados, previamente armazenado foi feita pela riscagem da suspensão bacteriana, em placas de Petri contendo meio de cultivo Keman sem cloreto de trifetil tetrazólio e incubadas a 28 °C por 48 horas. Após as colônias da bactéria foram repicadas e mantidas nas mesmas condições, e em seguida, com auxílio de uma alça de platina foram raspadas e colocadas em microtubos de 2 mL contendo 200 µL de água Milli-Q e levadas para a extração de DNA.

4.4.2 Extração, Integridade e Quantificação de DNA

A extração de DNA dos isolados bacterianos seguiu o protocolo descrito por Mahuku (2004). As colônias de bactérias raspadas e colocadas em microtubos de 2 mL e centrifugadas por 5 minutos a 13000 rpm para descarte do sobrenadante. Em seguida foi adicionado mais 1 ml de água ultrapura, centrifugado por 5 minutos descartando-se novamente o sobrenadante. Após foram adicionados em cada tubo 200 µL de Tris EDTA pH 8; 30 µL SDS (dodecil sulfato de sódio), e 10 µL proteinase K, e homogeneizado em um vortex por aproximadamente 15 segundos, em seguida colocado no banho maria por 40 minutos a 65 °C. Após foram adicionados 250 µL de acetato de amônio 7,5M e homogeneizado em vortex por aproximadamente 15 segundos e incubado a -20 °C em um freezer por 10 minutos. Após a suspensão foi centrifugada por 20 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante (400 µL) foi transferido para um tubo de 1,5 mL e adicionados 400 µL de isopropanol gelado e incubado por 1 hora a -20 °C. Após este período o tubo foi centrifugado por 20 minutos a 13000 rpm e descartado o sobrenadante. Após foram adicionados 800 µL de etanol 70% gelado e centrifugado novamente por 5 minutos a 13000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Após, o pellet foi deixado para secar em câmara de fluxo laminar até o álcool evaporar completamente. O pellet foi então ressuspendido em 50 µL de TE com RNase e homogeneizado vagarosamente em um vortex por

aproximadamente 10 segundos. Em seguida foi realizada a digestão do RNA no banho maria por 1 hora a 37 °C para degradação do RNA, após este período os microtubos foram armazenados a -20 °C.

No dia seguinte o precipitado do DNA foi ressuspenso em tampão Tris-EDTA, pH 8,0 e verificada sua qualidade/integridade em gel de agarose 0,8%, corado com GelREd (Biotium). O gel foi visualizado em transluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentado por sistema de captura digital.

A quantidade de DNA foi determinada por meio do espectrofotômetro por leitura de absorvância e da relação 260/280 nm. Com base nos resultados de quantificação, as amostras foram diluídas em Tris-EDTA, pH8,0 para que a concentração final de DNA da solução de trabalho estivesse padronizada à 50 ng μL^{-1} para ser utilizada na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR).

4.4.3 Reações de PCR

Foram realizados três técnicas de PCR para caracterizar os isolados bacterianos. A primeira técnica realizada foi para confirmar se os isolados pertenciam a espécie *Ralstonia* sp., com a utilização dos iniciadores 759/760 (Tabela 4) que amplifica aproximadamente 280pb (OPINA *et al.*, 1997). Para isto foi utilizada uma solução composta por 1,25 μL de tampão de reação; 0,312 μL de dNTPs mix (1 μL dATP, 1 μL dTTP, 1 μL dGTP e 1 μL dCTP); 1 μL de MgCl_2 50mM; 0,1 μL de *Taq* DNA polimerase 5 U μL^{-1} ; 0,5 μL do iniciador 759/760 e 1 μL de DNA extraído 50 ng μL^{-1} . A reação obteve um volume final ajustado para 12,5 μL com adição de água ultrapura autoclavada.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Thermo Electron Corporation PXE 0,2 Thermal Cycler) com o programa composto de: desnaturação inicial 96 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com 2 μL do corante GelRed a 80V. O resultado da eletroforese foi visualizado em transluminador sob luz UV e fotodocumentado por

sistema de captura digital. Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 100pb (plus DNA Ladder – KASVI).

A segunda técnica de PCR realizada foi para identificar a qual filotipo os isolados bacterianos pertenciam. Foi feita pela análise da variação de *amplicons* gerados da sequencia ITS (*intergenic transcribed spacer*) do cromossomo entre os genes de RNA ribossomal 16S e 23S, com um conjunto de cinco primers Nmult (Tabela 4) de acordo com Fegan e Prior (2005).

Foi utilizada uma solução composta por 1,25 μL de tampão de reação; 0,25 μL de dNTPs mix (1 μL dATP, 1 μL dTTP, 1 μL dGTP e 1 μL dCTP); 0,375 μL de MgCl_2 50mM; 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase 5 U μL^{-1} ; 0,30 μL do *primer* Nmult: 21: 1F, 0,30 μL do Nmult: 21 : 2F, 0,30 μL do Nmult: 22 : InF, 0,5 μL do Nmult It22: RR, 0,9 μL do Nmult: 23: AF e 1 μL de DNA extraído 50 ng μL^{-1} . A reação obteve um volume final ajustado para 12,5 μL com adição de água ultrapura autoclavada.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador e as condições de amplificação foram: desnaturação inicial 96 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 59 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%.

Na última técnica de PCR realizada foi utilizado o primer BOX-A1R (Tabela 4), de acordo com Versalovic *et al.* (2004). Foi utilizada uma solução composta por 1,2 μL de tampão de reação; 0,96 μL de dNTPs mix (1 μL dATP, 1 μL dTTP, 1 μL dGTP e 1 μL dCTP); 0,36 μL de MgCl_2 50mM; 0,25 μL de *Taq* DNA polimerase 5 U μL^{-1} ; 2,4 μL do iniciador BOX e 1 μL de DNA extraído 50 ng μL^{-1} . A reação obteve um volume final ajustado para 12 μL com adição de água ultrapura autoclavada.

As condições de amplificação foram: 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto, 65 °C por 8 minutos e uma extensão final de 65 °C por 15 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Tabela 4 - Iniciadores (primers) utilizados para análise molecular de *R. solanacearum*. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.

Primers	Sequência	Referência
Universal		
759	5´- GTC GCC GTC AAA TCA CTT TCC-3´	Opina et al., 1997
760	5´ -GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG-3´	Opina et al., 1997
Filotipos		
Nmult: 21:1F	5´-CGT TGA TGA GGC GCG CAA TTT-3´	Fegan e Prior, 2005
Nmult: 21:2F	5´-AAG TTA TGG ACG GTG GAA GTC-3´	Fegan e Prior, 2005
Nmult: 23:AF	5´-ATT ACS* AGA GCA ATC GAA AGA TT-3´	Fegan e Prior, 2005
Nmult: 22:InF	5´-ATT GCC AAG ACG AGA GAA GTA-3´	Fegan e Prior, 2005
Nmult: 22:RR	5´TCG CTT GAC CCT ATA ACG AGT A-3´	Fegan e Prior, 2005
BOX PCR		
BOX	5´-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3´	Versalovic et al, 1998

*Pode ser as bases C ou G

4.4.4 Análise de Dados

A identificação específica de *R. solanacearum* utilizando os primers 759/760 e a identificação do filitipo através do conjunto de primers Nmult, foi feita através da visualização em géis de agarose, observando a presença de fragmentos de DNA amplificados no tamanho esperado para cada oligonucleotideo iniciador.

Para os resultados da análise de BOX-PCR, foi construída uma matriz binária com os fragmentos gerados na amplificação e que apresentaram um padrão de resolução visível de qualidade, visualizados em gel de agarose a 1,5%. Os fragmentos obtidos foram analisados quanto a presença (1) ou ausência (0) de bandas para a construção de uma matriz binária.

Um dendrograma com matriz de distância foi construído por agrupamento pelo método UPGMA (Método de Agrupamento Médio entre Grupos) a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard (1901).

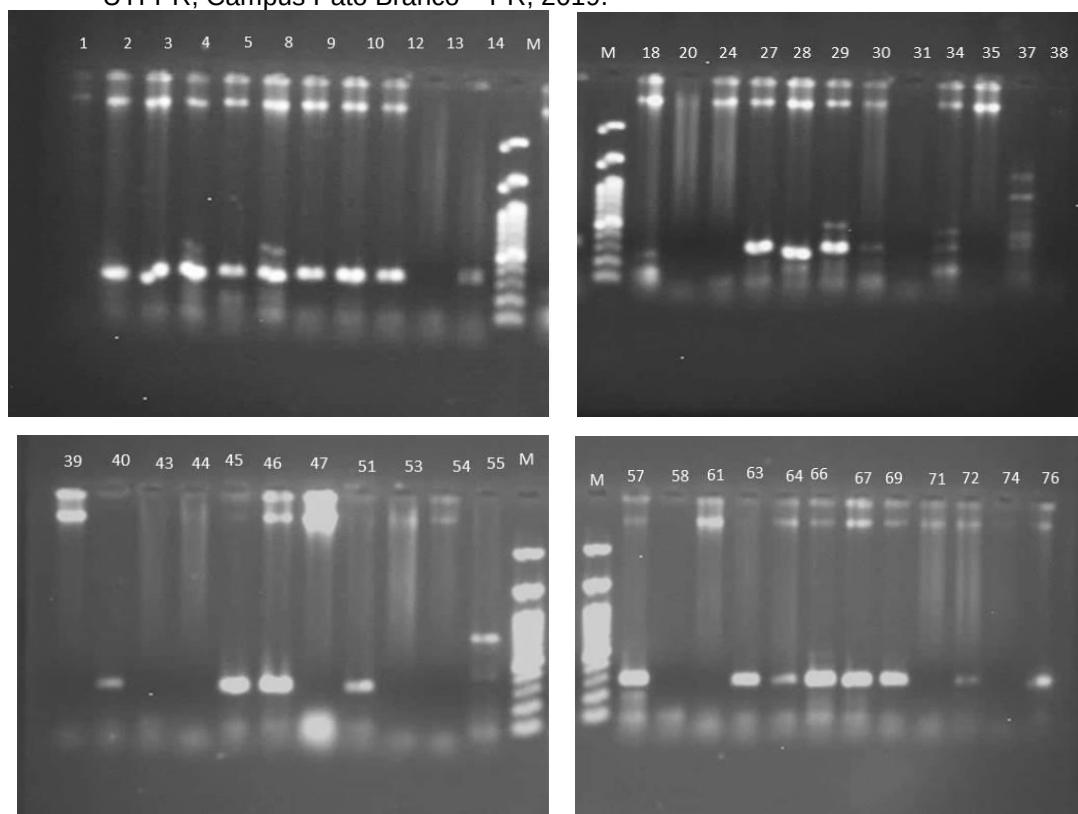
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A técnica de PCR com o par de iniciadores (759/760) para a identificação da espécie *R. solanacearum*, foi possível a visualização nos géis de agarose (Figura 4) a amplificação do DNA de 28 isolados: **2.** REN-2; **3.** REN-3; **4.** REN-4; **5.** REN-5; **8.** REN-8; **9.** REN-9; **10.** REN-10; **12.** REN-12; **14.** MAR-14; **27.** FOR-27; **28.** FOR-28; **29.** FB-29; **30.** V-30; **34.** V-34; **39.** ITA-39/1; **40.** ITA-40/1; **45.** PB-45; **46.** PB-46; **51.** PA-51; **54.** PA-54; **57.** PA-57; **63.** PA-63; **64.** ITA-64/1; **66.** ITA-66/1; **67.** ITA-67/2; **69.** ITA-69/2; **72.** ITA-72/2; **76.** ITA-76/3). O resultado obtido foi a presença de fragmentos de 280pb, confirmando que os isolados pertencem ao complexo de espécies *R. solanacearum* e estão relacionados a nova classificação proposta por Fegan e Prior (2005).

Resultados obtidos em estudos realizado por Santana *et al.* (2012) em 53 isolados de diferentes espécies hospedeiras e por Garcia *et al.* (2013) em 77 isolados da cultura do pimentão no Nordeste brasileiro, com a confirmação do patógeno *R. solanacearum*, mostrou a confiabilidade da técnica de PCR com o par de iniciadores (759/760).

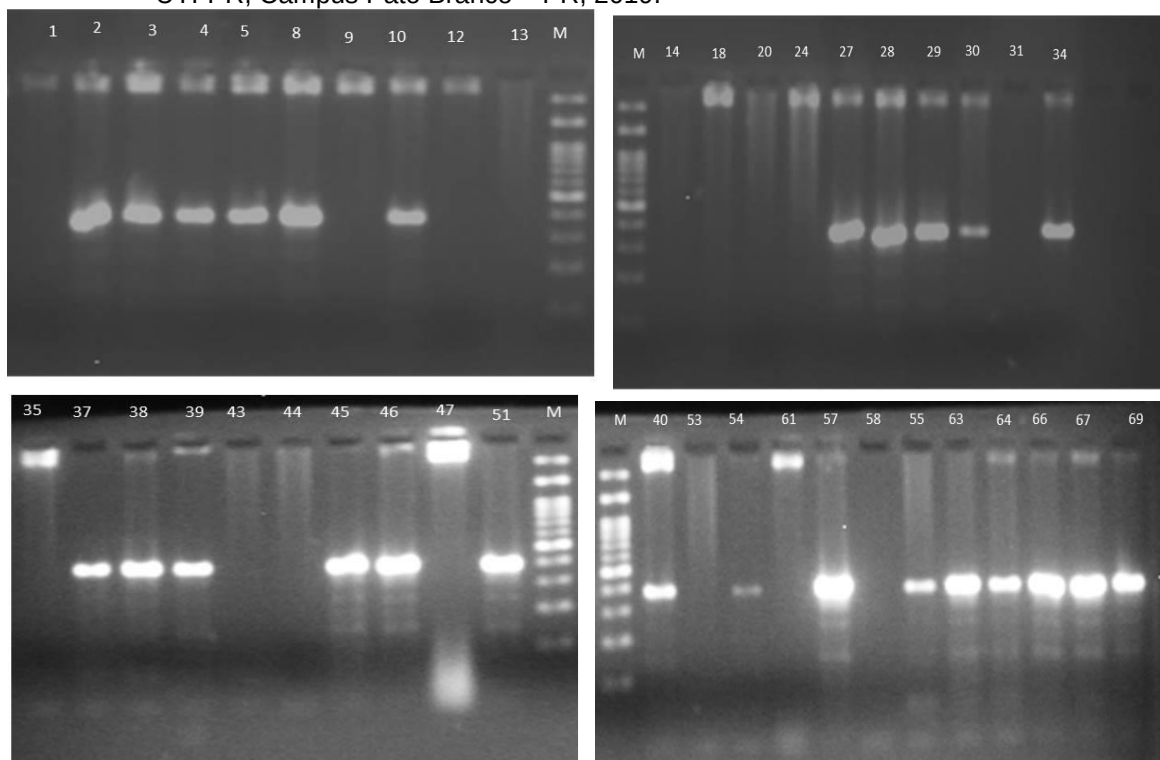
Figura 4 – Eletroforese com gel de agarose com o resultado da PCR com iniciadores 759/760, para identificação de etiologia. Ordem das amostras: **1.** REN-1; **2.** REN-2; **3.** REN-3; **4.** REN-4; **5.** REN-5; **8.** REN-8; **9.** REN-9; **10.** REN-10; **12.** REN-12; **13.** REN-13; **14.** MAR-14; **18.** V-18; **20.** V-20; **24.** ITA-1; **27.** FOR-27; **28.** FOR-28; **29.** FB-29; **30.** V-30; **31.** MAR-31R; **34.** V-34; **35.** V-35; **37.** V-37; **38.** ITA-38/1; **39.** ITA-39/1; **40.** ITA-40/1; **43.** NPI-43; **44.** NPI-44; **45.** PB-45; **46.** PB-46; **47.** PB-47; **51.** PA-51; **53.** PA-53; **54.** PA-54; **55.** PA-55; **57.** PA-57; **58.** PA-58; **61.** PA-61; **63.** PA-63; **64.** ITA-64/1; **66.** ITA-66/1; **67.** ITA-67/2; **69.** ITA-69/2; **71.** ITA-71/2; **72.** ITA-72/2; **74.** ITA-74/3; **76.** ITA-76/3; **M.** marcador 100pb (Kasvi). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.



Ao estudar amostras de solo de 34 áreas de produção de tomate na Nigéria, Poopola *et al.* (2015) obtiveram a confirmação do patógeno *R. solanacearum*. Resultado semelhante foi observado por Santiago *et al.* (2017) em 301 isolados de diferentes regiões brasileiras e plantas hospedeiras.

Para a análise de identificação do filotipo, foi utilizada a técnica PCR-multiplex e conjunto de primers Nmult. Foi possível visualizar nos géis de agarose (Figura 5) a amplificação de DNA de 26 isolados (**2.** REN-2; **3.** REN-3; **4.** REN-4; **5.** REN-5; **8.** REN-8; **10.** REN-10; **27.** FOR-27; **28.** FOR-28; **29.** FB-29; **30.** V-30; **34.** V-34; **37.** V-37; **38.** ITA-38/1; **39.** ITA-39/1; **40.** ITA-40/1; **45.** PB-45; **46.** PB-46; **51.** PA-51; **54.** PA-54; **57.** PA-57; **55.** PA-55; **63.** PA-63; **64.** ITA-64/1; **66.** ITA-66/1; **67.** ITA-67/2; **69.** ITA-69/2). O resultado obtido foi a amplificação de fragmentos de 372pb confirmando pertencerem ao filotipo II (Fegan e Prior, 2005).

Figura 5 – Eletroforese com gel de agarose com o resultado da PCR multiplex para identificação do filotipo de isolados do complexo de espécies de *Ralstonia solanacearum*. Ordem das amostras: **1.** REN-1; **2.** REN-2; **3.** REN-3; **4.** REN-4; **5.** REN-5; **8.** REN-8; **9.** REN-9; **10.** REN-10; **12.** REN-12; **13.** REN-13; **14.** MAR-14; **18.** V-18; **20.** V-20; **24.** ITA-1; **27.** FOR-27; **28.** FOR-28; **29.** FB-29; **30.** V-30; **31.** MAR-31R; **34.** V-34. **35.** V-35; **37.** V-37; **38.** ITA-38/1; **39.** ITA-39/1; **43.** NPI-43; **44.** NPI-44; **45.** PB-45; **46.** PB-46; **47.** PB-47; **51.** PA-51; **40.** ITA-40/1; **53.** PA-53; **54.** PA-54; **61.** PA-61; **57.** PA-57; **58.** PA-58; **55.** PA-55; **63.** PA-63; **64.** ITA-64/1; **66.** ITA-66/1; **67.** ITA-67/2; **69.** ITA-69/2; **M.** marcador 100pb (Kasvi). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.



Na revisão taxonômica sugerida por Safni *et al.* (2014), *R. solanacearum* pertence ao filotipo II e que o estudo da diversidade entre as estirpes está relacionado com sua origem geográfica. Neste estudo pode-se confirmar que os isolados obtidos de plantas de tomate da região Sudoeste do Paraná, pertencem ao filotipo II de origem da América, corroborando com Fegan e Prior (2005) os quais sugerem a prevalência do filotipo II nas Américas.

Em estudos recentes, Santiago *et al.* (2017) utilizando a PCR Multiplex obtiveram resultados de amplificação de fragmentos de 372pb típico do filotipo II, em 253 isolados de diferentes regiões geográficas do Brasil, associado a diferentes hospedeiros, principalmente na região Sul onde apenas o filotipo II foi encontrado. Os mesmos resultados foram obtidos por Santana *et al.* (2012) ao aplicarem essa

técnica molecular em 53 cepas pertencentes a cultura de batata, berinjela, pimentão e tomate.

Estudos similares com a utilização de técnicas moleculares para identificar o filotipo de isolados de *R. solanacearum*, tem sido utilizadas em diferentes partes do mundo. Por exemplo, em um estudo realizado na Martinica por Wicker *et al.* (2007), os autores identificaram uma nova variante da espécie *R. solanacearum* na cultura do antúrio pertencente ao filotipo II, patogênica a cultura do tomate, berinjela e pimenta, além da variedade resistente de tomate Hawaii 7996 e que pode estar dominante também na América do Sul. Resultados semelhantes foram obtidos na província da China, onde Xu *et al.* (2009) aplicaram esta técnica para análise de 286 isolados de *R. solanacearum* de 17 espécies hospedeiras de 13 locais diferentes.

Para PCR utilizando o primer BOX, foram aplicados DNA dos 21 isolados que confirmaram a etiologia usando os primers 759/760.

Para a visualização dos diferentes fragmentos amplificados para cada isolado pela PCR com o primer BOX, foi utilizado o gel de agarose a 1,5% (Figura 6), e a análise de agrupamento dos 21 isolados de *R. solanacearum* foi efetuada por meio da construção de dendrograma (Figura 7). A comparação entre os padrões de bandas de DNAs genômicos amplificados pelo iniciador BOX indicou diversidade na população com a formação de cinco grupos considerando similaridade de 0,31, sendo dois grupos formados cada um por um único isolado e três grupos formados com linhas clonais.

Figura 6 – Eletroforese com gel de agarose com o resultado da PCR de isolados de *Ralstonia solanacearum* utilizando o primer BOX. Ordem das amostras: **2.** REN-2; **3.** REN-3; **5.** REN-5; **8.** REN-8; **10.** REN-10; **27.** FOR-27; **28.** FOR-28; **29.** FB-29; **30.** V-30; **34.** V-34. **39.** ITA-39/1; **40.** ITA-40/1; **45.** PB-45; **46.** PB-46; **54.** PA-54; **57.** PA-57; **63.** PA-63; **64.** ITA-64/1; **66.** ITA-66/1; **67.** ITA-67/2; **69.** ITA-69/2; **M.** marcador 1KB (DNA Ladder – Ludwig). **CN.** controle negativo. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.

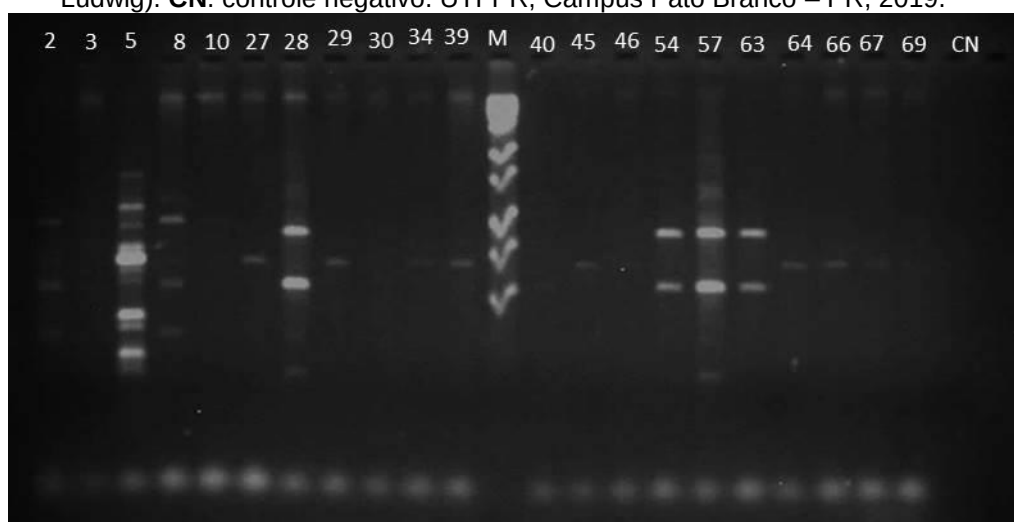
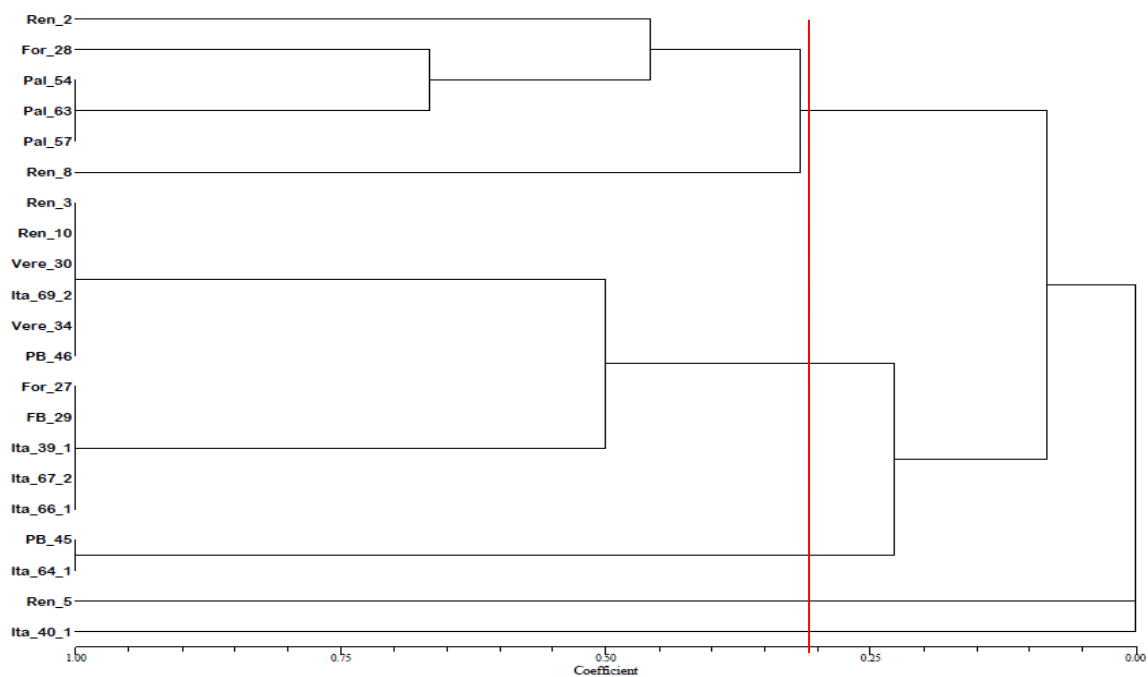


Figura 7 – Dendrograma obtido a partir da análise de similaridade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* quanto aos perfis genômicos obtidos por BOX-PCR, utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard e agrupamento pelo método UPGMA. Similaridade média 0,31. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.



O grupo I é formado por seis isolados separados em dois subgrupos. Os isolados pertencentes ao subgrupo I (Ren_2 e For_28) apresentaram similaridade de 0,33. Ainda no subgrupo I a análise do dendrograma mostrou a formação de um grupo com três isolados (Pal_54, Pal_63, Pal_57), que são geneticamente iguais, e apresentam similaridade de 0,50 com o isolado Ren_2. Os isolados Ren_2 e Ren_8 são isolados coletados de um mesmo local de produção, e mesmo estando alocados em subgrupos diferentes, apresentam similaridade de 0,33.

Ainda com relação ao grupo I, o isolado Ren_8 pertencente ao subgrupo II mesmo estando separado dos demais isolados, possui similaridade de 0,50 com For_28. Vale ainda destacar a grande similaridade de 0,67 entre o isolado For_28 e os isolados Pal_54, Pal_63, Pal_57.

O grupo II por sua vez é formado por onze isolados também separados em dois subgrupos. O subgrupo I, Ren_3, Ren_10, Vere_30, Ita_69_2, Vere_34, PB_46 e o subgrupo II, For_27, FB_29, Ita_39_1, Ita_67_2, Ita_66_1, apresentaram isolados geneticamente similares.

Ainda no grupo II, por mais que o isolado Ren_3 do subgrupo I não tenha nenhuma semelhança com os isolados do subgrupo que pertence, existe uma similaridade de 0,5 com os isolados For_27, FB_29, Ita_39_1, Ita_67_2, Ita_66_1 do subgrupo II.

O grupo III formado por apenas dois isolados, PB_45 e Ita_64_1 ficaram alocados no mesmo grupo e apresentaram similaridade de 0,50, ou seja, alto grau de parentesco.

No grupo IV ficou alocado apenas um isolado o Ren_5, considerado geneticamente diferente de todos os isolados dos grupos I, II, III e V. Pertencem ao mesmo local de coleta dos isolados Ren_2, Ren_3, Ren_8 e Ren_10, porém geneticamente distintos entre si.

O grupo V, também formado apenas por um isolado o Ita_40_1 não apresentou similaridade com os isolados dos demais grupos. Pertence ao mesmo local de coleta dos isolados Ita_39_1, Ita_66_1, Ita_64_1, entretanto geneticamente diferentes entre si.

Neste estudo, a análise do BOX-PCR revelou que os isolados coletados nos nove municípios, localizados nos cinco grupos, são geograficamente similares mesmo pertencendo às áreas de produção diferentes. Como é o caso dos isolados Pal_54, Pal_63, Pal_57, coletados no município de Palmas que apresentaram similaridade de 0,50 com o isolado Ren_2, coletado no município de Renascença. São municípios geograficamente distantes (Figura 2) sendo que Palmas apresenta clima subtropical úmido com inverno rigoroso e Renascença apresenta clima tropical úmido.

Essa separação de isolados coletados de um mesmo local de produção, porém localizados em grupos diferentes como mostra o dendrograma (Figura 7), deixa claro que a bactéria *R. solanacearum* adapta-se facilmente a diferentes tipos de solo e clima, o que a torna um patógeno resistente e facilmente disseminado através do solo contaminado, proveniente de mudas comercializadas por viveiros.

Em um estudo Silveira *et al.* (2005), compararam ERIC e BOX-PCR para diferenciar acessos das biovars 1 e 3, somente o BOX-PCR foi capaz de apresentar polimorfismo entre os isolados, portanto concluíram que o BOX-PCR foi uma técnica eficiente para detectar a diversidade entre as biovars. Rodrigues *et al.* (2012) caracterizaram três raças diferentes e cinco biovars de diferentes culturas, através de ERIC e BOX-PCR, onde 41 amostras analisadas mostraram diversidade genética com a amplificação do BOX e ERIC.

Costa *et al.* (2007) encontraram alto grau de polimorfismo ao usarem apenas o oligonucleotídeo iniciador BOX para analisar a diversidade de *R. solanacearum* patogênica do tomate e outras culturas na região amazônica. O mesmo resultado Cruz *et al.* (2002) obtiveram ao analisar isolados portugueses de *R. solanacearum*.

6 CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos coletados nas Regiões, Sudoeste do Paraná (Pato Branco, Francisco Beltrão, Renascença, Itapejara do Oeste, Verê, Nova Prata do Iguaçu, Mariópolis e Palmas), pertencem ao gênero *Ralstonia*, espécie *R. solanacearum*.

O resultado obtido da PCR multiplex com o conjunto de *primers* Nmult confirmou que, os isolados do estudo pertencem ao filotipo II, de origem da América.

A análise do BOX-PCR indicou diversidade na população dos isolados com a formação de cinco grupos ao nível de 0,31 de similaridade e a formação de linhas clonais em três grupos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho contribuíram para entender melhor a distribuição geográfica do patógeno na região, haja vista que o Brasil é um dos prováveis centros de origem do complexo de espécies de *R. solanacearum*.

A importância do conhecimento do patógeno de outras regiões do Brasil por meio da identificação e caracterização molecular é necessária, pois a escassez de informações sobre a incidência da murcha bacteriana de outros locais reflete uma pesquisa segmentada e em alguns casos não representa a variabilidade local e/ou regional.

Com o resultado é possível contribuir com estratégias de controle para o produtor rural e principalmente auxiliar em trabalhos de melhoramento genético para obtenção de cultivares resistentes à murcha bacteriana.

Recomenda-se que, em trabalhos futuros, sejam avaliados isolados de plantas de tomate com sintomas de murcha bacteriana de outras regiões próximas, para obter uma maior representatividade do patógeno.

Assim como, realizar o teste de patogenicidade dos isolados coletados no trabalho em cultivares de tomate suscetível e resistente a bactéria *Ralstonia solanacearum*.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Burlington: Elsevier. 922p. 2005.

ALVARENGA, M. A. R. Origem, botânica e descrição da planta. In: **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, p.14-23, 2004.

BAPTISTA M. J; REIS JUNIOR F. B; XAVIER, G.R; ALCÂNTARA C; OLIVEIRA A. R; SOUZA, R. B; LOPES, C. A. Eficiência da solarização e biofumigação do solo no controle da murcha-bacteriana do tomateiro no campo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v.42, p.933-938, 2007.

BEDENDO, I. P. Bactérias Fitopatogênicas. In: AMORIM, Luiz; REZENDE, Jorge A. M.; FILHO, Armando, B. **Manual de Fitopatologia**. v.1 Princípios e conceitos. Ed. Agronômica Ceres Ltda, São Paulo, 2011.

CARVALHO, J. L.; PAGLIUCA, L. G. Tomate, um mercado que não pára de crescer globalmente. **Hortifruti Brasil**, Piracicaba, v. 6, n. 58, p. 6-14, 2007.

CHO J.; TIEDJE, J. M. Biogeography and de gree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. **Appl Environ Microbiology**. v.66, p. 5448-5456, 2000.

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

CRUZ, R. et al. Genetic diversity of portuguese isolates of *Ralstonia solanacearum* by minissatélite primed PECR and BOX-PCR in: **International Bacterial Wilt Symposium 3.**, 2002, South Africa. Anais... South Africa: [s.n],p.101. 2002.

DENNY, T.; HAYWARD, A.C. Gram-negative bacteria - *Ralstonia*. In: SCHAAD, N.; JONES, J.B. & CHUN, W. eds. *Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3 ed. APS Press. Estados Unidos. p. 151-174. 2001.

DENNY, T. Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Gnanamanickam, S.S. (eds) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht. p.573-644, 2006.

DENNY. T. P. A short history of biochemical and genetic research on *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. In: *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum* species complexe. St. Paul, MN: APS press. p.323-334, 2005.

EPPO. Diagnostics protocols for regulated pests: *Ralstonia solanacearum*. Bulletin 34, p. 173-178, 2004

FALEIRO, F. G. Princípio científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares. **Biotecnologia, estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011.

FARIAS, E. A. P. **Cultivo do tomateiro sob diferentes porta-enxertos em sistema orgânico de produção**. 2012. 24 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de São Paulo Botucatu, 2015.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How to complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex?” In. ALLEN C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. (Eds.), **Bacterial wilt: then disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**, APS Press, p.449-461, 2005.

GARCIA, A. L.; LIMA, W. G.; SOUZA, G. B.; MECHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt in bell pepper in the state of Pernambuco, Brazil. **Journal of Plant Pathology**. v.95, n.2, p.237-245, 2013.

GENIN, S. BOUCHER, C. Pathogen Profile: *Ralstonia solanacearum*. **Molecular Plant Pathology**. v.33, p.111-118, 2002.

GREY, B. R.; STECK, T. R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. **Appl Environ Microbiol**. V.67, n.0, p.3866-3872, 2001.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 743p. 2006.

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. p.9-24, 1994.

HORITA, M.; TSUCHIYA, K. Genetic diversity of japaneses strains of *Ralstoni solanacearum*. **Phytopathology**. v.91, p.399-407, 2001.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estatística mensal da Produção Agrícola Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Fevereiro 2018
https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/62ff13bdd3554efec8535a90712651b9.pdf visto em 19/11/2018.

JACCARD, A. F. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de La Société Voudoise des Sciencies Natureller**. Payot, v.37, p.547-579, 1901.

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

KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: a literature review and bibliography. Raleigh: North Carolina Agricultural Experiment Station, Technical Bulletin. n.91, 1953.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium me|dium. *Phytopathology*. v.44, p. 693-695, 1954.

LIU, H. ZHANG, S., SCHELL, M. A., DENNY, T. P. Pyramiding unmarked deletion in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. **Mol Plant Microb Interact**. v.18, p.1296-1305, 2005.

LOPES, C. A.; AVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2005.

LOPES, C. A. **Murcha bacteriana ou murchadeira** – Uma inimiga do tomateiro em climas quentes. Brasília: Embrapa Hortaliças. 2009 (Comunicado Técnico, 67).

LOPES, C. A.; ROSSATO, M. **Diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 2013 (Comunicado Técnico, 92).

LOPES, C. A.; BOITEUX, L.; ESCHEMBACK, V. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira**. v.33, n.1, 2015.

LOUWS, F.J.; RIVARD, D. C.; KUBOTA, C. Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds. **Scientia Horticulturae**. v.127, p.127-146, 2010.

MAHUKU, G. S. A simple extraction method suitable for PCR-Based analysis of plant, fungal and bacterial DNA. **Plant Molecular Biology Society Reporter**. v. 22, p. 71-81, 2004.

MELO, A. P. C.; FERNANDES, P., M., NETO, C., S. M.; SELEGUINI, A. Solanáceas em sistema orgânico no Brasil: tomate, batata e physalies. **Scientia Agropecuaria**. v.8, n.3, p.279-290, 2017.

MENDONÇA, J. L. A enxertia e o controle de pragas de solo no cultivo do tomateiro. EMBRAPA Hortaliças, 2014.

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

MOON, B.C.; LEE, Y.M.; KIM, W.J.; JI, Y.; KANG, Y.M. & CHOI, G. Development of molecular markers for authentication of the medicinal plant species *Patrinia* by

random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and multiplex-PCR. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**. n.57, p.182-190, 2016.

NICK, C.; SILVA, D. J. H. **Melhoramento de tomate**. In: Nick, C., Borém, A. (eds) **Melhoramento de Hortaliças**. Editora UFV, Viçosa, p.396-431, 2016.

OPINA, N.; TAVNER, F.; HOLLOWAY, G.; WANG, J. F.; LI, T. H.; MAGHIRANG, R.; FEGAN, M.; HAYWARD, A. C.; KRISHNAPILLAI, V.; HONG, W. F.; HOLLOWAY, B. W.; TIMMIS, J. N. A novel method for development of species and strainspecific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). **Asia Pacific Journal of Molecular Biology Biotechnology**. v. 5, p.19–30, 1997.

PEREIRA, C. M. M. A.; BARROSO, I. L.; MELO, M. R.; PEREIRA, L. P.; DIAS, T. F. Cadeia produtiva do tomate na região de Barbacena sob a ótica da economia dos custos de transação. **Informações Econômicas**. v.37, n.12, p.36-49, 2007.

PEREZ, L. S.; FUENTES, J. A. G.; CARRILLO, M. G.; IBARRA, E. S.; TERRAZAS, S. P. RANGEL, P. P. Calidad biofísico y nutracéutico de frutos de tomate producido com substratos orgânicos. **Nova Scientia**. V.8, n.17, 2016.

POPOOLA, A. R.; GANIYU, S. A.; ENIKUOMEHIN, O. A.; BODUNDE, J. G.; ADEDIBU, O. B.; DUROSOMO, H. A.; KARUNWI, O. A. Isolation na characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of tomato in Nigeria. **Nigerian Journal of Biotechnology**. v.29, p.1-10, 2015.

PRIOR, P.; AILLOUD, F.; DALRING, B.L.; REMENANT, B.; SANCHEZ, B. & ALLEN, C.. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC Genomics**. v.17, p.90-101, 2016.

RIVARD CL; O'CONNELL S; PEET MM; WELKER RM; LOUWS FJ. Grafting tomato to manage bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in the southeastern United States. **Plant Disease**. V.96, p.973-978,2012.

RODRIGUES, L.M.R.; DESTEFANO, S.A.L.; SILVA, M.J.; COSTA, G.G.L.; MARINGONO, A.C. Characterization of *Ralstonia solanacearum* Strains From Brazil Using Molecular Methods and Pathogenicity Tests. **Journal of Plant Pathogenicty**. v.94, p.505-516, 2012.

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

SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L. & KAPPLER, U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as

Ralstonia pseudosolanacearum sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V.64, p.3087-3103, 2014.

SANTANA, B. G.; LOPES, C. A.; ALVAREZ, E.; BARRETO, C. C.; ALLEN, C.; QUIRINO, B. F. Diversity of Brazilian biovar 2 strains of *Ralstonia solanacearum*. **J. Gen Plant Pathol**. v.78, p.190-200, 2012.

SANTIAGO, T.R.; LOPES, C.A.; CAETANO- ANOLLÉS, G. & MIZUBUTI, E.S.G. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient center of diversity of the pathogen. **Plant Pathology**. v.66, p.383-392, 2017.

SEAB, Secretaria de Estado da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento/DERAL, Departamento de Economia Rural. Olericultura – Análise da Conjuntura Agropecuária. Novembro, 2017.
http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2018/Olericultura_2017_18.pdf. Acesso em: 8 de maio de 2018.

SILVA-NETO, C.; LIMA, F. G.; GONÇALVES, B. B.; BERGAMINI, L. L.; BERGAMINI, B. A. R.; ELIAS, M. A. S.; FRANCESCHINELLI, E. V. Native bees pollinate tomato flowers and increase fruit production. **Journal of Pollination Ecology**. Guelph, v. 11, n. 6, p. 41- 45, 2013.

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

SOUZA, N. M.; BLIND, A. D; FILHO, D. F. S.; RODRIGUES, H. S; NODA, H. Avaliação de linhagens e cultivares de tomate resistente a murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) desenvolvida na Amazônia. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer. Goiânia. V.9, n.16, p. 400-410, 2013.

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

VERSALOVIC, J. BRUIJN. F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods Mol Cell Biol** v.5, p.25-40, 1994.

XU, J.; PAN, Z. C.; XU, J. S.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, L. Q.; HE, L. Y.; FENG, J. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. **European Journal of Plant Pathology**. v. 125, n. 4, p.641–653, 2009.

XUE, Q.Y.; YIN, Y.N.; YANG, W.; HEVER, H.; PRIOR, P.; GUO, J. H.; SMALA, K. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China assessed by PCR based fingerprints to unravel host plant and site dependent distribution patterns. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 75, p. 507-519, 2011.

WICKER, E.; GRASSRT, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M.; PRIOR, P. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 73, n. 21, p. 6790-6801, 2007.

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