

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabucchi
et al. UTILIZANDO MARCADORES AFLP E
AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE DEFESA À MURCHA
BACTERIANA EM *Capsicum* spp. NATIVO

LIANE CRISTINE REBOUÇAS DEMOSTHENES

MANAUS / AM

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL

LIANE CRISTINE REBOUÇAS DEMOSTHENES

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabucchi
et al. UTILIZANDO MARCADORES AFLP E
AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE DEFESA À MURCHA
BACTERIANA EM *Capsicum* spp. NATIVO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Agronomia Tropical da Universidade Federal
do Amazonas, como requisito parcial para a
obtenção do título de *Doctor Scientiae* em
Agronomia Tropical, área de concentração
Fitossanidade.

ORIENTADORA: Jânia Lília da Silva Bentes, Dra.

MANAUS / AM

2013

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Demosthenes, Liane Cristine Rebouças
D387v Variabilidade genética de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabucchi
et al. utilizando marcadores AFLP e avaliação de respostas bioquímicas
de defesa à murcha bacteriana em *Capsicum* spp. nativo / Liane Cristine
Rebouças Demosthenes. - 2013.

67 f. ; 31 cm.

Tese (doutorado em Agronomia Tropical) — Universidade Federal
do Amazonas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Jânia Lília da Silva Bentes.

1. Doenças bacterianas das plantas 2. Murcha bacteriana - Amazônia
3. Pimentão – Resistência a doenças e pragas 4. Solanácea 5. Marcadores
genéticos I. Bentes, Jânia Lília da Silva, orientador II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

CDU (2007): 632.9(811)(043.2)

LIANE CRISTINE REBOUÇAS DEMOSTHENES

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabucchi
et al. UTILIZANDO MARCADORES AFLP E
AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE DEFESA À MURCHA
BACTERIANA EM *Capsicum* spp. NATIVO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Agronomia Tropical da Universidade Federal
do Amazonas, como requisito parcial para a
obtenção do título de *Doctor Scientiae* em
Agronomia Tropical, área de concentração
Fitossanidade.

Aprovada em 17 de dezembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dra. Jânia Lília da Silva Bentes
Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto
Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Prof. Dr. Rogério Eije Hanada
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA



Prof.^a. Dra. Maria Teresa Gomes Lopes
Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Prof.^a. Dra. Solange de Melo Vêras
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

“Entrega teu caminho ao Senhor, confia Nele e o mais Ele fará.”

Sabedoria 6, 12.

Aos meus pais, Lionel e Mara, grata pelo amor, dedicação, apoio e incentivo na busca do conhecimento.

Ofereço

Aos meus filhos Felipe, Jamilly e João Antonio, pelo apoio. Vocês são os meus maiores presentes, a minha maior vitória, a razão da minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus que é o Senhor da vida e da misericórdia.

A meus filhos, e aos meus pais que me apoiaram e acompanharam durante toda a realização desse trabalho, sempre compreensivos, companheiros e carinhosos.

A Universidade Federal do Amazonas e Faculdade de Ciências Agrárias pela oportunidade e infraestrutura que permitiram a realização desse trabalho.

À minha orientadora Dra. Jânia Lília da Silva Bentes, amiga, mestra, exemplo de competência, seriedade, dedicação, aquela que me fez chegar a este patamar profissional, a que foi minha inspiração para a pesquisa e sustento nos momentos de dificuldades.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Pedro de Queiroz Costa Neto, pelo incentivo, por todos os ensinamentos, pela dedicação, pelas sugestões ao trabalho, pela companhia nos dias de rodar placas, e por tantas aulas e esclarecimentos.

Ao Professor Fabrício Ávila Rodrigues e Francisco Xavier Ribeiro do Vale, da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos e sugestões ao trabalho por ocasião da qualificação.

Aos professores José Ferreira da Silva, por ceder a casa de vegetação, Maria Teresa Gomes Lopes, pelas análises estatísticas, e Renato Cavalazzi pelo auxílio nos testes enzimáticos, e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical pelos valiosos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia – FCA, Francy Mary Galúcio Souza, Ana Francisca Tibúrcia Ferreira e Ferreira, João Vítor Camargo Soares, por todo apoio, amizade, sugestões e colaborações durante a realização deste trabalho. As amigas que me ajudaram em outras fases do trabalho e me deram apoio, Lucyanna Coelho, Magna Araújo e Mylla Perdigão. A pesquisa termina a amizade perdura.

Agradeço

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO DE LITERATURA	4
1.1 O Gênero <i>Capsicum</i>	4
1.2 Estudos de resistência em <i>Capsicum</i>	4
1.3 Murcha bacteriana	6
1.4 <i>Ralstonia solanacearum</i>	6
1.5 Sintomatologia	8
1.6 Epidemiologia	8
1.7 Controle	9
1.8 Marcadores Moleculares	10
1.9 Marcador AFLP	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. Referências	16
CAPÍTULO I – Diversidade genética de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> da área metropolitana de Manaus utilizando marcadores moleculares AFLP	23
1. Introdução	25
2. Material e Métodos	26
3. Resultados	33
4. Discussão	36
5. Conclusão	40
6. Referências	40
CAPÍTULO II – Resistência e respostas de defesa bioquímica em acessos nativos de <i>Capsicum</i>	44
1. Introdução	46
2. Material e Métodos	48

3.	Resultados e Discussão	54
4.	Conclusão	63
5.	Agradecimentos	64
7.	Referências	64

Variabilidade genética de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabucchi et al. utilizando marcadores AFLP e avaliação de respostas bioquímicas de defesa à murcha bacteriana em *Capsicum* spp. nativo.

Resumo

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* é uma das doenças mais importantes das solanáceas. Presente em todo o território nacional, causa murcha rápida das plantas e afeta várias culturas de interesse agrônômico. No Amazonas, as condições de altas temperatura e umidade do ar aliados à ampla diversidade genética deste patógeno, diversidade de hospedeiros e agressividade favorecem o desenvolvimento do patógeno e dificultam o manejo desta doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de *R. solanacearum* utilizando marcadores AFLP e avaliar as respostas bioquímicas de defesa apresentadas por acessos de *Capsicum* spp. nativos da região Amazônica, verificando a expressão de proteínas relacionadas com a patogênese, decorrentes da infecção pelo patógeno. Foram realizadas coletas em quatro municípios produtores de hortaliças da área metropolitana de Manaus para estabelecer uma coleção com 30 isolados do patógeno. Foi realizada a caracterização bioquímica clássica dos isolados, testes de patogenicidade e caracterização da diversidade genética utilizando marcadores moleculares AFLP. Foram testadas 24 combinações de primers e selecionadas as seis combinações mais informativas. As seis combinações de primers utilizadas apresentaram um total de 432 bandas, variando de 47 loci à 103 na combinação E+AT/M+C. O coeficiente de similaridade de Jaccard estimado entre os 30 isolados avaliados variou de 0,01 à 0,98. A partir da matriz de similaridade foi gerado o dendrograma pelo método UPGMA sendo possível separar os isolados em seis grupos com coeficiente de correlação cofenética no valor de $r = 0,98$. Também foram avaliadas as respostas de defesa apresentadas por acessos de *Capsicum* spp. através de métodos bioquímicos de determinação de proteínas totais, atividade da fenilalanina amônia liase, atividade de fenoloxidasas e peroxidases. A atividade enzimática variou conforme o nível de resistência

dos acessos avaliados, sendo maior nas primeiras horas após a inoculação e decrescendo após 72 horas. Foi possível identificar dois acessos resistentes (BC 05 e NT) que apresentaram média de notas de 1,17 e 0,94. O acesso BC apresentou a resistência dos acessos foi associada com a maior atividade da PPO e FAL, indicando que estas enzimas compõem o mecanismo de defesa em plantas de *Capsicum*. A atividade da POX foi menor quando comparada com a atividade da PPO e FAL.

Palavras chave: Murcha bacteriana, atividade enzimática, resistência

Genetic variability of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabucchi et al. using AFLP markers and evaluation of biochemical defense responses to bacterial wilt in native *Capsicum* spp.

Abstract

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most important diseases of solanaceous. Present in all national territory, causes rapid wilting of plants and affects several crops of agronomic interest. In Amazonas, the high temperature and humidity combined with the genetic diversity of this pathogen diversity of hosts favor the development and aggressiveness of the pathogen and complicate the management of this disease. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of *R. solanacearum* using AFLP markers and evaluate defense responses submitted by *Capsicum* spp. natives of the Amazon region, verifying the expression of pathogenesis-related proteins, resulting from infection by the pathogen. Samples were collected in four counties vegetable growers in the metropolitan area of Manaus to establish a collection of 30 isolates of the pathogen. We performed classical biochemical characterization of the isolates and characterization of genetic diversity using AFLP molecular markers. The 24 primer combinations were tested and selected the six best informative combinations. The six combinations of primers generated a 432 bands, ranging from 47 to 103 loci in the combination E + AT / M + C. The Jaccard similarity coefficient estimated between 30 isolates ranged from 0.01 to 0.98. From the similarity matrix a dendrogram was generated by UPGMA method being possible separate the isolates into six groups with cophenetic correlation coefficient of $r = 0.98$. The defense response submitted by *Capsicum* spp. were also evaluated by biochemical methods for the determination of total protein, phenylalanine ammonia lyase activity and peroxidase activity phenoloxidases. The enzymatic activity varied according to the level of resistance of the evaluated accessions, being higher in the first hours after inoculation and decreased after 72 hours. It was possible to identify two resistant accessions (BC 05 and NT) showed that grade point average of 1.17

and 0.94 . The BC had access resistance of accessions was associated with increased activity of PPO and FAL, indicating that these enzymes make up the defense mechanism in plants of *Capsicum*. The POX activity was lower when compared with the activity of PPO and FAL .

Keywords: bacterial wilt, enzymatic activity, resistance

INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabucchi et al. (1995) já foi relatada em cerca de 450 espécies de plantas cultivadas e silvestres, pertencentes a mais de 50 famílias botânicas (XU et al., 2009). É considerada uma das mais importantes bactérias fitopatogênicas e um fator limitante na produção de várias culturas em todo o mundo (HAYWARD, 1991; GENIN e BOUCHER, 2002). A doença se caracteriza pela murcha da planta, em razão da oclusão de vasos pela rápida multiplicação da bactéria nos vasos do xilema, que restringe o transporte de água no interior da planta, sendo favorecida por condições de alta umidade e temperaturas, chegando a inviabilizar o cultivo de diversas espécies em regiões de clima temperado quente, tropical ou subtropical (HAYWARD, 1991).

Dentre as várias culturas agrícolas hospedeiras de *R. solanacearum* as olerícolas representam um grupo importante de hospedeiros, entre as quais o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* M.), o pimentão (*Capsicum annuum* L.), a pimenta-de-cheiro (*C. chinense* Jack), a pimenta malagueta (*C. frutescens* L.), a berinjela (*Solanum melongena* L.), o pepino (*Cucumis sativus* L.), a batata (*Solanum tuberosum* L.) (HAYWARD, 1994; LOPES E TAKATSU, 1997; COELHO NETTO et al., 2004; MIRANDA et al., 2004), além de outras culturas como o tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), a banana (*Musa* sp.) e helicônias (*Heliconia* sp.) (NORMAN et al., 2009). No Amazonas, a doença afeta principalmente as solanáceas e as

bananeiras, mas também já foi relatada em outras espécies como a helicônia (*Heliconia* sp.), moringa (*Moringa oleifera* Lam.), *Melanthera discoidea* e *Coleus barbatus* (COELHO NETTO et al., 2001; COELHO NETTO e ASSIS, 2002).

O pimentão é uma olerícola muito apreciada pela população brasileira e muito cultivada em todo o país. A área cultivada o pimentão ocupa cerca de 13 mil hectares, com uma produção de quase 290 mil toneladas de frutos, sendo São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Rio de Janeiro os principais Estados produtores (RIBEIRO e CRUZ, 2003; MAROUELLI e SILVA, 2012). No Amazonas, a produção está concentrada principalmente nas áreas de terra firme, produzida por pequenos produtores em sistema de cultivo protegido, ou pela agricultura familiar. Os dados do IDAM apontam para uma produtividade de cerca de seis toneladas de frutos no ano de 2012 (Amazonas, 2012), uma quantidade que poderia ser maior não fossem as perdas em virtude da ocorrência de pragas e doenças que limitam esta atividade agrícola no Estado.

O Amazonas possui uma diversidade de espécies do gênero *Capsicum* que estão sendo estudadas quanto às suas características agronômicas (FONSECA et al., 2008) e resistência à doenças. Demosthenes e Bentes (2011) avaliaram 22 acessos de *Capsicum* spp., incluindo pimentas e pimentões comerciais e nativos da região Amazônica, em casa de vegetação e verificaram que existe variabilidade genética entre os acessos nativos de *Capsicum* spp. e identificaram três acessos como resistentes à murcha bacteriana, indicando que espécies nativas podem constituir uma alternativa para os programas de melhoramento genético em *Capsicum* nesta região, principalmente por serem espécies já adaptadas às condições de clima e solo da região Amazônica.

Considerando o registro de ocorrência da murcha bacteriana em vários locais produtores de pimentão no Amazonas, a importância sócio-econômica da cultura e a dificuldade em superar os danos provocados pela doença aos produtores da região, este

patossistema, pimentão-*R. solanacearum*, necessita de estudo constante para se obter estratégias mais eficientes no controle da doença no Amazonas.

O conhecimento da diversidade genotípica desta bactéria, e os vários fatores epidemiológicos que contribuem para o agravamento da doença no campo são pontos importantes para esclarecer os eventos envolvidos nesta interação patógeno hospedeiro, permitir a redução de custos de produção e aumentar a produtividade do pimentão na nossa região. Em razão da complexidade de *R. solanacearum*, o conhecimento da diversidade genética de isolados oriundos da região Amazônica, visa esclarecer os locais de ocorrência e a diversidade genética associada a esses locais, informações que são relevantes para os programas de melhoramento que visam a busca de cultivares resistentes.

A identificação dos aspectos envolvidos na resistência à murcha bacteriana em pimenteiras, como a atividade de enzimas de defesa, são de fundamental importância, pois permitem conhecer de que maneira as plantas resistentes mobilizam seus mecanismos de defesa em resposta ao ataque por este patógeno e assim buscar práticas de manejo mais eficientes, buscando uma agricultura menos dependente de agrotóxicos, mais produtiva e mais lucrativa.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O gênero *Capsicum*

O gênero *Capsicum* é composto por 31 espécies, sendo cinco domesticadas (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescense* e *C. pubescens*), e as demais classificadas como semidomesticadas e silvestres. Tem sua origem na América Central e, dentre as espécies domesticadas, a *C. chinense* é a mais difundida na América do Sul, onde aparece entre as espécies mais consumidas no Brasil. A diversidade biológica e variabilidade genética desta espécie pode ser percebida principalmente pela variabilidade nos tamanhos, cores, formatos e pungência nos frutos (LANNES et al. 2007; FONSECA et al., 2008), juntamente com a espécie *C. annuum* que é a mais cultivada e também apresenta ampla variabilidade genética.

O gênero *Capsicum* apresenta importância sócio econômica por ser uma olerícola tradicionalmente presente na alimentação dos brasileiros. Existem relatos não apenas do consumo *in natura*, mas também como condimento e medicinal. Estudo da Associação Brasileira do Comércio de Mudas e Sementes (ABCSEM) do ano de 2010/2011 apresentou o pimentão entre as dez hortaliças de maior importância no comércio agrícola brasileiro, representando uma produção de 248,7 mil toneladas representando cerca de 600 milhões de reais anuais no atacado (ABCSEM, 2011; CARVALHO, 2013).

1.2 Estudos de resistência em *Capsicum*

Em razão da representatividade desta solanácea a busca por fontes de resistência para serem utilizadas no controle de doenças para esta cultura incluem pesquisas desde o início da década de 60. Em se tratando das linhagens de *Capsicum*, estas têm sido extensamente

investigadas quanto à sua resistência aos mais variados patógenos. Os primeiros relatos de busca por fontes de resistência em *Capsicum* no mundo iniciam com Kimble e Grogan (1960) que identificaram as primeiras fontes de resistência a *Phytophthora capsici* Leonian nas linhagens PI 201232 e PI 201234 da América Central. No Brasil, o início das pesquisas por fontes de resistência em *Capsicum* foram realizadas pelo pesquisador Hiroshi Nagai, na década de 60, que testou 45 acessos de pimentão e 46 de pimentas buscando criar variedades resistentes ao mosaico e identificou três genes que conferiam resistência aos grupos “n” e “w” do vírus Y em variedades de *C. annuum*. Neste trabalho o autor combinou fontes de resistência que possibilitou a criação de novas variedades (Agrônômico 7 e Agrônômico 8) imunes ao mosaico (NAGAI, 1968).

Mais recentemente, Lima (2004) avaliou a resistência ao oídio (*Oidiopsis taurica* (Lev.) Salmon) dentre 104 genótipos do germoplasma da Embrapa Hortaliças selecionados em casa de vegetação e telado. Os genótipos das espécies de *C. annuum* (CNPB 1424); *C. baccatum* (CNPB 39, CNPB 161 e CNPB 672); *C. frutescens* (CNPB 596, CNPB 597 e CNPB 579) e *C. chinense* (CNPB 55, CNPB 289, CNPB 434 e CNPB 600) foram as melhores fontes de resistência ao oídio.

Lopes e Boiteux (2004) avaliaram 23 acessos de *Capsicum* quanto à resistência à murcha bacteriana em casa de vegetação por meio da inoculação de isolados das biovars 1 e 3 de *R. solanacearum* e constataram diferenças entre os acessos testados e entre as biovars dos isolados. Os isolados da biovar 1 provocaram poucos ou nenhum sintoma de murcha nos genótipos avaliados, sendo fracamente agressivos na cultivar suscetível Magda. Os acessos CNPB 970 (*C. chinense*) e CNPB 1397 (*C. baccatum*) apresentaram resistência específica à isolados da biovar 1 mas foram altamente suscetíveis à isolados da biovar 3.

Demosthenes e Bentes (2011) avaliaram 22 acessos de *Capsicum* spp., incluindo pimentas das espécies *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* nativos da região Amazônica e

pimentões comerciais, comumente utilizados pelos produtores locais, em casa de vegetação e verificaram que existe variabilidade genética entre os acessos nativos de *Capsicum* spp. Os acessos 20, 30 e 17 como resistentes à murcha bacteriana com valores de AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença) de 261, 233 e 241,6 respectivamente.

1.3 Murcha bacteriana

A murcha bacteriana foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos da América, em 1896, por Erwin F. Smith, afetando batata, tomate e berinjela (HAYWARD, 1994). No Brasil, em 1922, Von Parseval relatou o primeiro caso desta doença atacando fumo (*Nicotiana tabacum* L.). A murcha bacteriana é a principal doença vascular de plantas cultivadas em todo o mundo devido à capacidade de adaptação desta bactéria aos climas temperados, tropical e subtropical, e à sua versátil adaptação aos variados nichos ecológicos como solo, água, rizosfera de plantas não hospedeiras, e xilema de hospedeiros (LEBEAU et al., 2011; XUE et al., 2011).

Essa doença se caracteriza pela perda de turgescência dos tecidos foliares de ramos mais suculentos, em razão da oclusão de vasos que restringem o transporte de água no interior da planta. Elevadas temperaturas e umidade favorecem a infecção e chegam a inviabilizar o cultivo de diversas espécies em regiões de clima temperado quente, tropical ou subtropical (HAYWARD, 1991). Em pimentas, a murcha bacteriana é causada pela raça 1 predominantemente por estirpes das biovars 1 e 3 de *R. solanacearum*.

1.4 *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum é uma bactéria gram-negativa, móvel por um ou mais flagelos, bastonetiforme, aeróbica, oxidase e catalase positiva, que acumula grânulos de poli- β -hidroxibutirato. As colônias são não-fluorescentes em meio complexo. A maioria das estirpes produz nitrito a partir de nitrato, exceto aquelas da biovar 2 (BUDDENHAGEN e KELMAN, 1964; MOMOL et al., 2001; EPPO, 2004).

É um patógeno complexo que apresenta ampla variabilidade patogênica, genética e fisiológica, além de extensa gama de hospedeiros, distribuição geográfica, agressividade e adaptação à diversas temperaturas (WICKER et al., 2007). Apresenta um genoma de 5,8 megabases (Mb) organizados em dois replicons circulares sendo um cromossomo de 3,7 Mb e um megaplasmídeo de 2,1 Mb (SALANOUBAT et al., 2002).

Tradicionalmente é classificada por raças em relação à espécie hospedeira, e por biovars conforme a habilidade de utilizar ou oxidar determinados açúcares e álcoois (HAYWARD, 1994). Fegan e Prior (2005) após estudos moleculares analisando as sequências da região espaçadora intergênica ITS 16S-23S e dos genes *egl*, *hrpB* e *mutS* propuseram uma nova classificação em filotipos, sequevares e clones. Neste novo tipo de classificação, o tamanho da região ITS vai determinar o filotipo, que está relacionado à origem geográfica do patógeno e cada filotipo está composto por sequevares, estirpes com sequência altamente conservada dentro da região sequenciada.

A bactéria penetra no hospedeiro através de ferimentos nas raízes, coloniza o córtex e avança em direção aos vasos do xilema onde se prolifera rapidamente (LEBEAU et al., 2011). As estirpes agressivas produzem grande quantidade de exopolissacarídeos (EPS) que contribuem para a agregação de células bacterianas e podem causar a oclusão dos vasos impedindo o fluxo de água para as folhas e causando a murcha da planta (RAHMAN et al., 1999; MOMOL et al., 2001; MUKAIHARA E TAMURA, 2009). A produção de exopolissacarídeo I (EPS I) é um dos principais fatores de virulência desta bactéria. Bactérias que perdem a capacidade de produzir EPS raramente provocam murcha e morte das plantas. Outro fator de virulência é a produção de exoproteínas utilizando o sistema de secreção Tipo II e Tipo III, através do qual essas proteínas são excretadas do seu citoplasma para o meio externo.

Como exemplo dessas proteínas temos a produção de enzimas pectinolíticas: uma pectina metil-esterase (Pme) e três poligacturonases (Pg1A, PehB, PehC) que estão envolvidas na quebra de componentes pécnicos da parede celular das plantas e convertê-las em substrato para a bactéria; duas glucanases extracelulares (Egl e CbhA) que estão envolvidas na quebra de ligações β -1-4 glicosídicas da celulose da parede celular das plantas facilitando a invasão e colonização do tecido parenquimático; e a proteína Tek, sua função está associada ao EPS I, relacionada com a patogenicidade da bactéria, mas com função ainda não tão bem esclarecida (SCHELL, 2000).

1.5 Sintomatologia

O sintoma inicial da murcha bacteriana em plantas de pimentão e tomate é a murcha das folhas mais novas de algumas hastes nas horas mais quentes do dia seguido pela sua recuperação à noite e nas primeiras horas da manhã. Em condições favoráveis de alta temperatura e umidade, e hospedeiro suscetível, a murcha completa da planta ocorre em alguns dias. Em geral, as folhas mantêm sua coloração verde e permanecem aderidas aos ramos com o progresso da doença. O tecido vascular da parte inferior do caule de plantas murchas apresenta coloração marrom e exsudação de células (LOPES e ÁVILA, 2003). Plantas afetadas pela murcha bacteriana não somente murcham, mas também apresentam epinastia de folhas, formação de raízes adventíceas, indicando uma possível interferência com o balanço de auxina, e ainda nanismo, amarelecimento das folhas murchas e, às vezes, estrias escuras ao longo do caule e pecíolos (BUDDENHAGEN e KELMAN, 1964; BRINGEL, 2002).

1.6 Epidemiologia

Dentre os aspectos epidemiológicos da murcha bacteriana, revestem-se de importância a temperatura e umidade elevada, sobrevivência do patógeno em áreas infestadas, em plantas daninhas e a forma de disseminação. Pesquisas indicam que a gama de hospedeiros afetados

por esta bactéria está aumentando (WICKER et al., 2007), e sugerem que esta tendência evolutiva leva à um forte potencial adaptativo que pode estar relacionado à transformação mediada pela transferência horizontal de genes durante o processo de colonização da planta (COUPAT et al., 2008). Contaminação planta-a-planta também pode ocorrer quando as bactérias se movem a partir de raízes de plantas infectadas ou de plantas daninhas para as raízes de plantas saudáveis vizinhas (CHAMPOISEAU, 2009).

A contaminação de campos saudáveis por meio de transferência da água de escoamento superficial após irrigação ou chuva pode ocorrer, como também o inverso, ou seja a disseminação do patógeno a partir de lagoas ou rios infectados para áreas saudáveis por meio de cursos de água (CHAMPOISEAU, 2009). A disseminação através de plantas aquáticas hospedeiras de *R.solanacearum* também já foi relatada. Na Europa, a erva daninha semi-aquática *Solanum Dulcamara* infectada com *R. solanacearum* raça 3 biovar 2 tem papel importante na propagação do patógeno, liberando bactérias em fontes de água de irrigação (CHAMPOISEAU, 2009).

1.7 Controle

O sucesso no manejo da murcha bacteriana depende, entre outros fatores, da variante do patógeno no local, modos de sobrevivência, tratos culturais, condição ambiental e grau de resistência da cultivar (HAYWARD, 1991). A utilização de plantas resistentes, quando houver cultivares disponíveis, é o melhor método de controle principalmente quando associado à outras práticas culturais (LOPES E QUEZADO DUVAL, 2007).

Quando a área já apresenta histórico da doença a melhor estratégia é a combinação de várias medidas, ou seja, o uso da estratégia do controle integrado, adotando práticas complementares como: plantio em áreas sem histórico da doença; preferir áreas sem plantio anterior de solanáceas; preferir solos bem drenados; utilizar sementes ou mudas saudáveis; fazer adubação e calagem balanceadas, baseadas em análise de solo; fazer o manejo correto da

irrigação e evitar o escoamento entre plantas ou entre lavouras; reduzir o trânsito de pessoas e tratores entre áreas contaminadas; e utilizar a rotação de culturas preferencialmente com gramíneas (GOTO, 1992; HAYWARD, 1994; LIMA NETO, 2005; LOPES e QUEZADO DUVAL, 2007; LOPES, 2009).

Em Roraima, Lima et al. (2010) avaliaram 10 cultivares de tomate num período de dois anos em campo de produção naturalmente infestado com a biovar 1 de *R. solanacearum* e detectaram que apenas uma das cultivares avaliadas, “Majestade”, apresentou resistência moderada à murcha bacteriana, podendo ser recomendada para uso em cultivo comercial no Estado de Roraima, no entanto os autores citam que a utilização desta cultivar sem outras medidas de controle associadas não garantirá o controle adequado da doença no campo.

1.8 Marcadores Moleculares

A diversidade genética geralmente tem sido estudada dentro de espécies, medindo tanto as diferenças entre indivíduos, quanto aquelas entre populações naturais (BORÉM e CAIXETA, 2009). A utilização dos marcadores moleculares permitem detectar diferenças na constituição do DNA, RNA ou de determinadas proteínas vêm sendo cada vez mais utilizadas, pois possuem ampla aplicação e forte poder de detecção de variabilidade entre indivíduos ou populações, em virtude disto se prestam para estudos de genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética (LOPES et al., 2003; FALEIRO, 2007; BORÉM e CAIXETA, 2009). Um marcador molecular é definido como “qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA” (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998). Quanto ao princípio da análise desses marcadores todos têm em comum que marcadores comuns aos indivíduos significam semelhança genética e marcadores não comuns significam diferenças genéticas (FALEIRO, 2007). Na definição do marcador a ser utilizado deve-se considerar o objetivo do estudo, em geral, marcadores multilocos utilizados em análises genômicas, como por exemplo AFLP (*Amplified Fragment*

Length Polymorfism), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites e minissatélites são mais apropriados para estudos de identidade genética e estudos de variabilidade dentro da mesma espécie (FALEIRO, 2007).

A utilização de métodos moleculares tem sido largamente empregada para avaliação da variabilidade genética em *R. solanacearum*, entre os quais: RAPD, análise do DNA ribossomal; e rep-PCR (repetitive-PCR) (GILLINGS e FAHY, 1993; CRUZ et al., 2002).

Xue et al. (2011) analisaram a variabilidade genética entre 319 isolados de *R. solanacearum* de várias províncias Chinesas através de PCR-BOX para verificar a influência do local e hospedeiro na variabilidade genética da bactéria. Os autores conseguiram detectar uma elevada variabilidade genética das estirpes pertencentes ao filotipo II onde puderam ser distinguidos 29 grupos com 75% de similaridade entre si. O grupo que agregou a maioria dos isolados, cerca de 130, era composto de isolados de cinco províncias diferentes. Outro grupo agregou os isolados de solanáceas, entre elas pimentão, tomate e berinjela. Vinte dentre os 29 grupos formados continham somente isolados da mesma espécie de planta evidenciando a capacidade desta bactéria em se adaptar ao hospedeiro.

Costa et al. (2007), avaliaram a diversidade entre 70 isolados de *R. solanacearum* de vários hospedeiros e localidades da Amazônia brasileira, utilizando PCR-BOX, encontraram um nível de similaridade de 23% entre os isolados e a formação de cinco grupos. Horita et al. (2010) estudaram 188 isolados de *R. solanacearum* coletados em plantas de batata do Japão e verificaram, utilizando PCR-Rep, que todas as estirpes obtidas pertenciam ao filotipo I ou IV, apresentando homogeneidade entre os perfis do gene da endoglucanase, no entanto, os autores também detectaram um filotipo IV extra que apresentou um perfil diferente do gene da endoglucanase, mais similar aqueles de isolados provenientes da Filipinas e Indonésia. Os autores confirmaram que existe uma forte correlação genética entre as estirpes de *R. solanacearum* do Japão e estirpes da Ásia nos filotipos I e IV.

Yzadiyan e Taghavi (2011) em estudo onde verificaram a variabilidade genética entre 170 isolados obtidos de batata e tomate de várias localidades do Iran através de PCR multiplex e concluíram que os isolados pertencem ao filotipo II. Foram divididos em dois grupos: o primeiro com 146 isolados da raça 3, biovar 2; e o segundo com isolados da biovar N2. Foi sugerido que os isolados da biovar N2 estão mais adaptados às regiões de baixa temperatura e, por isso, são encontrados em áreas limitadas e mais semelhantes geneticamente entre si.

1.9 Marcador AFLP

O marcador AFLP (VOS et al., 1995) é um dos marcadores moleculares desenvolvido para avaliar a variabilidade genética em plantas e também utilizado para avaliar a variabilidade genética em fitopatógenos, que combina as vantagens do RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism* e RAPD (AVROVA et al, 2002; DINI-ANDREOTE, 2009; MAYER et al., 2010; BENTES e COSTA NETO, 2011). Os estudos com esses marcadores buscam mensurar a diversidade genética geralmente dentro de espécies, medindo tanto as diferenças entre indivíduos, quanto as diferenças entre populações (MAYER et al., 2010; HABIBI, et al., 2012).

A técnica baseia-se na amplificação, via PCR, de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição que o clivam em sítios específicos de corte raro e frequente (VOS et al., 1995; FERREIRA e GRATAFALIA, 1996;). O número de bandas polimórficas resultantes no gel nesta técnica é determinado pela complexidade do genoma analisado e pelo número de nucleotídeos adicionados nas bases seletivas escolhidas (LIN et al., 1996).

A vantagem da utilização do marcador AFLP na caracterização das populações microbianas é a extensa cobertura do genoma em estudo, o grande número de bandas simultaneamente analisadas em um único gel, o poder de detecção de variabilidade genética, que explora simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição,

altamente eficiente na amostragem ampla e simultânea de um genoma, e não exige conhecimento prévio de sequências do genoma (VOS et al., 1995; POWEL et al., 1996; KISHI et al., 2008). Em razão de seu alto valor informativo e reprodutibilidade o marcador AFLP tem sido muito útil em estudos filogenéticos e discriminação de espécies (BUHARIWALA et al., 2005; BORÉM E CAIXETA, 2009). Para genomas de bactérias, a técnica de AFLP tem sido utilizada em estudos de taxonomia (VANEECHOUTTE et al., 1996), em estudos de variabilidade entre e dentro de populações (YU et al., 2003) e caracterizações em nível de patovar (MAYER et al., 2010; HABIBI et al., 2012).

Kositratana et al. (2002) estudaram a variabilidade genética de *R. solanacearum*, utilizando marcadores AFLP, isolados de diversos hospedeiros na Malásia e Tailândia e encontraram um nível de similaridade de 30% entre as estirpes desses países. Verificaram ainda a separação em três grupos que foram correlatos às biovars das estirpes.

Yu et al. (2003), utilizaram marcadores AFLP para verificar, em duas análises separadas, a variabilidade genética entre 28 estirpes de *R. solanacearum* obtidos de cinco espécies de hospedeiros de vários locais do mundo, e entre 55 estirpes de *R. solanacearum* obtidas de plantas de gengibre oriundas de três campos de produção do Havaí. Na análise entre as 28 estirpes foi demonstrada a formação de grupos correlatos com as hospedeiras e o grupo contendo estirpes de gengibre apresentaram pouca similaridade com as estirpes obtidas de helicônia e banana. Quando consideraram a análise somente de estirpes de gengibre do Havaí os autores detectaram grande variabilidade genética e obtiveram a formação de quatro grupos sem correlação com o campo de coleta.

A variabilidade genética e 125 isolados de *R. solanacearum* foi estudada por Jeong et al. (2007), sendo 109 de províncias da Coreia e 16 de outras localidades do mundo através de marcadores moleculares AFLP e obtiveram 110 bandas polimórficas. A análise do dendrograma obtido indicou a existência de dois grandes grupos, no qual o primeiro agrupou

todos os isolados Coreanos, quatro isolados do Japão e um da Guiana, enquanto o segundo agrupou os demais isolados. Os da Coreia foram subdivididos em seis grupos com 62% de correlação entre si, no entanto, não foi possível correlacionar a diversidade genética entre os isolados com sua origem geográfica, hospedeiro ou biovar.

Mayer et al. (2010) também utilizaram marcadores moleculares AFLP para estimar a variabilidade genética entre 14 estirpes de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* e sete estirpes de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* de 10 diferentes Estados do Sul e Sudeste do Brasil. Foram utilizadas sete combinações de *primers*, das quais quatro foram selecionadas por se mostrarem mais eficientes e possibilitaram detectar um alto nível de polimorfismo entre os isolados estudados. As 14 estirpes da patovar *pruni* formaram um único grupo enquanto as estirpes da patovar *phaseoli*, três grupos distintos, confirmando a grande sensibilidade desta técnica para estimar a variabilidade entre espécies de genoma muito similar.

Bentes e Costa Neto (2011), utilizando esta mesma técnica, analisaram a variabilidade genética entre 20 isolados de *Colletotrichum guaranicola* provenientes de diversas localidades do Amazonas e obtiveram 97 bandas polimórficas. Os autores puderam separar os isolados em dois grupos e obtiveram uma similaridade genética de 94,95%.

Habibi et al. (2012) estimaram a variabilidade genética entre 38 estirpes de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* da província de Guilan, no Irã, utilizando marcadores moleculares AFLP. Os autores obtiveram 222 bandas polimórficas como produto dos 12 *primers* utilizados e verificaram que as estirpes foram divididas em três grupos distintos com 70% de similaridade entre si. Houve alta correlação entre isolados obtidos das panículas de viveiros enquanto os isolados obtidos do campo apresentaram menor correlação. Os autores também puderam confirmar que o marcador AFLP foi eficiente em detectar a variabilidade genética entre e dentro as populações de isolados obtidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a variabilidade genética de isolados de *R. solanacearum* utilizando marcadores moleculares AFLP e respostas enzimáticas de defesa apresentadas por acessos de *Capsicum* spp. nativos da região Amazônica à murcha bacteriana.

2.2 Objetivos específicos

Estudar a variabilidade genética de isolados de *R. solanacearum* utilizando marcadores moleculares AFLP e correlacionar com a distribuição geográfica;

Avaliar a atividade enzimática de polifenolxidase, peroxidase e fenilalanina amônia liase relacionadas à defesa dos acessos de *Capsicum* spp. à murcha bacteriana.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAZONAS. Secretaria de Estado de Produção Rural. Instituto de Desenvolvimento Agropecuário do Amazonas. **Relatório de Atividades do IDAM** (Quadro consolidado por atividade e produto) – Jan-Dez/2012. Manaus, IDAM, 2012. 102 p.

ABCSEM. Associação Brasileira do Comércio de Mudas e Sementes. Projeto para o levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil 2010/2011. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/dadosdosegmento.php>. Acesso em 18 de outubro de 2013.

AVROVA, A.O.; HYMAN, L.J.; TOTH, R.L.; TOTH, I.K. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 68, p. 1499–1508, 2002.

BENTES, J.L.S; COSTA NETO, P.Q. Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP. *Acta Amazonica*, v.41, n.2, p. 251-256, 2011.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. 2009. **Marcadores Moleculares**. 2da ed. Viçosa, 2009, 532p.

BUDDENHAGEN, I.; KELMAN, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 2, p. 203-231, 1964.

BUHARIWALLA, H.K.; SRILAKSHMI, P.; KANNAN, S.; KANCHI, R.S.; CHANDRA, S.; SATYPRASAD, K.; WALIYAR, F; THAKUR, R.P.; CROUCH, J.H. Analysis of *Trichoderma* spp. From India compared with sequence and morphological-based diagnostics. **Journal of phytopathology**, v. 153, p. 389-400, 2005.

GENIN, S.; BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum*: Secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, p. 111-118, 2002.

GENIN, S.; DENNY, T.P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, p. 67-89, 2012.

CARVALHO, C. Anuário Brasileiro de Hortaliças 2013. Santa Cruz do Sul: ed. Gazeta Santa Cruz, 88p, 2013.

CHAMPOISEAU, P. G., JONES, J. B., AND ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2009-0313-01-RV, 2009.

COELHO NETTO, R. A.; NODA, H; BOHER, B. *Melanthera discoidea*: Um novo hospedeiro de *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n.4, p.781, 2001.

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

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.

COUPAT, B., CHAUMEILLE-DOLE, F., FALL, S., PRIOR, P., SIMONET, P., NESME, X. AND BERTOLLA, F. Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 14–24, 2008.

DEMOSTHENES, L.C.R.; BENTES, J.L.S. Fontes de resistência à murcha bacteriana em germoplasma de *Capsicum* spp. **Acta Amazonica**, v. 41, n.2, p. 251-256, 2011.

DINI-ANDREOTE, F.; PIETROBON, V.C.; ROMÃO, A.S.; SPOSITO, M.B.; ARAÚJO, W.L. 2009. Genetic variability of Brazilian isolates of *Alternaria alternata* detected by AFLP and RAPD techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 670-677, 2009.

EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Diagnostic protocols for regulated pests – Ralstonia solanacearum*. Boletim v. 34, p. 173-178, 2004.

FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C., eds. **Bacterial wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex**. Saint Paul, MN, USA. APS Press, 449-461, 2005.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FONSECA, R.M.; LOPES, R.; BARROS, W.S.; LOPES, M.T.G.; FERREIRA, F.M.; Morphologic characterization and genetic diversity of *Capsicum chinense* Jacq. accessions along the upper Rio Negro – Amazonas. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p. 187-194, 2008.

GILLING, M.; FAHY, P. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* biovars 2 and N2 assessed using restriction endonuclease analysis of total genomic DNA. **Plant Pathology**, v.42, p.744-753, 1993.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. 342 p.

HABIBI, R.; KAZEMPOR, M.N.; ELAHINIA, A.; RABIEI, B.; EBADI, A. A. Differentiation by simplified AFLP of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates from fields, panicles and nurseries of the Guilan Province – Iran. **Journal of plant Protections Research**, v. 52, n. 2, p. 268-274, 2012.

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

HAYWARD, A.C. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In Hayward, A.C.; Hartman, G.L. Eds.). *Bacterial wilt: The disease and its causative agente Pseudomonas solanacearum*. Wallingford. CAB. 95-112, 1994.

HORITA, M.; SUGA, Y.; OOSHIRO, A.; TSUCHIYA, K. Analysis of genetic and biological characters of Japanese potato strains of *Ralstonia solanacearum*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 76, p. 196–207, 2010.

IZADIYAN, M.; TAGHAVI, M. Diversity of Iranian isolates of *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathologia Mediterranea** v. 50, p. 236-244, 2011.

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.

KIMBLE, K.A.; GROGAN, R.G. Resistance to *Phytophthora* root rot in pepper. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 44, n.11, p. 872-873, 1960.

KISHI, L.T.; WICKERT, E.; LEMOS, E.G. de M. Evaluation of *Xylella fastidiosa* genetic diversity by AFLP markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.202-208, 2008

LANNES, S.D.; FINGER, F.L., SCHUELTER, A.R. AND CASALI, V.W.D. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 266-270, 2007.

LEBEAU, A.; DAUNAY, M.-C.; FRARY, A.; FALLOIX, A.; WANG, J.-F.; DINTINGER, J. CHIROLEU, F.; WICKER, E.; PRIOR, P. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: Genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Phytopathology**, v.101, p. 154-165, 2011.

LEMESSA, F.; ZELLER, W. Isolation and characterisation of *Ralstonia solanacearum* strains from *Solanaceae* crops in Ethiopia. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, p. 40–49, 2007.

LIMA NETO, A.F.; Avaliação da resistência de clones e cultivares de batata à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*). 2005. 86f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

LIMA, M. L. P. Estabilidade da resistência de *Capsicum* spp. ao oídio em telado e casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p.519-525, 2004.

LIMA, H.E.; RÊGO, E.R.; CAVALCANTE, G.P.; RÊGO, M.M.; COTA, L.V. Reação em campo à murcha bacteriana de cultivares de tomate em Roraima. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 227-231, 2010.

LIN, J.; JONATHAN, K.; MA, J. A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p.3649–3650, 1996.

LOPES, C.A.; TAKATSU, A. Controle da murcha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 224-225, 1997.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; OLIVEIRA, A. V.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biociência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 64-68, 2003.

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

LOPES, C.A.; BOITEUX, L.S. Biovar-specific and broad-spectrum sources of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in *Capsicum*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 350-355, 2004.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A.M. Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças. In: Zambolim, L.; Lopes, C.A.; Picanço, M.C; Costa, H. **Manejo Integrado de Doenças e Pragas: Hortaliças**. Viçosa: UFV, 2007, 627 p.

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

MAROUELLI, W.A.; SILVA, W.L.C. Irrigação na cultura do pimentão. Circular Técnica 101. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2012.

MAYER, L.; SILVA, W. P.; MOURA, A. B.; VENDRUSCOLO, C.T. AFLP analysis of *Xanthomonas axonopodis* and *Xanthomonas arboricola* strains used in xanthan production studies reveal high levels of polymorphism. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p.741-748, 2010.

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, p. 121-127, 2004.

MOMOL, T.; PRADHANANG, P.; LOPES, C. **Bacterial wilt of pepper**. Fact Sheet PP 189. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, 2001.

MUKAIHARA, T.; TAMURA, N. Identification of novel *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins through translocation analysis of *hrpB*-regulated gene products. **Microbiology**, v.155 , p. 2235-2244, 2009.

NAGAI, H. Obtenção de variedades de pimentão resistentes ao mosaico. **Bragantia**, v. 27, n. 28, p. 311-353, 1968.

NORMAN, D.J.; ZAPATA, M., GABRIEL, D.W.; DUAN, Y. P.;YUEN, J.M.F.; MANGRAVITA-NOVO, A.; DONAHOO, R.S. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. **Phytopathology**, v.99, p. 1070-1077, 2009.

PINHEIRO, C.R.; AMORIM, J.A.E.; DINIZ, L.E.C.; SILVA, A.M.F.; TALAMINI, V.; SOUZA JUNIOR, M.T. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto a filotipos e sequevars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46: 593-602, 2011.

RAHMAN, M.A.; ABDULLAH, H.; VANHAECKE, M. Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annuum* cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, v. 147, p. 129-140, 1999.

RIBEIRO, C.S. DA C; CRUZ, D.M.R. Comércio de sementes de pimentão está em expansão. Apenas o mercado nacional movimentou US\$ 1,5 milhão. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, v. 21, 2003.

SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULT, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J.C.; CATTOLICO, L.; CHANDLER, M.; CHOISNE, N.; CLAUDEL-RENARD, C.; CUNNAC, S.; DEMANGE, N.; GASPIN, C.; LAVIE, M.; MOISAN, A.; ROBERT, C.; SAURIN, W.; SCHIEX, T.; SIGUIER, P.; THÉBAULT, P.; WHALEN, M.; WINCKER, P.; LEVY, M.; WEISSENBACH, J.; BOUCHER, C.A. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, 415: 497-502, 2002.

SCHELL, M. A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory array. **Annual Review Phytopathology**, v. 38, p. 263–292, 2000.

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

VANEECHOUTTE, M. DNA fingerprinting techniques for microorganisms – A proposal for classification and nomenclature. **Molecular Biotechnology**, v.6, p. 115-142 , 1996.

VOS, P.R.; HOGERS, M.; BLEEKER, M.; VAN DE LEE REIJANS, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

XU, J.; PAN, Z.C.; PRIOR, P.; 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, p. 641-653, 2009.

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

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

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, Falleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. Nov. **Microbial Immunology**, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995.

YU, Q.; ALVAREZ, A.M.; MOORE, P.H.; ZEE, F.; KIM, M.S.; DE SILVA, A.; HEPPEL, P.R.; MING, R. Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolated from ginger in Hawaii. **Phytopathology**, v. 93, p. 1124-1130, 2003.

Variabilidade genética de *Ralstonia solanacearum* utilizando marcadores AFLP

(Capítulo redigido conforme as normas de publicação da Revista Acta Amazônica)

Resumo

O marcador AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorfism*) foi utilizado para analisar a variabilidade genética de 30 isolados de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabucchi et al. (1995) provenientes de áreas produtoras de hortaliças dos municípios de Iranduba, Manacapuru, Manaus e Presidente Figueiredo no Estado do Amazonas. Foram testadas 24 combinações de primers e identificadas seis combinações de *primers* que se mostraram eficientes em detectar o polimorfismo genético destes isolados, gerando um total de 432 *loci* polimórficos. Os dados dos perfis eletroforéticos dos marcadores AFLP foram analisados para a similaridade, variando de 47 *loci* à 103 na combinação E+AT/M+C. O coeficiente de similaridade de Jaccard estimado entre os 30 isolados avaliados variou de 0,01 à 0,98. A partir da matriz de similaridade foi gerado o dendrograma pelo método UPGMA utilizando o programa GENES sendo possível separar os isolados em seis grupos com coeficiente de correlação cofenética no valor de $r = 0,98$. genética entre os isolados utilizando o coeficiente de Jaccard. O marcador AFLP mostrou-se como um efetivo marcador molecular capaz de detectar a variabilidade genética entre indivíduos de *R. solanacearum*.

Palavras-chave: murcha bacteriana, pimentão, marcador AFLP

Genetic variability of *Ralstonia solanacearum* with AFLP markers

Abstract

The AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) marker was used to analyze the genetic variability of 30 isolates of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (1995) from vegetable producing areas of regions of Iranduba, Manacapuru, Manaus and Presidente Figueiredo, in Amazonas State. The 24 primer combinations were analyzed and selected the six most informative combinations of primers that were efficient in detecting genetic polymorphism of these isolates, generating a total of 432 polymorphic loci. The data of the electrophoretic profiles of the AFLP markers were analyzed for similarity ranging from 47 to 103 loci in the combination and AT + / M + C. The Jaccard similarity coefficient estimated between isolates 30 reviews ranged from 0.01 to 0.98. From the similarity matrix dendrogram was generated by UPGMA method using the GENES program being possible to separate the isolates into six groups with cophenetic correlation coefficient of $r = 0.98$. gene among the isolates using the Jaccard coefficient . Were identified six primer combinations that were effective in detecting the genetic polymorphism of these isolates and generated a total of 432 polymorphic loci. Data from electrophoretic profiles of AFLP markers were analyzed for genetic similarity among isolates through the Jaccard coefficient. A similarity matrix was analyzed using the UPGMA method using the Genes Software. It was possible to separate the isolates into 6 groups that showed great diversity among the isolates. The AFLP marker proved to be an effective molecular marker capable of detecting genetic variability among individuals of *R. solanacearum*.

Key words: bacterial wilt, pepper, AFLP marker.

1. INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana é uma doença causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabucchi *et al.* (1995), considerada uma das mais importantes bactérias fitopatogênicas (EPPO 2004; Elphinstone 2005; Genin e Denny 2012) de ocorrência mundial que afeta uma ampla gama de espécies de plantas cultivadas, ornamentais e silvestres, pertencentes a mais de 50 famílias botânicas causando grandes perdas econômicas (Hayward 1991; Genin e Boucher 2002; Fegan e Prior 2005; Pinheiro *et al.* 2011; Genin e Denny 2012). Trata-se de uma espécie heterogênea, que apresenta grande diversidade fenotípica e genotípica, refletindo numa ampla variedade de hospedeiros, agressividade e adaptação aos diferentes climas, e que também é frequentemente influenciada pelo genótipo do hospedeiro, *habitat* natural e práticas agrícolas utilizadas (Castillo e Greenberg 2007). Em virtude desta heterogeneidade da espécie, cientistas sugerem um novo conceito, que não se trata de uma espécie, mas sim de um complexo de espécies, que é definido como um conjunto de espécies fortemente relacionadas (Tsuchiya 2004, Fegan e Prior 2005; Genin e Denny 2012).

A bactéria *R. solanacearum* é tradicionalmente classificada em raças, de acordo com a gama de hospedeiros, e em biovars, de acordo com a capacidade de utilizar certos açúcares e álcoois como fontes de carbono (Hayward 1994). No entanto, Fegan e Prior (2005), analisaram a sequência espaçadora intergênica (ITS) 16S-23S e propuseram uma nova classificação hierárquica na qual, a diversidade existente na espécie foi subdividida em quatro níveis taxonômicos: espécie, filotipo, sequevar e clone. A identificação da espécie pode ser feita por *primers* específicos como o OLI1/Y2, (Arahal *et al.* 2004; Pinheiro *et al.* 2011). Os filotipos (grupos genéticos) são determinados por PCR-Multiplex, de acordo com as variações de tamanho da sequência na região ITS. Atualmente, existem quatro filotipos identificados: filotipo I, que agrega as estirpes da Ásia; filotipo II, agrega as estirpes oriundas das Américas; filotipo III, da África; e filotipo IV da Indonésia, Austrália, Japão e Filipinas. No filotipo II

está a estirpe mais conhecida como *R. solanacearum* raça 3 biovar 2 que ataca várias solanáceas, incluindo tomate, pimentão e sendo um grande problema na batata (Castillo e Greenberg 2007). Cada filotipo é subdividido em grupos menores denominados sequevares (corresponde na taxonomia a infra-subespécie), que se refere a uma sequência altamente conservada dentro da região sequenciada do gene da endoglucanase *egl*. Já os clones são identificados por técnicas que analisam o genoma tais como AFLP e RAPD que permitem identificar diferenças genéticas em outras áreas do genoma.

Este estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de isolados de *R. solanacearum* utilizando marcadores moleculares AFLP, visando obter informações sobre as estirpes regionais da bactéria e que possam servir de subsídio para o estabelecimento de medidas de manejo da murcha bacteriana no Amazonas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados

Foram utilizados 30 isolados de *R. solanacearum* provenientes da coleta de plantas de tomate, pimentão e berinjela apresentando sintomas de murcha bacteriana em propriedades dos municípios de Iranduba, Manacapuru, Manaus e Presidente Figueiredo do Estado do Amazonas. Para o isolamento da bactéria, caules de plantas com sintomas foram levados ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, onde foram lavados em água corrente, e secos com papel toalha. Com a utilização de um bisturi esterilizado foi feita uma incisão no caule expondo o seu interior de onde foram retirados fragmentos de tecido infectado. Em uma placa de Petri esterilizada foram depositados 2 mL de água destilada esterilizada e macerados fragmentos de caule para obtenção da suspensão que foi semeada através de riscas em placas contendo o meio diferencial de Kelman contendo tetrazólio (1954), que permitiu a seleção de estirpes que

apresentaram crescimento fluido e coloração branco-creme com a área central rosada. A manutenção dos isolados foi feita em tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada em temperatura ambiente (Romeiro 2001).

A confirmação da espécie foi realizada através do método bioquímico tradicional incluindo os seguintes testes: teste de oxidação fermentação, utilização de asparagina, pigmentação fluorescente em meio King, Teste de Gram, produção de grânulos de poli- β -hidroxibutirato, de acordo com Sands *et al.* (1990), e testes de produção de ácidos a partir de fontes de carbono e álcoois segundo Hayward (1964).

Os isolados foram identificados de acordo com a área de coleta sendo utilizadas as letras iniciais do nome de cada município de origem, conforme a seguir: IRAND – isolados de Iranduba; MANAC – isolados de Manacapuru; MAO – isolados de Manaus e PRESFIG – isolados de Presidente Figueiredo.

Tabela 1. Isolados de *Ralstonia solanacearum*, hospedeiro de origem, procedência e biovar

Isolados	Hospedeiro	Procedência	Biovar
IRAND1	Pimentão	Iranduba – AM	1
IRAND3	Pimentão	Iranduba – AM	1
IRAND4	Berinjela	Iranduba – AM	1
IRAND6	Pimentão	Iranduba – AM	1
IRAND10	Pimentão	Iranduba – AM	1
IRAND11	Pimentão	Iranduba – AM	1
IRAND12	Pimentão	Iranduba – AM	3
IRAND13	Pimentão	Iranduba – AM	1
IRAND17	Pimentão	Iranduba – AM	1
IRAND20	Tomate	Iranduba – AM	1
IRAND21	Tomate	Iranduba – AM	3

IRAND27	Pimentão	Irاندuba – AM	1
MANAC2	Pimentão	Manacapuru – AM	3
MANAC8	Pimentão	Manacapuru – AM	1
MANAC9	Pimentão	Manacapuru – AM	1
MANAC14	Pimentão	Manacapuru – AM	1
MANAC15	Pimentão	Manacapuru – AM	1
MANAC16	Pimentão	Manacapuru – AM	1
MANAC19	Pimentão	Manacapuru – AM	1
MANAC23	Pimentão	Manacapuru – AM	1
MANAC24	Pimentão	Manacapuru – AM	3
MAO26	Tomate	Manaus – AM	1
MAO28	Tomate	Manaus – AM	1
MAO29	Tomate	Manaus – AM	1
MAO30	Tomate	Manaus – AM	1
MAO31	Tomate	Manaus – AM	1
MAO34	Tomate	Manaus – AM	1
PRESFIG33	Tomate	Presidente Figueiredo – AM	1
PRESFIG35	Pimentão	Presidente Figueiredo – AM	1
PRESFIG36	Pimentão	Presidente Figueiredo – AM	1

Extração do DNA genômico

O DNA genômico de cada um dos isolados obtidos foi extraído conforme metodologia descrita por Rosa (2008), com modificações. Os isolados foram cultivados em tubos tipo Falcon com 15 mL de meio NL (Extrato de carne 3 g; Peptona 5,0 g; Água destilada 1 L) por

24 horas sob agitação constante em mesa agitadora Marconi MA 140, Minas Gerais, Brasil. A seguir, os tubos foram centrifugados a 6000 rpm por 20 min em centrífuga orbital. O sobrenadante foi descartado, o precipitado obtido ressuspendido em 1 mL de tampão TEN (NaCl 100 mM, EDTA 25 mM; Tris HCl 20 mM [pH 8,0]), e transferido para microtubos de 2 mL. Foi adicionado 10 μ L de lisozima (10 mg.mL⁻¹, Invitrogen, São Paulo, Brasil), 10 μ L proteinase K (10 mg.mL⁻¹, Invitrogen, São Paulo, Brasil) e incubado a 37 °C por 30 minutos, seguido de outra incubação à 60 °C por 30 minutos em banho maria. Posteriormente, foram adicionados 660 μ L de NaCl 5M e incubado por 30 minutos a 4 °C. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados por 10 minutos à 14000 rpm em microcentrífuga Eppendorf (MiniSpin® Plus, Hamburgo, Alemanha) o sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado igual volume de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas (14000 rpm/10 min), e a fase aquosa transferida para um novo microtubo de 1,5 mL onde foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado e incubado *overnight* à - 20 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 14000 rpm, descartado o excesso de isopropanol e o *pellet* obtido seco em câmara de fluxo laminar. O DNA obtido foi ressuspendido em 30 μ L de tampão TE (Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM) acrescido de RNase (10 mg. μ L⁻¹, Thermo Scientific, Califórnia, USA) e incubado a 37 °C por 1 hora.

A quantificação do DNA genômico foi realizada em gel de agarose 0,8% (p/v) por comparações visuais de sua fluorescência com aquelas de padrões de massa molecular conhecida de DNA do fago lambda nas concentrações de 50 e 100 ng. μ L⁻¹, utilizando o corante *gel red* (Uniscience) para coloração das amostras. O gel de agarose foi submetido à eletroforese em minicubas horizontais contendo tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) por aproximadamente 50 minutos a 80 volts. Os géis foram analisados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água ultra-pura, padronizadas a uma concentração de 10 ng. μ L⁻¹ e armazenadas à - 20 °C até o uso.

Condições de AFLP

O protocolo usado seguiu os procedimentos propostos por Vos *et al.* (1995). Na digestão do DNA foi utilizada a combinação das enzimas de restrição *EcoRI/MseI*. Foram utilizados nas reações 200 ng de DNA genômico (20 µL de cada amostra padronizada à 10 ng.µL⁻¹), 5,0 µL do tampão “One Phor All” 10X (OPA; Amersham), 0,5 µL de solução BSA (Albumina de Soro Bovino, New England Biolabs) (10 µg.µL⁻¹, New England Biolabs), 0,5 µL da enzima *MseI* (10 U.µL⁻¹, New England Biolabs) e 0,4 µL da enzima *EcoRI* (10 U.µL⁻¹, New England Biolabs), 23,6 µL de água ultrapura resultando em volume final de 50 µL. As reações foram realizadas a 37 °C por três horas seguida de um ciclo de 15 minutos a 70 °C para inativação das enzimas.

Para a ligação dos adaptadores *EcoRI* R (New England Biolabs) [5’AAT TGG TAC GCA GTC TAC 3’]; *EcoRI* F (5’ CTC GTA GAC TGC TAC GCA GTC TAC 3’) e *MseI* R (5’TAC TCA GGA CTC AT 3’); *MseI* F (New England Biolabs) [5’ GAC GAT GAG TCC TGA G3’] foi utilizado 1,0 µL do tampão da T4 DNA Ligase (New England Biolabs), 1,0 µL do adaptador da enzima de corte raro (*EcoRI*), 1,0 µL do adaptador da enzima de corte freqüente (*MseI*), 0,4 µL da enzima T4 DNA Ligase (1 U.µL⁻¹, New England Biolabs), 6,6 µL de água ultrapura que foi adicionado à microtubos contendo 50 µL do DNA digerido. As reações foram realizadas a 23 °C por três horas em Termociclador MJ96G (Biocycle, China).

Após as reações de ligação, foram feitas as reações de pré-amplificação utilizando iniciadores complementares às seqüências dos sítios das enzimas de restrição com um nucleotídeo seletivo, *EcoRI*+A/*Mse*+A, *EcoRI*+A/*Mse*+C, *EcoRI*+C/*Mse*+A, *EcoRI*+C/*Mse*+C, *EcoRI*+G/*Mse*+A, *EcoRI*+G/*Mse*+C, com 3,0 µL da amostra de DNA digerido/ligado, 1,0 µL do iniciador da enzima de corte raro (*EcoRI*+N) (50 ng.µL⁻¹), 1,0 µL do iniciador da enzima de corte freqüente (*Mse*+N) (50 ng.µL⁻¹), 4,0 µL de dNTP 2,5 mM

(Thermo Scientific), 2,0 μL do tampão da Taq 10X (Fermentas), 0,6 μL MgCl_2 50 mM, 1,0 μL de Taq DNA polimerase (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, Fermentas) e 7,4 μL de água ultrapura, resultando em um mix com volume final de 20 μL . O programa da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) na pré-amplificação foi composto de 26 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos. Cada ciclo foi constituído de 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 1 minuto a 56 °C (anelamento) e 1 minuto a 72 °C (extensão), sendo o ciclo final seguido por 5 minutos a 72 °C. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos acrescentando 80 μL de água ultrapura.

Nas reações de amplificação seletiva foram testadas 25 combinações de *primers*: *EcoRI-AA/MseI-A*, *EcoRI-AA/MseI-C*, *EcoRI-AG/MseI-A*, *EcoRI-AG/MseI-C*, *EcoRI-AT/MseI-A*, *EcoRI-AT/MseI-C*, *EcoRI-CC/MseI-A*, *EcoRI-CC/MseI-C*, *EcoRI-CG/MseI-A*, *EcoRI-CG/MseI-C*, *EcoRI-GG/MseI-A*, *EcoRI-GG/MseI-C*, *EcoRI-GA/MseI-A*, *EcoRI-GA/MseI-C*, *EcoRI-AAC/MseI-C*, *EcoRI-AAC/MseI-CGC*, *EcoRI-AAC/MseI-CAT*, *EcoRI-AAC/MseI-CCA*, *EcoRI-AAC/MseI-CAC*, *EcoRI-AAC/MseI-CCA*, *EcoRI-ACA/MseI-CGC*, *EcoRI-ACA/MseI-C*, *EcoRI-ACA/MseI-CAC*, *EcoRI-ACA/MseI-CAT*, *EcoRI-ACA/MseI-CTC*.

Foram utilizados 3,0 μL do DNA pré-amplificado diluído, 1,0 μL do iniciador da enzima de corte raro (50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, Alpha DNA), 1,0 μL do iniciador da enzima de corte freqüente (50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, Alpha DNA), 1,6 μL de dNTP 2,5 mM (Thermo Scientific), 2,0 μL do tampão da Taq DNA polimerase 10X (Promega), 0,6 μL de MgCl_2 50 mM, 0,3 μL de Taq DNA polimerase (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, Promega) e 10,5 μL de água ultrapura, resultando num mix contendo 20 μL de volume final. O programa da PCR na amplificação seletiva consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 12 ciclos compostos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C e 1 minuto a 72 °C seguidos de 23 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C e 1 minuto a 72 °C. O ciclo final foi seguido de 2 minutos a 72 °C.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (acrilamida/bisacrilamida (19:1) 6 %, uréia 7.5 M, tampão TEB 1X) de 0,5 mm de espessura. Ao produto da amplificação seletiva (20 µL) foram adicionados 10 µL de tampão formamida (formamida 98%, EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,002%, p/v e xileno cianol 0,002%, p/v), foi feita a desnaturação das amostras à temperatura de 95 °C por 5 minutos e então aplicados 20 µL da amostra desnaturada no gel. A corrida foi realizada no sistema de eletroforese Sequi-Gen GT (BIO-RAD) 38 x 50 cm conduzida sob potência constante de 50 W durante três horas e 30 minutos, em média. Na revelação dos géis foi utilizado o método de coloração com nitrato de prata segundo o protocolo proposto por Creste *et al.* (2001).

Análise dos dados

O padrão de bandas apresentado nos géis foi analisado visualmente, quantificando a presença de bandas entre 50 a 450 pb. *Loci* polimórficos foram analisados para presença/ausência de banda, representados por 1 e 0, respectivamente. Os dados binários foram submetidos à análise de variância pelo programa Genes (Cruz 2006). A similaridade genética entre os genótipos foi analisada através do coeficiente de Jaccard (Jaccard 1901). A matriz de similaridade foi analisada através do método UPGMA – *Unweightes Pair-group Method with Arithmetic Average*. A consistência das ramificações do dendograma foi verificada por meio da amostragem repetitiva de dados com 1000 repetições, utilizando o programa Genes (Cruz 2006).

3. RESULTADOS

Todos os isolados obtidos apresentaram colônias fluidas, brancas e com centro rosado quando semeadas em meio diferencial de Kelman (1954) com tetrazólio, compatíveis com as características típicas apresentadas por isolados de *R. solanacearum* neste tipo de meio. Como resultado da identificação bioquímica tradicional, os isolados obtidos foram Gram negativos, foram oxidase positivo, cresceram em meio utilizando asparagina como única fonte de carbono, não produziram pigmentos fluorescentes quando semeados em meio King B e apresentaram grânulos de poli- β -hidroxibutirato. Todos os testes realizados para a identificação bioquímica dos isolados produziram os resultados esperados e estão de acordo com os protocolos para identificação de *R. solanacearum* da EPPO (2004).

A análise dos marcadores AFLP obtidos identificou que das 25 combinações de *primers* testadas, variando de 1 a 3 nucleotídeos combinados, algumas não produziram um perfil de amplificação satisfatório, apresentando um número de bandas que variou de 3 a 103, com baixa intensidade, que foram então descartadas. Seis combinações foram selecionadas por terem gerado um perfil de bandas satisfatório com boa intensidade e quantidade de *loci* polimórficos identificados, evidenciando o alto nível de polimorfismo dos isolados analisados. As seis combinações de *primers* utilizadas apresentaram um total de 432 bandas sendo cinco monomórficas e 428 polimórficas, variando de 47 na combinação E+AAC/M+CAC até 103 na combinação E+AT/M+C (Tabela 2).

Tabela 2. Grau de polimorfismo e número de *loci* detectados por *primer* em isolados de *R. solanacearum*

Combinação de <i>primer</i>	Nº de nucleotídeos seletivos	Nº Total de bandas	Nº de bandas polimórficas	% polimorfismo
EcoRI-AT/MseI-C	2+1	103	103	100%
EcoRI-CG/MseI-A	2+1	91	89	97,8%
EcoRI-AAC+MseI-C	3+1	53	51	96,2%
EcoRI-AAC/MseI-CAT	3+3	78	78	100%
EcoRI-AAC/MseI-CAC	3+3	48	47	97,9%
EcoRI-AGT/MseI-C	3+1	60	60	100%

A variação genética entre os 30 isolados foi estimada através do coeficiente de similaridade de Jaccard e variou de 0,01 à 0,98. Os isolados mais relacionados entre si, MAO31 e PRESFIG33 apresentaram coeficiente de similaridade genética de 0,98.

A partir da matriz de similaridade foi gerado o dendrograma obtido pelo método UPGMA (Figura 1), onde no eixo X está representada a porcentagem das distâncias entre os isolados, e no eixo Y, estão representados os 30 isolados de *R. solanacearum*. Foi utilizado ponto de corte de 97% sendo possível separar os isolados em seis grupos. Nos nós de cada ramificação está indicado o valor de *bootstrap* obtido e que indica a robustez da análise obtida. No grupo I estão os isolados MAO31, PRESFIG33, MAO30, MAO26, IRAND27, MAO28, MANAC19, IRAND20, IRAND13, MANAC14, MANAC9, IRAND11, IRAND6, MANAC15, IRAND3, MAO29, o valor de *bootstrap* de 100% confirma a estabilidade desta ramificação.

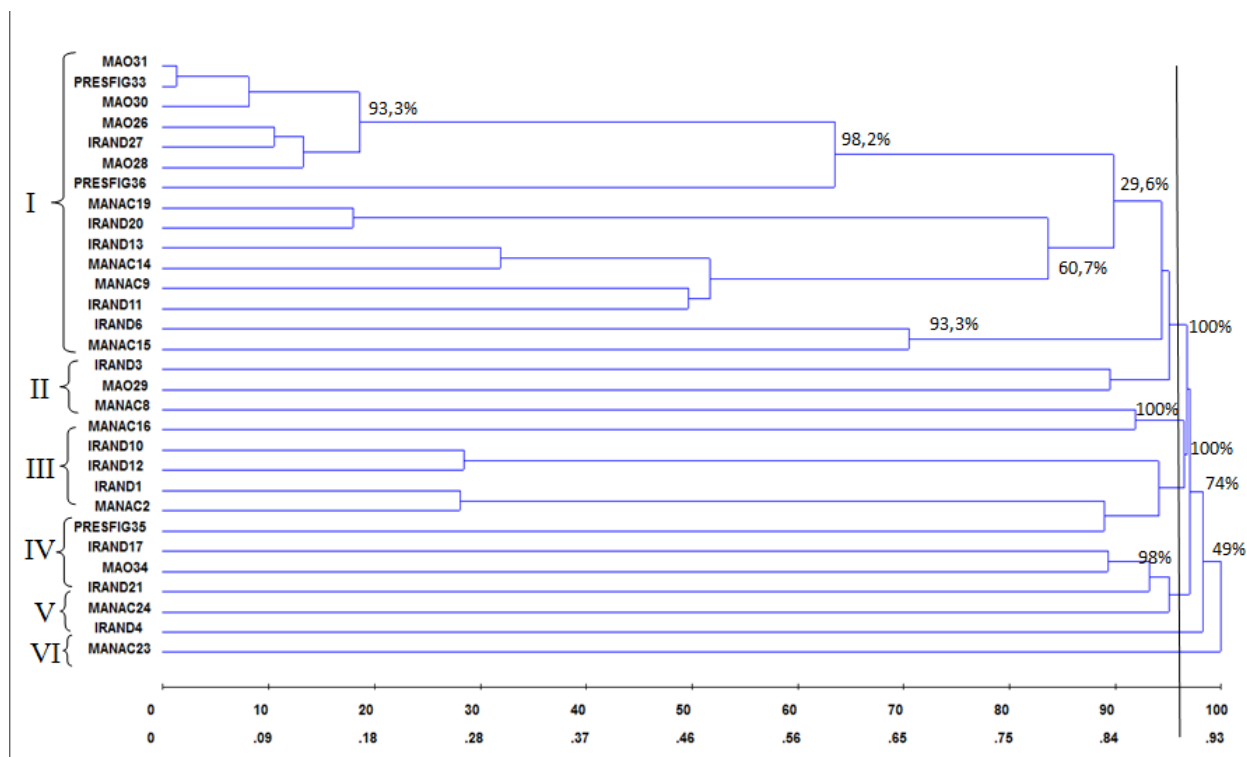


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética feito pelo método de UPGMA de isolados de *Ralstonia solanacearum* dos municípios de Iranduba, Manacapuru, Manaus e Presidente Figueiredo do Estado do Amazonas. Valores de *bootstrap* obtido estão indicados nos nós de cada ramificação.

No grupo II ficaram os isolados MANAC8 e MANAC16, com valor de *bootstrap* de 100%, demonstrando que está ramificação é consistente, aparecendo sempre que as análises foram efetuadas pelo programa. O grupo III foi formado pelos isolados IRAND10, IRAND12, IRAND1, MANAC2 e PRESFIG35. O grupo IV foi representado pelos isolados IRAND17, MAO34, IRAND21 e MANAC24. Os grupos V e VI foram formados por apenas um isolado cada um IRAND4 e MANAC23 (Figura 1), respectivamente, que permaneceram isolados dos demais grupos. Neste caso, o isolado IRAND4 pode ter sido separado de outros grupos por ser o único isolado obtido de berinjela.

O coeficiente de correlação cofenética, valor calculado entre a matriz de dados binários e o dendrograma gerado, representa a confiabilidade dos dados e apresentou valor de $r = 0,98$, confirmando a robustez do dendrograma obtido.

4. DISCUSSÃO

A utilização de testes bioquímicos se baseia nas características metabólicas e fisiológicas próprias de cada espécie, que incluem a habilidade em utilizar certos substratos, produção ou redução de substâncias, temperatura ótima de crescimento, reações específicas a certos corantes entre outros (Sigeo 1992). Kelman (1954) avaliou a característica de isolados em vários tipos de meios e relatou que podem ser encontradas diferenças na morfologia das colônias de isolados de *R. solanacearum*. Colônias normais, ou selvagens, logo após o isolamento de plantas doentes, são lisas, irregularmente arredondadas, fluídas e opacas; colônias de mutantes, frequentemente encontradas em culturas estoques, são lisas, uniformemente redondas, rugosas e não fluidas. Também relatou que em meio contendo tetrazólio, as colônias normais virulentas são lisas, irregularmente arredondadas, fluídas brancas com o centro rosado, enquanto colônias avirulentas são completamente vermelhas.

A utilização dos testes bioquímicos clássicos ainda continua sendo utilizado na identificação de isolados de *R. solanacearum*, e possibilitam identificar as características de ordem metabólica deste complexo de espécies. Os resultados obtidos estão de acordo com outros trabalhos que utilizaram testes bioquímicos para a caracterização de isolados deste complexo, como os obtidos por Coelho Netto *et al.* (2003) que caracterizaram isolados de *R. solanacearum* de áreas de várzea e terra firme e obtiveram resultados semelhantes. Lemessa e Zeller (2007) também utilizaram testes bioquímicos clássicos para a identificação e caracterização de 62 isolados de *R. solanacearum* coletados de várias solanáceas (batata, tomate, pimentão) em diferentes locais da Etiópia e conseguiram identificar a ocorrência das biovars 1 e 2.

A variabilidade na agressividade e na diversidade genética de isolados de *R. solanacearum* já foi demonstrada em vários estudos no Brasil (Lopes e Boiteux 2004; Lopes 2005; Coelho Netto *et al.* 2003) e no mundo (Prior *et al.* 1990; Hsu *et al.* 1993) . Esses

levantamentos indicaram a presença de estirpes da biovar 1 em todas as regiões do país. Nas regiões de clima ameno, como Sul, Sudeste e Centro Oeste brasileiro, prevalece a presença da biovar 2 e nas regiões mais quente, como Norte e Nordeste, a presença da biovar 1 e 3. Em batata, as biovars 1 e 2 estão amplamente distribuídas no país.

A análise AFLP dos isolados de *R. solanacearum* foi efetiva em detectar a variabilidade genética deste complexo, observada pelo grande número de ramificações detectadas no dendrograma. A análise obtida pelos *primers* selecionados mostrou que aqueles que continham as bases seletivas A, C e T foram mais efetivas do que as outras combinações, pois apresentaram perfis eletroforéticos mais informativos quanto à diversidade entre os isolados estudados, ou seja, as combinações de *primers* com a presença dessas bases apresentou maior número de bandas polimórficas que permitiram separar indivíduos semelhantes quando outras combinações não conseguiram acessar a variabilidade entre os mesmos indivíduos.

Em estudo utilizando marcadores AFLP, Kositrana *et al.* (2002) avaliaram a diversidade genética de *R. solanacearum* isolados de diversos hospedeiros na Malásia e Tailândia e encontraram um nível de similaridade de 30% entre as estirpes desses países. Verificaram ainda a separação em três grupos que foram correlatos às biovars das estirpes, diferente do resultado que foi obtido com os isolados do presente estudo, onde não foi possível correlacionar os grupos com as biovars das estirpes utilizadas, possivelmente por se tratarem todos os isolados obtidos de solanáceas e apenas dois biovars.

A análise dos coeficientes de similaridade gerados permitiu verificar que a variabilidade genética observada entre os isolados foram causadas pelo perfil genético de cada isolado e não pela procedência dele ou hospedeiro, uma vez que a maior diversidade foi encontrada entre os isolados sendo formado grupos com diferentes procedências. No entanto, ao considerarmos somente o hospedeiro, foi possível identificar a formação de pequenos

conjuntos de isolados do mesmo hospedeiros dentro dos grupos. O grupo I apresenta cinco nós com *bootstrat* de 93,3% (Figura 1) onde estão presentes apenas isolados obtidos de tomateiro, enquanto que no grupo II e III estão presentes somente isolados obtidos de pimentão.

Resultado semelhante foi obtido por Jeong *et al.* (2007) que analisaram a variabilidade genética de 125 isolados de *R. solanacearum*, sendo 109 oriundos de províncias da Coreia e 16 de outras localidades do mundo através de marcadores moleculares AFLP. Obtiveram 110 bandas polimórficas e obtiveram um dendrograma com a formação de dois grupos, no qual o primeiro grupo conseguiu agrupar todos os isolados originários da Coreia e do Japão, enquanto no segundo grupo ficaram agrupados os isolados dos países restantes. O estudo não permitiu correlacionar a variabilidade genética com a origem geográfica do isolado, do hospedeiro ou biovar. Algumas inconsistências também foram detectadas quando somente as biovars foram consideradas na análise, agrupando conjuntamente isolados de raças e biovars diferentes. O único grupo consistente foi o que agrupou todos os isolados da raça 3 biovar 2.

Yu *et al.* (2003) avaliaram, em duas análises separadas, a variabilidade genética entre 28 estirpes de *R. solanacearum* obtidos de cinco espécies de hospedeiros de vários locais do mundo, e entre 55 estirpes de *R. solanacearum* obtidas de plantas de gengibre oriundas de três campos de produção do Havaí. Na análise entre as 28 estirpes foi demonstrada a formação de grupos correlatos com as hospedeiras e o grupo contendo estirpes de gengibre apresentaram pouca similaridade com as estirpes obtidas de helicônia e banana. Quando consideraram a análise somente de estirpes de gengibre do Havaí os autores detectaram a variabilidade genética e obtiveram a formação de quatro grupos sem correlação com o campo de coleta.

O fato dos locais de coleta estarem geograficamente próximos (distância menor que 250 Km entre si) evidencia que pode estar ocorrendo a troca de material genético entre os

isolados de diferentes procedências, visto que pequenos produtores de nossa região tem o costume de dividir o uso de tratores agrícolas, e assim pode estar ocorrendo o transporte da bactéria em solo aderido nas rodas deste veículo.

Pode ser, ainda, que o processo evolutivo da bactéria esteja conduzindo para uma estrutura genética similar, uma vez que esta bactéria parece agregar em seu megaplasmídeo a capacidade de sintetizar proteínas que garantam melhor adaptação às condições da região. Também pode estar contribuindo para esta similaridade entre as populações a possibilidade de transferência horizontal gênica, um processo que costuma ocorrer entre procariotos como um mecanismo de adaptação aos mais variados ambientes, e neste processo a bactéria pode incluir em seu genoma partes de gene da planta que garantam uma melhor adaptação àquele local (Agrios 2005; Guidot *et al.* 2009; Pinheiro *et al.* 2011). Neste estudo, também não foi possível correlacionar perfis genômicos, local de coleta e ecossistema de origem dos isolados (várzea ou terra firme) evidenciando assim a complexidade existente nesta espécie bacteriana.

A variabilidade genética dos isolados encontrada neste trabalho demonstra a dificuldade em controlar esta doença devido à complexidade de *R. solanacearum*, a capacidade de adaptação aos diversos hospedeiros e ambientes, ressaltando o desafio que representa determinar as melhores estratégias de controle para que seja possível conviver com a doença nos campos de produção. Em virtude desta variabilidade torna-se necessária a utilização de várias medidas integradas para conseguir minimizar os danos provocados pela murcha bacteriana.

Considerando o poder de resolução da técnica com marcadores AFLP pode-se recomendar a sua utilização na detecção de variabilidade genética entre indivíduos desta espécie em virtude de sua forte capacidade de avaliar o genoma e conseguir detectar o polimorfismo mesmo em espécies onde o processo evolutivo é rápido, principalmente em virtude do curto tempo de geração das bactérias. No entanto, a análise em conjunto com

outras técnicas que analisem regiões específicas do gene pode contribuir para gerar informações mais consistentes à cerca da população desta bactéria na região Amazônica.

5. CONCLUSÃO

O marcador AFLP foi eficiente em distinguir a variabilidade genética existente entre os isolados de *Ralstonia solanacearum* do Amazonas com a utilização de seis combinações de primers que geraram um total de 432 bandas polimórficas e permitiram formação de seis grupos.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEAM pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5 th ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 922 p.

Arahal, D.R.; Llop, P.; Alonso, M.; Lopez, M.M. 2004. In silico evaluation of molecular probes for detection and identification of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 581-591.

Castillo, J.A.; Greenberg, J.T. 2007. Evolutionary Dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1225-1238.

Coelho Netto, R. A.; Pereira, B. G.; Noda, H; Boher, B. 2003. Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme, no Estados do Amazonas. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 362-366.

Creste, S.; Tulmann neto, A.; Figueira, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 299-306.

Cruz, C.D. 2006. Program Genes: multivariate analysis and simulation, UFV, Viçosa-MG, 175 p. (in Portuguese).

Elphinstone, J. 2005. The current bacterial wilt situation: a global view. In Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C., eds. *Bacterial wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex*. Saint Paul, MN, USA. APS Press, 99-128.

EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2004. *Diagnostic protocols for regulated pests – Ralstonia solanacearum*. Boletim 34: 173-178.

Fegan, M.; Prior, P. 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C., eds. *Bacterial wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex*. Saint Paul, MN, USA. APS Press, 449-461.

Genin, S.; Boucher, C. 2002. *Ralstonia solanacearum*: Secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology*, v. 9, p. 111-118.

Genin, S.; Denny, T.P. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Annual Review of Phytopathology*, 50: 67-89.

Guidot, A.; Coupat, B.; Fall, S.; Prior, P.; Bertolla, F. 2009. Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. *ISME Journal*, 3: 549-562.

Hayward, A.C. 1964. Characteristic of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 27:265-277.

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

Hayward, A.C. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In Hayward, A.C.; Hartman, G.L. Eds.). *Bacterial wilt: The disease and its causative agente *Pseudomonas solanacearum**. Wallingford. CAB. 95-112.

Hsu, S.T.; Hong, W.F. Tzeng, K.C., Chen, C.C. Bacterial wilt of perilla caused by *Pseudomonas solanacearum* and it transmission. *Plant disease*, 77:674-677. 1993.

Jeong, Y.; Kim, J.; Kang, Y., Lee, S.; Hwang, I. 2007. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant disease* 91: 1277-1287.

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, 44: 693-695.

Kositrana, K.; Julapark, C.; Frederick, R.D.; Schadd, N.W. Genetic variability of *Ralstonia solanacearum* strains from pepper (*Capsicum annum*) in Thailand and their genetic relationship to strains from other hosts. 2002. *Thai Journal of Agricultural Science*, 35: 415-426.

Lemessa, F.; Zeller, W. 2007. Isolation and characterisation of *Ralstonia solanacearum* strains from *Solanaceae* crops in Ethiopia. *Journal of Basic Microbiology*: 47, 40–49.

Lopes, C.A.; Boiteux, L.S. 2004. Biovar-specific and broad-spectrum sources of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in *Capsicum*. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4:350-355.

Pinheiro, C.R.; Amorim, J.A.E.; Diniz, L.E.C.; Silva, A.M.F.; Talamini, V.; Souza Junior, M.T. 2011. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto a filotipos e sequevares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46: 593-602.

Prior, P. 1990. Aggressiveness of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies (Martinique and Guadalupe) on tomato. *Plant disease*, 74:962-965.

Romeiro, R.S. 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV, 2001, 279 p: il.

Rosa, D.D. 2008. Método rápido de extração de DNA de bactérias. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.3, p.259-261.

Sands, D.C. 1990. Physiological criteria – Determinative Tests. In: Klement, Z.; Rudolph, K.; Sands, D.C. eds, *Methods in Phytobacteriology*. Budapest: Akadémiai Kiado, 568p.

Sigee, D.C. 1992. Bacterial Plant Pathology – Cell and Molecular Aspects. EUA: Cambridge University Press, 1992, 325 p.

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

Vos, P.R.; Hogers, M.; Bleeker, M.; Van De Lee Reijans, T.; Hornes, M.; Fritjers, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. 1995. AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids research*, 23: 4407-4414.

Yabuuchi, E.; Kosako, E.; Yano, I; Hotta, H.; Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of Two *Burkholderia* and An *Alcaligenes* Species to *Ralstonia* Gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Falteroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. Nov. **Microbial Immunology**: 39(11): 897-904.

Yu, Q.; Alvarez, A.M.; Moore, P.H.; Zee, F.; Kim, M.S.; de Silva, A.; Hepper, P.R.; Ming, R. 2003. Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolated from ginger in Hawaii. *Phytopathology* 93: 1124-1130.

Avaliação de resistência e respostas enzimáticas de defesa em acessos de *Capsicum* spp.

(Capítulo redigido conforme as normas de publicação da revista *Summa Phytopathologica*)

Resumo

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* representa um grande problema para os produtores de pimentão do Amazonas, em razão da dificuldade de controlar a doença. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de enzimas polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POX) e fenilalanina amônia liase (FAL) em acessos de *Capsicum* inoculadas com *R. solanacearum*. Foram avaliados 25 acessos de *Capsicum* quanto à resistência à murcha bacteriana. Em um novo experimento foram avaliados os 12 acessos de *Capsicum* que se mostraram mais resistentes e foi verificada a atividade de PPO, POX e FAL ao 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. Foi possível identificar dois acessos resistentes (BC 05 e NT) que apresentaram média de notas de 1,17 e 0,94 e dois moderadamente resistentes (LA 01 e BC 01) que apresentaram média de notas de 1,83 e 1,90 respectivamente. A atividade enzimática variou conforme o nível de resistência dos acessos avaliados e foi maior nas primeiras horas após a inoculação decrescendo após 72 horas. A resistência dos acessos foi associada com a maior atividade da PPO e FAL, sendo o acesso LA 01 o que apresentou a maior atividade destas enzimas dentre os acessos avaliados, indicando que estas enzimas compõem o mecanismo de defesa bioquímico em plantas de *Capsicum*. A POX apresentou menor atividade quando comparada com a dinâmica da PPO e FAL.

Palavras-chave: murcha bacteriana, atividade enzimática, resistência

Evaluation of resistance and enzymatic defense responses in *Capsicum* spp

Abstract

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is a great problem for the producers of chili in Amazon, because of the difficulty of controlling the disease. This study aimed to evaluate the activity of polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POX) and phenylalanine ammonia lyase (FAL) in *Capsicum* accessions inoculated with *R. solanacearum*. The twenty five accessions of *Capsicum* were evaluated for resistance to bacterial wilt. Another experiment evaluated the twelve accessions of *Capsicum* that were resistant and has been checked the activity of PPO , POX and FAL to 0, 24, 48, 72 and 96 hours after inoculation. There was identify two resistant accessions (BC 05 and NT) showed that grade point average of 1.17 and 0.94 and two moderately resistant (LA 01 and 01 BC) who had average grades of 1.83 and 1.90 respectively. The enzymatic activity varied according to the level of resistance of the evaluated accessions and was higher in the first hours after inoculation decreased after 72 hours. The resistance of accessions was associated with increased activity of PPO and FAL, and the LA access 01 which showed the highest activity of these enzymes among accessions, indicating that these enzymes make up the biochemical defense mechanism in plants of *Capsicum*. The POX showed less activity when compared with the dynamics of PPO and FAL .

Keywords : bacterial wilt , enzymatic activity , resistance

1. INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* é uma doença que ataca várias solanáceas como tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), pimenta de cheiro (*Capsicum chinense* L.), pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.), a pimenta murupi (*C. chinense* L.) de uso tradicional no Amazonas, causando muitas perdas. Segundo Coelho Netto et al. (6) em estudo onde avaliou a incidência de murcha bacteriana no Amazonas, constatou a presença da doença em plantios de solanáceas de todos os municípios do Estado, e em áreas recém desmatadas, onde se iniciou o cultivo com solanáceas foi possível observar perdas de até 40% das plantas e de 10% quando utilizada as variedades Casca Dura e Magali sob cultivo protegido.

Na Região Norte as condições favoráveis de elevada temperatura e umidade, contribuem para a manifestação da doença que pode se espalhar rapidamente e comprometer a produção em larga escala (6; 16). A utilização de áreas contaminadas com o patógeno, práticas culturais errôneas como a rotação com espécies hospedeiras do patógeno, água de irrigação contaminada, ausência de uma cultivar resistente e a variabilidade do patógeno dificultam a implementação de medidas que sejam eficientes no controle da doença.

A utilização de cultivares resistentes é a melhor forma de controle para esta doença, no entanto, para o pimentão ainda não existem cultivares resistentes disponíveis no mercado. O nível de resistência de uma planta é devido à capacidade da planta em ativar os seus mecanismos de defesa quando percebe a presença do patógeno, no entanto a resistência, em geral, é complexa, envolvendo a ação combinada de características estruturais e de respostas bioquímicas (1; 28). A interação entre patógeno e hospedeiro induz algumas mudanças no metabolismo das células e dependendo do patógeno, rotas de sinalização específicas das plantas são ativadas e levam à expressão de muitas outras respostas de defesa como a resposta

hipersensitiva (HR), produção de espécies reativas de oxigênio, acúmulo de fitoalexinas, a síntese de proteínas PR, atividades das enzimas, tais como fenilalanina amônia liase (FAL), peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO), lipoxigenase (LOX) entre outras (28) e lignificação e enrijecimento de parede (1; 8; 31).

A fenilalanina é um precursor importante da rota dos fenilpropanóides, essencial na síntese da lignina e de compostos fenólicos que são compostos envolvidos na defesa de plantas (27). A rota do shikimato é o ponto de partida para a biossíntese dos fenilpropanóides que contribuem em vários aspectos nas respostas de defesa das plantas aos patógenos e por isso são considerados importantes mediadores da resistência das plantas. Esta rota ocorre em nível intracelular, nos plastídeos e a regulação da entrada desta rota pode ocorrer em vários níveis (29). A primeira etapa da rota se inicia com a desaminação da L-fenilalanina pela enzima fenilalanina amônia liase (FAL) que é convertida à ácido *trans*-cinâmico, que após uma reação de hidroxilação e outra de redução produz ácido cumárico (26; 29). O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em muitos diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (26; 27).

A enzima peroxidase encontrada nos tecidos das plantas é conhecida por participar de vários processos fisiológicos de grande importância. As peroxidases também participam da biossíntese do hormônio vegetal etileno, da oxidação de compostos fenólicos, os quais acumulam-se em resposta à infecção, oxidação do ácido indolil-3-acético (AIA) e na biossíntese de lignina (25; 26). O aumento da atividade de enzimas como a POX, PPO e FAL relacionadas com fontes de resistência já foi demonstrada em vários patossistemas. Araújo e Stadinik (3) avaliando a atividade de enzimas em plântulas de macieira resistente e suscetível a mancha foliar causada por *Colletotrichum gloesporioides* observaram o aumento da atividade da POX associado à resposta da cultivar resistente. Andrade *et al.* (2) avaliando a resposta de tomateiro à pinta bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* também conseguiram associar a menor ocorrência

de sintomas com a maior atividade de POX, PPO, glucanase e lipoxigenase sendo maior nos seis primeiros dias após a inoculação com o patógeno.

No patossistema pimentão-*Ralstonia solanacearum* não existem trabalhos evidenciando a atividade de enzimas relacionadas à defesa. Com isto, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade enzimática de PPO, FAL e POX como componentes de defesa em acessos de *Capsicum* com diferentes níveis de resistência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados

Foram obtidos 30 isolados de *R. solanacearum* provenientes da coleta de plantas de tomateiro, pimentão e berinjela apresentando sintomas de murcha bacteriana em propriedades dos municípios de Iranduba, Manacapuru, Manaus e Presidente Figueiredo do Estado do Amazonas. Para o isolamento da bactéria, caules de plantas com sintomas foram levados ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas (FCA/UFAM), onde foram lavados em água corrente e detergente neutro, e então secos com papel toalha. Com a utilização de um bisturi esterilizado foi feita uma incisão no caule expondo o seu interior e foram retirados fragmentos de tecido infectado. Em uma placa de Petri foram depositados 2 mL de água destilada esterilizada e macerados fragmentos de caule para a obtenção da suspensão de bactérias, que foi semeada através de estrias em placas contendo o meio diferencial de Kelman com tetrazólio (12) que permitiu a seleção de estirpes que apresentaram crescimento fluido e coloração branco-creme com a área central rosada. A manutenção dos isolados foi feita em tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada em temperatura ambiente (22).

Caracterização bioquímica dos isolados e identificação da biovar

Para a confirmação da identidade dos isolados e classificação da biovar, foram realizados os seguintes testes bioquímicos clássicos: Teste de Gram, utilização de asparagina, oxidase, pigmentação fluorescente em meio King, produção de grânulos de poli- β -hidroxibutirato de acordo com Sands *et al.* (23). A determinação da biovar foi feita por meio dos testes de produção de ácidos a partir de fontes de carbono (lactose, maltose, celobiose) e álcoois (manitol, dulcitol e sorbitol) em tubos de micro-centrífuga Eppendorf® de 1,5 mL, segundo metodologia de Hayward (9) (Tabela 1). A avaliação foi feita aos três, sete e catorze dias através da mudança de coloração do meio. A mudança de cor de verde-azulada para amarela caracterizou a reação positiva. A não alteração na cor do meio caracterizou reação negativa.

Tabela 1. Caracterização dos isolados de *Ralstonia solanacearum* em biovars, segundo Hayward (1964)

Fontes de carbono	Biovars			
	1	2	3	4
Lactose	-	+	+	-
Maltose	-	+	+	-
Celobiose	-	+	+	-
Manitol	-	-	+	+
Sorbitol	-	-	+	+
Dulcitol	-	-	+	+

(+): Reação positiva

(-): Reação negativa

Fonte: Hayward (9).

Caracterização da agressividade de isolados de *R. solanacearum*

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, no setor de produção da Faculdade de Ciências Agrárias e no Laboratório de Microbiologia – FCA/UFAM, em Manaus. Os isolados foram recuperados em placas de Petri contendo meio Kelman (12) com tetrazólio para detecção de colônias virulentas, que foram transferidas para meio LPGA (14) e incubadas em BOD a 27 °C por 48 horas para o preparo da suspensão de inóculo. A

suspensão de inóculo, com concentração de 10^8 ufc.mL⁻¹ foi ajustada de acordo com a escala de McFarland (13), obtida pela adição de água estéril a cada placa e raspagem da superfície do meio com o auxílio de um pincel de cerdas macias.

O método de inoculação consistiu no ferimento das raízes, através da introdução de um bisturi no solo em torno do sistema radicular e vertendo-se, sobre as raízes feridas, 10 mL da suspensão de bactérias por planta. Após a inoculação, as plantas foram irrigadas diariamente, para manter o solo úmido e favorecer a ocorrência da murcha bacteriana. Para a produção das mudas do experimento, sementes da cultivar Cascadura Ikeda foram semeadas em copos de polietileno de 300 mL contendo mistura de terriço e substrato comercial Bioplant® na proporção de 3:1.

As avaliações foram feitas aos quatro, oito, 12, 16, 20 e 24 dias após a inoculação (DAI) em função da incidência e severidade da doença. Em cada avaliação foi registrado o número de plantas que apresentavam sintomas de murcha obtendo-se a incidência de plantas com sintomas. A avaliação da severidade foi visual através de uma escala de notas variando de 0 a 5 (32), onde: 0 = ausência de sintomas; 1 = uma folha parcialmente murcha; 2 = duas ou três folhas murchas; 3 = todas as folhas murchas exceto as do ápice; 4 = murcha da planta inteira e 5 = planta morta. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição composta de uma planta inoculada. O tratamento controle consistiu de cinco plantas inoculadas com água destilada esterilizada. Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SAEG versão 9.0.

Ensaio preliminar de resistência à murcha bacteriana

Após o ensaio de agressividade, foi realizado um ensaio preliminar com 25 acessos de *Capsicum* spp. (Tabela 2) quanto à resistência à murcha bacteriana. Para a inoculação foi

utilizado o isolado IRAND10 considerado o mais agressivo no ensaio anterior. Para a produção das mudas, sementes de cada um dos 25 acessos foram semeadas em copos de polietileno de 400 mL contendo mistura de terriço e substrato comercial Bioplant® na proporção de 3:1. As avaliações de incidência e severidade foram feitas conforme descrito no item anterior. Ao final da avaliação amostras de plantas com sintomas foram levadas ao Laboratório de Microbiologia da UFAM para reisolamento de *R. solanacearum*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição composta de duas plantas inoculadas e duas testemunhas tratadas com água destilada esterilizada. Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SAEG versão 9.0.

Tabela 2. Acessos da coleção de germoplasma de *Capsicum* spp., espécie e local de coleta. Manaus – AM, 2013

Identificação dos acessos	Espécie	Local de coleta
LA 01	<i>Capsicum chinense</i>	Lábrea
LA 02	<i>C. chinense</i>	Lábrea
MA 03	<i>C. chinense</i>	Manaus
AP 04	<i>C. chinense</i>	Apuí
MA 13	<i>C. chinense</i>	Manaus
MA 18	<i>C. chinense</i>	Manaus
AN 03	<i>C. chinense</i>	Anori
ATN 05	<i>C. chinense</i>	Atalaia do Norte
MA 35	<i>C. chinense</i>	Manaus
MA 19	<i>C. frutescens</i>	Manaus
MA 31	<i>C. chinense</i>	Manaus
IRB 01	<i>C. chinense</i>	Irاندuba
IRB 02	<i>C. chinense</i>	Irاندuba
IRB 03	<i>C. chinense</i>	Irاندuba
MA 34	<i>C. chinense</i>	Manaus
CO 01	<i>C. chinense</i>	Coari
MU 05	<i>C. frutescens</i>	Maués
AC CD (Cascadura Ikeda)	<i>C. annuum</i>	Comércio Local
AC MG (Magali R)	<i>C. annuum</i>	Comércio Local
AC NT (Nathalie)	<i>C. annuum</i>	Comércio Local
BC 01	<i>C. chinense</i>	Benjamin Constant
BC 05	<i>C. chinense</i>	Benjamin Constant
BC 06	<i>C. chinense</i>	Benjamin Constant
BC 12	<i>C. chinense</i>	Benjamin Constant
BC 16	<i>C. chinense</i>	Benjamin Constant

Os acessos listados estão identificados conforme nomenclatura atribuída pelo Laboratório de Microbiologia/FCA/UFAM onde as duas primeiras letras indicam o município de coleta do acesso e o número a seguir indica a ordem numérica dentre os acessos daquela localidade.

Após este ensaio preliminar foram selecionados os 12 acessos mais promissores (Tabela 3) para avaliar a atividade enzimática desses acessos em resposta à infecção por *R. solanacearum*.

Tabela 3. Acessos da coleção de germoplasma de *Capsicum* spp. selecionados para a avaliação enzimática das respostas de defesa. Manaus – AM, 2013

Identificação dos acessos	Espécie	Local de coleta
LA 01	<i>Capsicum chinense</i>	Lábrea
LA 02	<i>C. chinense</i>	Lábrea
AP 04	<i>C. chinense</i>	Apuí
ATN 05	<i>C. chinense</i>	Atalaia do Norte
MA 35	<i>C. chinense</i>	Manaus
AC CD (Cascadura Ikeda)	<i>C. annuum</i>	Comércio Local
AC NT (Nathalie)	<i>C. annuum</i>	Comércio Local
BC 01	<i>C. chinense</i>	Benjamin Constant
BC 05	<i>C. chinense</i>	Benjamin Constant
BC 06	<i>C. chinense</i>	Benjamin Constant
BC 12	<i>C. chinense</i>	Benjamin Constant
BC 16	<i>C. chinense</i>	Benjamin Constant

Obtenção dos extratos proteicos

A produção das mudas para a avaliação da atividade enzimática dos 12 acessos e as avaliações de incidência e severidade foram feitas da mesma forma que descrito no ensaio anterior. Ao final da avaliação amostras de plantas com sintomas foram levadas ao Laboratório de Microbiologia/UFAM para reisolamento de *R. solanacearum*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição composta de três plantas inoculadas e 10 testemunhas tratadas com água destilada esterilizada. Para avaliar a síntese de proteínas e enzimas relacionadas à defesa, foram feitas coletas amostrais de três folhas por planta aos 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação (h.a.i). As amostras coletadas foram higienizadas com gaze esterilizada umedecida em água destilada autoclavada, embaladas em papel alumínio, identificadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, em seguida foram levadas ao laboratório onde foram pesadas e armazenadas à - 20 °C para os ensaios posteriores.

Para obtenção dos extratos utilizados na determinação do teor de proteínas totais e atividade das enzimas PPO, FAL e POX, amostras de 0,1 g de tecido foliar foram maceradas

em cadinhos de porcelana na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e coletado o extrato em microtubos que foram centrifugados a $20.000g.30 \text{ min}^{-1}$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ em centrífuga (Eppendorf, 5810 R, USA). O sobrenadante foi recolhido e transferido para novos microtubos e estocado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para as determinações enzimáticas.

Dosagem de proteínas totais

O teste de Bradford (4) foi empregado para quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras. Para tanto, à um microtubo de 2 mL foram adicionados 800 μL do extrato protéico e 200 μl do reagente de Bradford. Após 5 min, foi efetuada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro (Thermo, Biomate 3, USA). A concentração de proteínas expressa em termos de equivalentes μg de albumina de soro bovino (ASB) em 1 mL de amostra ($\mu\text{g prote\u00edna.mL}^{-1}$), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB, variando de 0 a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as mostras foram preparadas em triplicata.

Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5)

A atividade de FAL foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (27). Em um microtubo de 2 mL foi adicionado 500 μL do extrato protéico, 400 μL do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 μL de L-fenilalanina (50 mM em tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8) e a seguir foi incubada a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h. Após, os tubos foram retirados e imediatamente resfriados em banho de gelo por 15 minutos para paralisar a reação. Em seguida procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro. A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração sendo subtraído de cada amostra do valor do controle (esse controle correspondeu a uma mistura 500 μL do extrato protéico e 900 μL de tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para o ácido *trans*-cinâmico e

atividade enzimática expressa em μg de ácido *trans*-cinâmico $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Atividade de polifenoloxidase (PPO, EC 1.10.3.1)

A atividade de PPO foi determinada pela quantificação da conversão do catecol em quinona conforme Kar e Mishra (11). Em um microtubo de 2 mL foi adicionado 900 μL do extrato protéico e 100 μL de catecol (20 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,8) e a seguir foi incubada a 30 °C por 1 h. As leituras foram feitas à 420 nm em espectrofotômetro, durante 1 min, a cada 10 s. O diferencial entre a terceira e a quinta leitura foi utilizado para a determinação da atividade enzimática. Os resultados foram expressos em unidades de PPO. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Atividade de peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade de POX foi determinada conforme Kar e Mishra (11). Em um microtubo de 2 mL foi adicionado 250 μL de água destilada, 750 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,8, 600 μL de solução de pirogalol 100 mM e 600 μL de peróxido de hidrogênio 100 mM e em seguida foi incubada a 25 °C por 5 min. Após este tempo foi adicionado 100 μL do extrato vegetal. As leituras foram feitas a 420 nm em espectrofotômetro, durante 5 min, a cada 60 s. O diferencial entre a terceira e a quinta leitura foi utilizado para a determinação da atividade enzimática. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção dos acessos de *Capsicum* spp

A avaliação do progresso da murcha bacteriana foi baseada na incidência e severidade da doença nos acessos durante 15 dias após a inoculação. As primeiras manifestações de sintomas da doença foram observadas no primeiro dia de avaliação (3º d.a.i.) para os genótipos AC CD, MA 13, MA 19, MA 35, IRB 01, IRB 02, IRB 03, CO 1, MU 5. O genótipo AC CD (cultivar Cascadura Ikeda) apresentou no primeiro dia de avaliação 26,7%

das plantas com sintomas de murcha. No quinto d.a.i. também foi possível agrupar como altamente suscetíveis os genótipos MA 19, com 93,3% de incidência e os genótipos MA 31, MA 34 com 86,7% de incidência. No sétimo d.a.i. esses três acessos já apresentavam 100% de incidência juntamente com os acessos IRB 01, IRB 02, IRB 03, CO 01, e MU 05. Com base nos dados de incidência deste sétimo d.a.i. foram selecionados 12 acessos com menor incidência para a avaliação das respostas de defesa. Ao final da avaliação todos os 25 genótipos avaliados apresentaram 100% de incidência da doença (Figura 1).

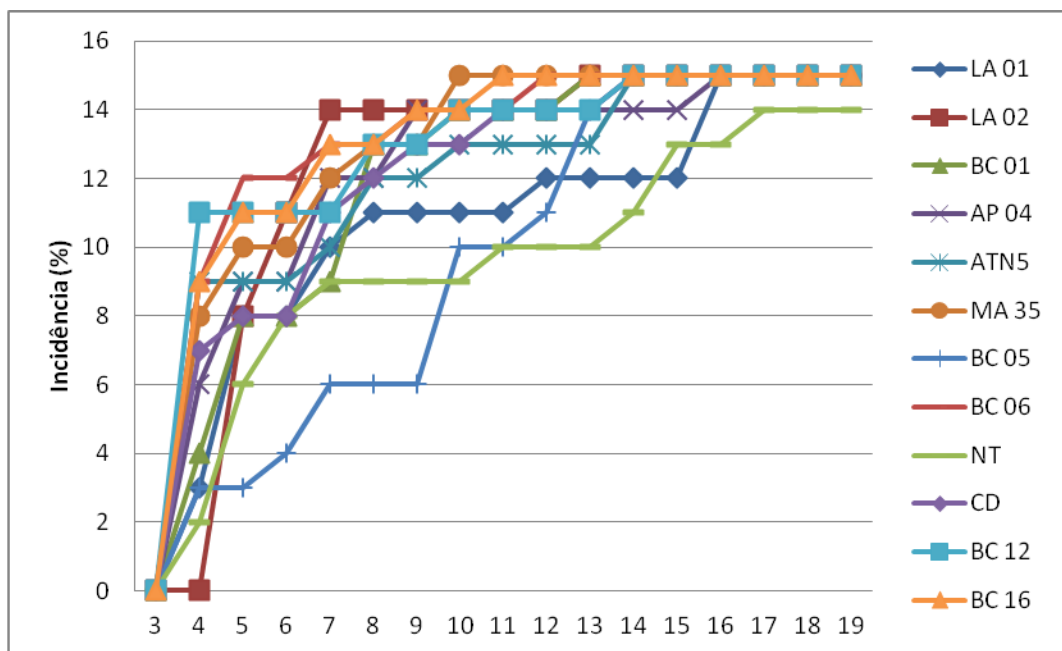


Figura 1. Progresso da murcha bacteriana em plantas de pimenta (*Capsicum* spp.) inoculadas com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum* em casa de vegetação. Manaus- AM, 2013.

A severidade da doença nos acessos avaliados apresentaram médias de notas que variaram de 1,41 nos acessos mais resistentes a 3,20 nos acessos mais suscetíveis. Os dados da severidade estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Severidade média de acessos de *Capsicum* spp. inoculados com um isolado da biovar 1 de *Ralstonia solanacearum* em casa-de-vegetação.

Acessos	Médias de severidade
MA 13	3,20 a
MA 18	3,19 a
AN 03	3,17 a
AC CD	3,16 a
IRB 01	3,11 a
AC MG	3,11 a
IRB 03	3,08 a
MA 31	3,04 a
MU 05	2,26 b
IRB 02	2,25 b
MA 34	2,24 b
CO 01	2,22 b
MA 19	2,22 b
LA 02	2,21 b
BC 01	2,19 b
MA 35	2,19 b
ATN 5	2,15 b
AP 04	2,12 b
AC MG	1,98 c
BC 16	1,96 d
AC NT	1,94 d
BC 01	1,62 d
LA 01	1,59 d
BC 12	1,55 d
BC 05	1,41 d

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os acessos avaliados apresentaram respostas variadas na resistência à murcha bacteriana com acessos apresentando elevada incidência e severidade e outros que manifestaram maior resistência à doença. A resistência, como capacidade da planta em ativar seus mecanismos de defesa, apresenta variabilidade entre os acessos estudados indicando que alguns acessos de *Capsicum* são mais eficientes, ativando mais rapidamente sua defesa e dificultando o estabelecimento da bactéria, resultando em níveis diferenciados de resistência e suscetibilidade.

Resultado semelhante também foi observado por Lima Neto (17) quando avaliou clones e cultivares de batata quanto à resistência à murcha bacteriana em campo de produção infestado com a biovar 1 de *R. solanacearum* e observou grandes variações. Neste estudo, os clones

“MB 03” e “MB 9846-01” apresentaram incidência abaixo de 10%, enquanto que as cultivares Catucha, Bintje e Monalisa foram extremamente suscetíveis apresentando mais de 70% de plantas murchas.

Em um novo experimento foi avaliada a severidade da murcha bacteriana dos 12 acessos mais promissores no primeiro ensaio. A severidade foi avaliada durante 14 d.a.i. As testemunhas não apresentaram manifestação de sintomas. Os acessos AC NT e BC 05 foram considerados resistentes apresentando médias de notas entre 0,94 a 1,17 respectivamente.

Os menores valores da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) também refletem a maior resistência desses acessos nas condições testadas (Tabela 5). Os acessos LA 01 e BC 01 foram considerados suscetíveis apresentando média de notas de 1,83 e 1,90. Todos os acessos restantes foram classificados como extremamente suscetíveis apresentando médias de notas entre 2,02 e 2,41 (Tabela 5). Os acessos de *Capsicum* mais suscetíveis não conseguem mobilizar suas respostas de defesa a tempo de conter a bactéria, permitindo uma rápida colonização e resultando no rápido declínio e morte da planta, não configurando como fontes de resistência à murcha bacteriana.

Tabela 5. Comportamento de acessos de *Capsicum* spp. avaliados pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) inoculados com biovar 1 de *Ralstonia solanacearum* em casa-de-vegetação.

Acessos	Média de notas	AACPD
BC 06	2,35 a	492,8 a
LA 02	2,41 a	472,0 a
CD	2,33 a	425,6 b
MA 35	2,14 b	406,4 b
BC 12	2,02 b	403,2 b
BC 16	2,21 b	399,2 b
ATN5	2,08 b	393,6 b
AP 04	2,09 b	380,8 b
BC 01	1,90 b	344,7 c
LA 01	1,83 b	308,0 c
NT	0,94 c	181,6 d
BC 05	1,17 c	180,0 d

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A diferença quanto à resposta de resistência apresentada por diferentes estirpes de *R.solanacearum* também já foi identificada por Lopes e Boiteux (18) em estudo que avaliaram 23 acessos de *Capsicum* considerados como resistentes à murcha bacteriana em Brasília, DF, inoculados com isolados de duas biovars diferentes e também observaram diferenças entre os acessos, entre os biovars e dentro da biovar 3. Plantas inoculadas com estirpes da biovar 1 foram assintomáticas ou apresentaram murcha leve. Uma linhagem de *C.chinense* (CNPH 970) e uma de *C.baccatum* (CNPH 1397) apresentaram resistência específica à isolados do do biovar 1 mas foram altamente suscetíveis à pelo menos duas estirpes do biovar 3.

Demosthenes e Bentes (7) também encontraram variados níveis de resistência entre acessos de *Capsicum* inoculados com um isolado da biovar 1 de *R. solanacearum*, e conseguiram identificar três acessos resistentes (20, 30 e 17). Foi possível observar a resposta de resistência diferenciada dos acessos avaliados anteriormente, e que a resistência de alguns acessos avaliados em estudo anterior não se manteve agora quando utilizado outro isolado, ainda que fosse da mesma biovar, confirmando que a manifestação da resistência dos acessos de *Capsicum* pode variar em virtude da estirpe utilizada da bactéria, demonstrando a grande variabilidade, agressividade e dificuldade no manejo da doença que este patógeno incita.

Fatores ambientais como aumento na temperatura ambiente, tipo de solo, manejo da irrigação também são fatores que podem contribuir para manifestação da resistência diferenciada. Neste estudo também foi possível confirmar a extrema susceptibilidade da cultivar Cascadura Ikeda que mais uma vez apresentou elevada severidade e valores da área abaixo da curva de progresso da doença (Tabela 5). A susceptibilidade desta cultivar representa um problema visto que ela ainda é muito utilizada pelos pequenos produtores da nossa região, favorecendo a manutenção da bactéria em áreas de produção de pimentão.

Teor de proteínas, atividade das enzimas PPO, FAL e POX

A atividade de proteínas apresentou dinâmica semelhante ao que já foi detectado em outros patossistemas, iniciando por um aumento inicial seguido pelo declínio após alguns dias da inoculação com o patógeno. Foi possível detectar um aumento no teor de proteínas totais a partir do 2º dia após a inoculação e depois ocorreu uma diminuição no teor de proteínas, sendo o aumento do teor de proteínas significativo a 5% de probabilidade (Tabela 6).

Nos primeiros cinco dias de avaliação, período em que foi realizada a coleta das plantas, somente os acessos mais suscetíveis, como CD, BC 06 e LA 02 já apresentavam a manifestação de sintomas, enquanto que os outros acessos ainda não manifestavam sintomas, ou apenas poucas plantas iniciavam a ter poucas folhas murchas no quinto d.a.i.. Mesmo não sendo detectado diferenças nos sintomas entre os acessos, um aumento gradual no teor de proteínas totais foi observado, provavelmente em virtude da mobilização de enzimas envolvidas nas respostas de defesa (Tabela 6). Este resultado está de acordo com os obtidos por Araujo e Stadnik (3) que também detectaram aumento no teor de proteínas totais em plântulas de macieira resistentes e suscetíveis inoculadas com *Colletotrichum gloesporioides* nas primeiras horas após a inoculação com o patógeno, indicando como a planta lança mão de suas reservas enzimáticas na tentativa de controlar a invasão pelo patógeno.

Tabela 6. Teores de proteínas totais em acessos de *Capsicum* aos 0, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação com biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*.

Identificação dos acessos	0 h.a.i.	24 h.a.i.	48 h.a.i.	72 h.a.i.	96 h.a.i.
LA 02	0,070b	0,072b	0,047e	0,041d	0,045c
AP 04	0,074b	0,084ab	0,041e	0,048d	0,05bc
ATN 05	0,063bc	0,087ab	0,063cd	0,041d	0,045c
MA 35	0,045c	0,050d	0,053d	0,043d	0,053c
AC CD	0,038c	0,042d	0,056d	0,065c	0,062b
AC NT	0,101a	0,125a	0,135a	0,105a	0,098 ^a
BC 01	0,074b	0,081ab	0,082c	0,075bc	0,047 ^a
BC 05	0,098ab	0,108a	0,102b	0,089b	0,084 ^a
BC 06	0,067b	0,072b	0,047e	0,047d	0,051c
BC 12	0,076b	0,080ab	0,043	0,050cd	0,050c
BC 16	0,043c	0,045d	0,052d	0,033e	0,038d

Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Também foi possível verificar que houve mudança no padrão de atividade das enzimas FAL e PPO. A atividade da PPO foi significativamente maior nas plantas inoculadas do que no tratamento controle mantendo um padrão crescente do 1º ao 2º dia após a inoculação, quando atingiu seu ponto máximo e reduzindo sua atividade após o 3º dia (figura 5). A atividade da enzima FAL apresentou comportamento semelhante aumentando sua atividade logo após a inoculação com o patógeno, alcançando o máximo no 2º d.a.i. e reduzindo nos dias seguintes (Figura 4). A atividade de FAL foi 47% maior no acesso LA 01 quando comparada com o acesso suscetível BC 12.

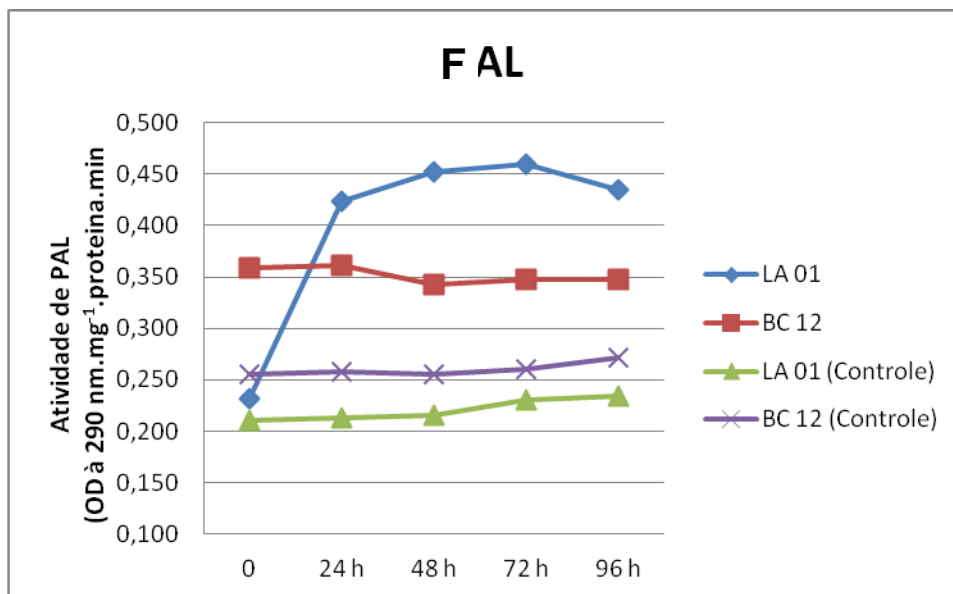


Figura 4. Atividade de fenilalanina amônia liase (FAL) em plantas de *Capsicum* spp. aos 0, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação com biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*.

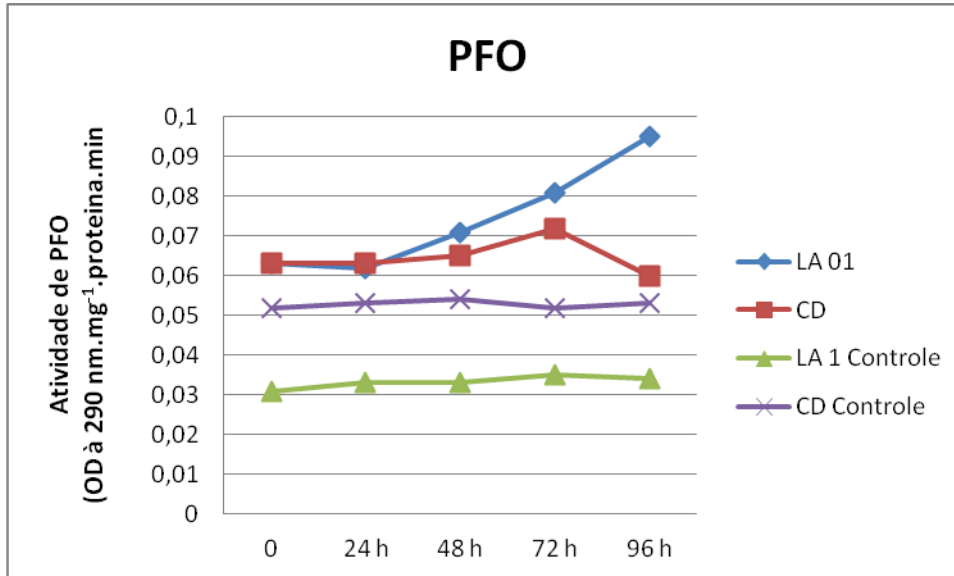


Figura 5. Atividade de polifenoloxidase (PPO) em plantas de *Capsicum* spp. aos 0, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação com biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*

Com base nos resultados podemos considerar que as enzimas FAL e PPO são possíveis componentes que estejam atuando na defesa das pimenteiças quando infectado por *R.solanacearum*, uma vez que dinâmica de aumento de atividade da FAL e PPO logo nos primeiro e segundo dia após a inoculação sugere que a planta esteja mobilizando suas armas na tentativa de conter a colonização pelo patógeno.

É sabido que plantas resistentes reconhecem mais rapidamente a presença do patógeno e ativam seus mecanismos de defesa de modo mais rápido para assim se proteger contra a invasão do patógeno. Quando o reconhecimento é mais tardio, em geral a planta tem maior dificuldade em conter o ataque o patógeno. Esta dinâmica de aumento da atividade dessa enzimas nos primeiro dias após a infecção por patógenos indica que a planta tenta mobilizar seus mecanismos de defesa para conter a invasão e concorda com estudo de Ngadze *et al.* (20) que ao estudarem o papel de diversas enzimas na resistência de tubérculos de batata contra *Pectobacterium atropsecticum* também identificaram o aumento dessas duas enzimas.

O resultado encontrado neste estudo estão de acordo com os de Vanitha *et al.* (28) que avaliaram o papel das ezimas FAL e PPO em tomateiro resistente e suscetível e conseguiram

identificar que a maior atividade destas enzimas, nas cultivares resistentes, ocorreu as 12 e 15 horas após a inoculação com *R. Solanacearum* enquanto nas cultivares suscetíveis a atividade ocorreu mais tardiamente, indicando que estas duas enzimas tem papel importante na defesa do tomateiro à murcha bacteriana.

A resistência também pode ser mediada pelo peróxido de hidrogênio, que é frequentemente associada com a atividade de peroxidases (POX). Houve diferença quanto na dinâmica da POX durante o período de coleta para os acessos mais resistentes quando comparado ao acesso suscetível e ao tratamento controle. Enquanto no acesso com maior nível de resistência (LA 01) a atividade da POX apresenta um aumento mais rápido, no acesso suscetível (CD) esta mobilização é mais lenta (Figura 6). No tratamento controle o aumento embora gradual apresenta-se num ritmo bem mais lento. Esta dinâmica pode ser entendida como a capacidade em mobilizar mais rapidamente seus mecanismos de defesa bioquímicos na tentativa da planta barrar a colonização por *R.solanacearum*.

Neste estudo a atividade de POX foi menor quando comparada a atividade da FAL, mas mesmo assim ela pode estar associada a outros mecanismos de resistência atuando em acessos de *Capsicum*. Andrade et al. (2) que também avaliaram a atividade de POX, PPO, GLU e LOX em resposta ao ataque de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em cultivares de tomateiro pulverizadas com ácido jasmônico, etefon e Bion e constataram dinâmica semelhante, onde puderam correlacionar o aumento na atividade das enzimas POX, PPO e LOX com a maior resistência apresentada pelo tomateiro. Neste estudo a atividades dessas enzimas foi maior entre o sexto e nono dias após a inoculação.

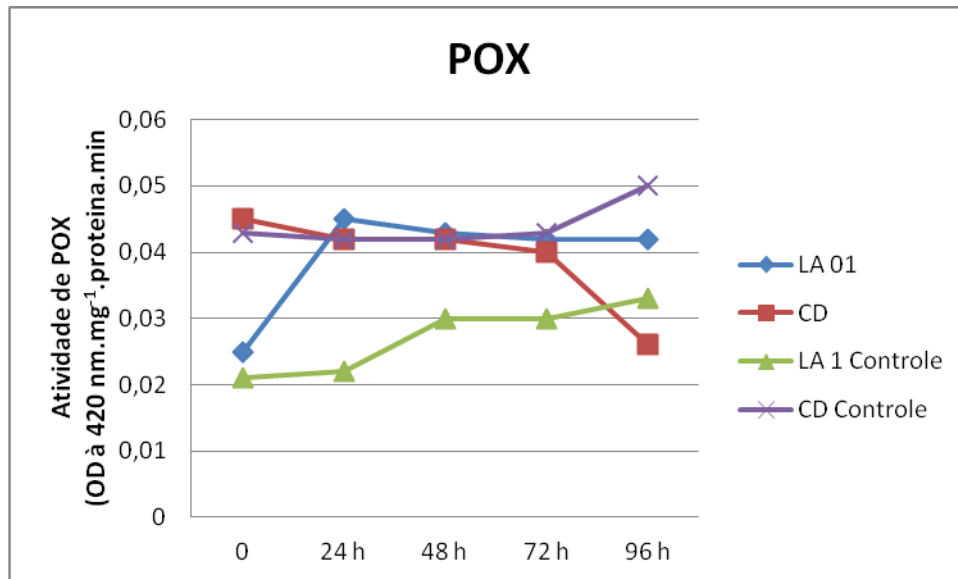


Figura 6. Atividade de peroxidase (POX) em plantas de *Capsicum* spp. aos 0, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação com biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Cada ponto representa a média de três repetições.

Diferente do que foi detectado neste estudo, Cavalcanti *et al.* (5) que avaliaram a atividade de peroxidases em tomateiro infectado com *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, previamente pulverizado com frações de extrato de lobeira infectado com *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, detectaram atividade diferenciadas nos genótipos resistentes e suscetíveis, detectando que a maior atividade da POX ocorreu cerca de 14 horas após a inoculação com o patógeno.

4. CONCLUSÃO

As enzimas fenilalanina amônia liase (FAL), polifenoloxidase (PPO) e peroxidase apresentaram maior atividade no acesso moderadamente resistente LA 01 em relação à cultivar Cascadura, considerado suscetível.

O aumento da atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (FAL) e da polifenoloxidase (PPO) durante a infecção por *R. solanacearum* nos acessos avaliados indica

que estas duas enzimas tem participação importante nos componentes de defesa bioquímicos em *Capsicum*.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPQ pelo suporte financeiro concedido que possibilitou a realização deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

1. Agrios, G.N. 2005. **Plant Pathology**. 5 th ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 922 p.
2. Andrade, C.C.L.; Resende, R.S.; Rodrigues, F.A.; Silveira, P.R.; Rios, J.A.; Oliveira, J. R.; Mariano, R.L.R. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, Brasília., v. 38, p. 28-34, 2013.
3. Araújo, L.; Stadinik, M. Processo infeccioso e atividade de enzimas em plântulas de macieira de genótipo resistente ou suscetível à mancha foliar de *Glomerella* causada por *Colletotrichum gloesporioides*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 241-248, 2011.
4. Bradford MMA (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254.
5. Cavalcanti, F.R.; Resende, M.L.V.; Oliveira, J.T.A. Proxidades ativadas por frações proteicas de extrato biológico eficaz na proteção do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n.6, p. 507-511, 2007.
6. Coelho Netto, R. A.; Pereira, B. G.; Noda, H; Boher, B. Murcha bacteriana no Estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 21-27, 2004.
7. Demosthenes, L.C.R.; Bentes, J.L.S. Fontes de resistência à murcha bacteriana em germoplasma de *Capsicum* spp. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, p. 251-256, 2011.
8. Durrant, W.E.; Dong, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 185-209, 2004.

9. Hayward, A.C. Characteristic of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, 27: 265-277, 1964.
10. Hayward, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 65-87, 1991.
11. Kar, M.; Mishra, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, 57: 315-319, 1976.
12. Kelman, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, 44: 693-695, 1954.
13. Király, Z.; Klement, Z. Solymosy, F.; Vörös, J. **Methods in Plant Pathology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 509 p., 1974.
14. Kpémoua, K.; Boher, B., Nicole, M.; Colatayud, P; Gêger, J.P. Cytochemistry of defense response in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihots*. **Canadian Journal Microbiology**, 42: 1131-1143, 1996.
15. Li, L.; Steffens, J.C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. **Planta**, 215: 239-247, 2002.
16. Lima, H. E de, Rêgo, E. R., Cavalcante, G.P.; Rêgo, M. M.; Cota, L.V. Reação em campo à murcha bacteriana de cultivares de tomate em Roraima. **Horticultura Brasileira**, Brasília, 28(2), 227-231, 2010.
17. Lima Neto, A.F.; **Avaliação da resistência de clones e cultivares de batata à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*)**. 2005. 86f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.
18. Lopes, C.A.; Boiteux, L.S. 2004. Biovar-specific and broad-spectrum sources of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in *Capsicum*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 4:350-355.
19. Markham, J.; Hille, J.; Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 4, p. 229-239, 2001.

20. Ngadze, E.; Icishahayo, D.; Coutinho, D.D.; Van der Waals, J.E. The role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid and total soluble phenols in the resistance of potatoes to soft rot. **Plant disease**, v. 96, p. 186-189, 2011.
21. Pascholati, S.F.; Leite, B. Hospedeiros: Mecanismos de Resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; Kimati, H.; Amorim L. **Manual de Fitopatologia**.v.1: il. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919 p.
22. Romeiro, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001, 279 p: il.
23. Sands, D.C. Physiological criteria – Determinative Tests. In: KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. **Methods in Phyto bacteriology**. Budapeste: Akadémiai Kiado, 1990. 568p.
24. Silva, F.A.C.; Santos, R.C.; Azevedo Neto, A.; Granja, M.M.C.; Souza, C.C.F.; Melo Filho, P.A. Descritores bioquímicos em cultivares de algodoeiro em resposta a inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Tropical Plant Pathology**, 35: 114-118, 2010.
25. Schwan-Strada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Pascholati, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: Pascholati, S.F., Leite, B., Stangarlin, J.R., CIA, P. eds., *Interação Planta Patógeno – Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, 2008, p. 228-248.
26. Stangarlin, J.R.; Kuhn, O.J.; Toledo, M.V.; Portz, R.L.; Schwan-Strada, K.R.F.; Pascholati, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos, **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n. 1, p. 18-46, 2011.
27. Umesha, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v. 34, p. 68-71, 2006.
28. Vanitha, S.C.; Niranjana, S.R.; Umesha, S. Role of Phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of tomato. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n.9, p. 552-557, 2009.

29. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**. v. 3, n.1, p. 2-20, 2010.
30. Wagura, A.G.; Kimenju, J.W.; Gichimu, B.M. Comparative antibacterial effects of raw extracts and essential oils of *Ocimum gratissimum* L. against *Ralstonia solanacearum* (Smith). **International Journal of Phytopathology**, vol 2, 144-152, 2011.
31. Wals, A.; Simon, O. β -Aminobutyric Acid-induced Resistance in *Cucumber* against Biotrophic and Necrotrophic pathogens. **Journal of Phytopathology**, v. 157, p. 356-351, 2009.
32. Winstead, N.N.; Kelman, A. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 42, p. 628-634, 1952.