

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal



A doença do mal murcho em Portugal: análise
fenética, filogenética e epidemiológica de isolados
de *Ralstonia solanacearum*

Maria Leonor Pato da Cruz

Tese orientada por: Prof. Doutor Rogério Paulo de Andrade Tenreiro
Prof. Doutora Maria Helena Correia de Oliveira

Doutoramento em Biologia
(Microbiologia)

2007

Neste trabalho incluem-se resultados das seguintes publicações, artigos submetidos para publicação e comunicações apresentadas em congressos:

Cruz L, Eloy M & Costa A. 2004. *Ralstonia solanacearum* – Áreas de risco e potenciais fontes de inóculo em Portugal. In: *Actas do 4º Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*. Universidade do Algarve, Faro, Portugal, 4 to 6 February 2004, p. 230-233.

Cruz L, Eloy M, Chambel L, Oliveira H & Tenreiro R. 2003. Genomic Diversity of Portuguese Populations of *Ralstonia solanacearum*. In: *Actas do Congresso Nacional de Microbiologia. MICRO2003*. Tomar, Portugal, 29 November to 2 December 2003, p.184.

Cruz L, Quirino F, Eloy M & Carrinho H. 2007. *Ralstonia solanacearum* Biovar 1 Associated With a New Outbreak Of Bacterial Wilt Disease In Portugal. In: *5º Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia. Livro de Resumos*, 2. Coimbra, Portugal.

Cruz L, Eloy M, Quirino F & Carrinho H. 2007. *Ralstonia solanacearum* Biovar 1 Associated With a New Outbreak Of Bacterial Wilt Disease In Portugal. (Submetido *Fitopatologia Mediterranea*).

Cruz L, Eloy M, Quirino F, Oliveira H & Tenreiro R. 2007. *Ralstonia solanacearum* complex in Portugal: unveiling the concealed epidemiological story. (Submetido *Plant Pathology*)

Cruz L, Sousa-Santos M, Costa A. & Carrinho H. 2001. Present Status of *Ralstonia solanacearum* in Portugal. In: *Proceedings of the 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, Évora, Portugal. p. 252-254.

Lyons N, **Cruz L** & Sousa-Santos M. 1999. A rapid screening test for *Ralstonia solanacearum*, the causative organism of bacterial wilt. In: *2º Workshop – Biotecnologia de Plantas*. Praxis XXI. Livro de Resumos. Universidade do Algarve, Faro, Portugal.

Lyons N, **Cruz L** & Sousa-Santos M. 2001. Rapid field detection of *Ralstonia solanacearum* in infected tomato and potato plants using *Staphylococcus aureus* slide agglutination test. *EPPO Bulletin* **31**:91-93.

Sousa Santos M, **Cruz L** & Lyons N. 1999. Avaliação da técnica PCR para detecção de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batateira. *2º Workshop Biotecnologia de plantas*. Praxis XXI. Livro de Resumos. Universidade do Algarve, Faro. Portugal.

Para efeitos do disposto no nº 2 do Art. 8º do Decreto-Lei 388/70, o autor da dissertação declara que participou na execução do trabalho experimental descrito, bem como na análise e discussão dos resultados e na redacção dos textos e artigos.

Pelo sonho é que vamos,
comovidos e mudos.
Chegamos? Não chegamos?
Haja ou não haja frutos,
pelo sonho é que vamos.
Basta a fé no que temos.
Basta a esperança naquilo
que talvez não teremos.
Basta que a alma demos,
com a mesma alegria,
ao que desconhecemos
e ao que é do dia a dia.
Chegamos? Não chegamos?
- Partimos. Vamos. Somos.

(Sebastião da Gama, Professor e Poeta da Arrábida)

|Aos meus filhos

|Agradecimentos

No final desta etapa já longa quero deixar presente nestas palavras o meu mais profundo agradecimento àqueles que de uma forma ou de outra acompanharam o amadurecimento deste projecto.

Assim, em primeiro lugar quero agradecer à minha família: ao meu marido Henrique, e aos meus filhos, Tomás e Beatriz, por toda a compreensão que demonstraram nestes últimos meses, pois o tempo que está escrito nestas linhas era deles; aos meus pais omnipresentes; ao meu irmão Eduardo e família, e ao meu sogro pelo seu discreto carinho e amizade.

Quero aqui também nomear àqueles que me receberam nas suas Instituições e confiaram no meu trabalho, abrindo novas etapas do meu crescimento como fitopatologista, desde o final da licenciatura: o Prof. Jorge Pinto Ganhão, a Eng^a Madalena Eloy e o Prof. Rogério Tenreiro.

O meu reconhecimento à Direcção-Geral de Protecção das Culturas (DGPC), onde desenvolvi a minha actividade profissional durante 13 anos, por toda a sensibilidade e interesse demonstrados neste doutoramento, e onde se criaram as condições necessárias ao desenvolvimento de grande parte do trabalho experimental, bem como da dissertação.

Ao Professor Rogério Tenreiro agradeço ter-me recebido no seu grupo de trabalho e ajudado a construir este trabalho, e também, o meu mais profundo reconhecimento pelo acompanhamento, entusiasmo e paciência sempre presentes durante a orientação desta tese.

À Professora Helena Oliveira, agradeço ter acompanhado o meu percurso académico e profissional desde 1989 como Professora, e como Orientadora do Estágio Final da Licenciatura, e das Teses de Mestrado e Doutoramento.

Ao Dr. Nigel Fredrick Lyons (a título póstumo), Investigador do Horticulture Research International (HRI), porque foi com ele que iniciei este trabalho, e com ele convivi durante alguns meses no HRI e no Laboratório de Bacteriologia da Direcção-Geral de Protecção das Culturas, aprendendo e crescendo.

À Doutora Amélia Lopes agradeço a sua colaboração na co-orientação deste trabalho e no acompanhamento e transmissão da sua evolução junto do Conselho Científico da DGPC. Quero ainda manifestar o meu apreço aos investigadores que, faseadamente, também acompanharam este percurso junto do Conselho Científico desta instituição, as Doutoradas Diamantina Louro e Eugénia Silva.

Uma palavra muito especial para a Fitopatologista Madalena Eloy, colega e amiga, que me acompanhou ao longo destes 13 anos da minha caminhada profissional na DGPC, pelos ensinamentos que me tem transmitido, pelo constante incentivo, e pela revisão crítica do Capítulo 2.

À Alice Almeida, Ana Neves, Fátima Martins, Maria Emília Martins e Teresa Palma (“as minhas senhoras”) quero expressar o meu apreço pelo importante trabalho que

desenvolveram na preparação de meios de cultura, de material de laboratório e actividade viveirista. À Odília Teixeira e à Paula Almeida, agradeço o seu apoio no secretariado.

Ao Paulo Manso, que participou no estudo apresentado no Capítulo 5 desta dissertação, agradeço a dedicação e amizade demonstrada durante a sua estadia no Laboratório de Bacteriologia da DGPC, para realização do seu Estágio Final do Curso de Engenheiro Agrónomo.

Quero também lembrar os colegas, amigos e docentes do Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências, da Universidade de Lisboa, e do Instituto de Ciência Aplicada à Tecnologia (ICAT), que simpaticamente me acolheram, acompanharam de forma mais próxima este trabalho, e me ajudaram a ultrapassar pequenos grandes problemas: a Tânia Tenreiro, a Sandra Chaves, o Mário Gadanho, o António Inês, a Lélia Chambel, a Sandra Casemiro e a Líbia Zé-Zé.

Aos colegas que passaram pelo Laboratório de Bacteriologia da DGPC Ana Costa, Eugénio Diogo, Francisco Quirino e Teresa Duarte quero expressar o meu agradecimento pelo seu interesse, companheirismo e compreensão.

À Engenheira Teresa Vasconcelos, do Departamento de Protecção das Plantas e Fitoecologia (DPPF) do Instituto Superior de Agronomia, gostaria de agradecer a sua valiosa colaboração na identificação de muitas espécies botânicas espontâneas estudadas como potenciais hospedeiras de *Ralstonia solanacearum*, bem como a cedência de sementes de *Solanum nigrum* utilizadas nos estudos do Capítulo 5.

Um agradecimento ao Colega Herberto Carrinho, da DGPC, pela frutuosa colaboração e amizade desenvolvida ao longo destes anos de trabalho comum em torno de *Ralstonia solanacearum*, e à Engenheira Manuela Charrua (DGPC) por me ter transmitido alguns dados históricos relevantes para o enriquecimento deste trabalho.

Aos inspectores fitossanitários das várias Direcções Regionais de Agricultura que participaram na colheita de amostras, no âmbito do "Plano de Luta contra *Ralstonia solanacearum*", muito particularmente aos Eng^{os} Henrique Vaz e Joaquim Linhã agradeço a sua dedicação e profissionalismo.

Ao Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos (LSAF) do ICAT gostaria de agradecer todo o apoio prestado na electroforese capilar dos fragmentos e sequenciações.

Gostaria ainda de referir os autores de algumas das fotografias gentilmente cedidas para utilização nesta dissertação: Nuno Barbosa, José Raul, Nigel Lyons, Madalena Eloy e Francisco Quirino.

Não posso também deixar de agradecer aos meus amigos, e a todas as pessoas que me deram uma palavra de amizade e incentivo.

Finalmente, quero agradecer a este trabalho por ter crescido com ele, e também porque gostei de aprender o que ele me ensinou.

|Resumo

Descreve-se o estado da arte dos conhecimentos mais relevantes e explicativos da doença do pus ou mal murcho e do seu agente causal – *Ralstonia solanacearum*. Enumeram-se os sintomas da doença em culturas solanáceas e o seu historial em Portugal, bem como as repercussões da sua presença a nível sócio-económico. Procede-se ao enquadramento sistemático e taxonómico do seu agente causal, evidenciam-se os conhecimentos despoletados pela sequenciação do genoma da estirpe GMI1000, e os desenvolvimentos ocorridos relativamente à patobiologia deste organismo. Finalmente, apresenta-se uma visão holística dos meios de protecção disponíveis.

Estuda-se a fidedignidade dos métodos de detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum*, e os condicionalismos subjacentes à natureza das amostras de origem biótica e ambiental, numa perspectiva de optimização de recursos. Critica-se a necessidade de implementar estratégias para optimização da aplicabilidade de novos métodos à rotina de um laboratório de análise.

Procede-se ao estudo epidemiológico dos resultados obtidos na identificação de *Ralstonia solanacearum*, a partir de amostras de diferentes matrizes, analisadas entre 1999 e 2006, retirando-se conclusões sobre os principais factores de risco, incidência e presença de condicionantes de natureza climática na dispersão deste organismo. Identificam-se ainda plantas espontâneas como hospedeiros alternativos, e analisa-se o seu potencial na manutenção da doença.

Através de uma abordagem polifásica, procede-se à caracterização fenética de uma colecção de isolados de *Ralstonia solanacearum*, e retiram-se conclusões sobre diferentes introduções deste organismo em Portugal. O estudo filogenético de um grupo de isolados, representativo da diversidade da colecção inicial, permitiu ainda esclarecer o enquadramento epidemiológico das estirpes deste organismo presentes no país a nível mundial, e verificar a introdução de uma nova população de largo espectro de hospedeiros.

Por fim, numa perspectiva da interacção patogéneo-hospedeiro, faz-se o estudo comparativo das potencialidades de *Solanum nigrum* e *Solanum dulcamara* na manutenção, infecção e colonização de *Ralstonia solanacearum*, em condições controladas.

Palavras chave: *Ralstonia solanacearum*, diagnóstico, epidemiologia, filotipos, hospedeiros alternativos.

|Abstract

The state of the art concerning relevant knowledge about bacterial wilt and its causative agent – *Ralstonia solanacearum* - is reviewed. Typical symptoms of disease on solanaceous crops, history and its economic impact in Portugal are described. The systematic and taxonomic outline of its agent is addressed and remarks on the progresses accomplished by the complete genome sequencing of strain GMI1000, as well as new pathobiological aspects, are highlighted. Topics on a holistic view of the available crop protection media are also presented.

Reliability of the diagnostic tools used in the detection and identification of *Ralstonia solanacearum*, and the restrictions created by samples nature, namely their biotic or environmental origin, are studied towards a resource optimization approach. The implementation of new strategies in order to optimize the use of novel detection methods in a diagnostic laboratory is discussed.

An epidemiological study is made based on the results obtained from analysed samples of different matrixes, for the detection and identification of *Ralstonia solanacearum*, between 1999 and 2006. Relevant risk factors are identified as well as the presence of environmental factors involved in its dispersion. Alternative hosts are also identified and their potential as inoculum sources was analysed.

Based on a polyphasic approach, a collection of *Ralstonia solanacearum* isolates is phenetically characterized and conclusions are drawn about different introductions of this organism in Portugal. A phylogenetic study, using a panel of isolates representative of the whole diversity of Portuguese strains, allowed to unveil the epidemiological story of this organism on a global view, and to identify the presence of a new population with a broad host range.

Finally, a comparative study of *Solanum nigrum* and *Solanum dulcamara*, concerning the host-pathogen interaction, enabled to disclose their role as alternative hosts in the infection and colonization process by *Ralstonia solanacearum*, under environmental controlled conditions.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, diagnostic tools, epidemiology, filotypes, alternative hosts.

ÍNDICE GERAL

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| | Índice de Figuras | vii |
| | Índice de Tabelas | xi |
| | Preâmbulo | 1 |
| Capítulo 1 | Introdução | 5 |
| 1.1 | A doença do pus ou mal murcho em <i>Solanum</i> spp. | 7 |
| 1.2 | O organismo causal - Enquadramento sistemático e taxonómico de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 10 |
| 1.3 | Importância socio-económica do cultivo de plantas solanáceas em Portugal | 11 |
| 1.4 | A doença do pus ou mal murcho em Portugal – História e Presente | 12 |
| 1.5 | O genoma da estirpe de <i>Ralstonia solanacearum</i> GMI 1000 | 16 |
| 1.6 | Patobiologia de <i>Ralstonia solanacearum</i> - Interação patogéneo x hospedeiro x ambiente | 18 |
| 1.7 | Estratégias para controlo e erradicação da doença | 22 |
| 1.7.1 | Profilaxia | 23 |
| 1.7.2 | Melhoramento genético | 25 |
| 1.7.3 | Medidas culturais | 26 |
| 1.7.4 | Medidas de controlo químico | 26 |
| 1.7.5 | Controlo Biológico | 27 |
| 1.7.6 | Implementação de Medidas de Quarentena | 28 |
| 1.8 | Referências Bibliográficas | 30 |
| Capítulo 2 | Fidedignidade do diagnóstico da doença do pus ou mal murcho e identificação do seu agente causal em amostras bióticas e ambientais | 35 |
| 2.1 | Detecção e Identificação de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar2/raça 3 – Desafios na evolução dos métodos de análise laboratorial | 37 |
| 2.2 | Objectivos | 44 |
| 2.3 | Métodos experimentais e de análise de dados | 45 |
| 2.3.1 | Fases do diagnóstico em diferentes matrizes | 45 |
| 2.3.1.1 | Tubérculos de batateira | 48 |

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| 2.3.1.2 | Plantas de batateira, tomateiro e de outras solanáceas cultivadas | 48 |
| 2.3.1.3 | Plantas espontâneas | 49 |
| 2.3.1.4 | Águas superficiais | 49 |
| 2.3.1.5 | Solos | 50 |
| 2.3.1.6 | Unidades de processamento industrial de tubérculos de batateira, tomate e pimento | 50 |
| 2.3.2 | Método de aglutinação em lâmina | 51 |
| 2.3.2.1 | Produção do antisoro policlonal e do reagente de aglutinação | 51 |
| 2.3.2.2 | Aglutinação em lâmina em plantas de tomateiro artificialmente inoculadas | 52 |
| 2.3.2.3 | Aglutinação <i>in situ</i> em plantas de tomateiro e de batateira | 52 |
| 2.3.2.4 | Detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> em extractos obtidos de amostras ambientais | 53 |
| 2.3.2.5 | Confirmação da identidade de colónias suspeitas em laboratório | 54 |
| 2.3.3 | Análise da fidedignidade dos métodos de rastreio utilizados na detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> em matrizes bióticas e ambientais | 54 |
| 2.4 | Análise dos Resultados | 55 |
| 2.4.1 | Ensaio de aglutinação em lâmina | 55 |
| 2.4.1.1 | Plantas infectadas artificialmente | 55 |
| 2.4.1.2 | Utilização <i>in situ</i> | 56 |
| 2.4.1.3 | Utilização em extractos de amostras ambientais | 57 |
| 2.4.1.4 | Utilização na confirmação da identificação de colónias suspeitas | 57 |
| 2.4.2 | Fidedignidade dos métodos de rastreio utilizados | 58 |
| 2.4.2.1 | Amostras bióticas | 58 |
| 2.4.2.2 | Amostras ambientais | 63 |
| 2.5 | Análise Global | 68 |
| 2.6 | Referências Bibliográficas | 75 |
| Capítulo 3 | Incidência da doença do pus ou mal murcho em Portugal (1999-2006). Factores de risco associados e implicações epidemiológicas. | 81 |
| 3.1 | Epidemiologia conhecida de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2/raça 3 em climas temperados | 83 |
| 3.2 | Objectivos | 85 |
| 3.3 | Métodos experimentais e de análise de dados | 86 |

| | | |
|-------------------|--|------------|
| 3.3.1 | Identificação de factores de risco | 86 |
| 3.3.1.1 | Tubérculos de batateira | 86 |
| 3.3.1.2 | Tomateiro e outras plantas solanáceas | 86 |
| 3.3.1.3 | Águas superficiais | 86 |
| 3.3.1.4 | Plantas espontâneas | 88 |
| 3.3.1.5 | Solos | 90 |
| 3.3.1.6 | Unidades de processamento industrial de tubérculos de batateira, tomate e pimento | 91 |
| 3.3.2 | Análise epidemiológica dos dados | 91 |
| 3.3.3 | Determinação da curva de progressão da doença (Estudo de Caso) | 92 |
| 3.4 | Análise dos dados experimentais | 94 |
| 3.4.1 | Incidência de <i>Ralstonia solanacearum</i> em diversas matrizes | 94 |
| 3.4.2 | Explorando o Contributo de Diferentes Factores de Risco. Que Evolução? | 98 |
| 3.4.2.1 | Tubérculos de Batateira | 98 |
| 3.4.2.2 | Plantas de batateira, tomateiro e de outras solanáceas cultivadas | 102 |
| 3.4.2.3 | Águas superficiais | 104 |
| 3.4.2.4 | Hospedeiros Alternativos | 112 |
| 3.4.2.5 | Solo | 117 |
| 3.4.2.6 | Unidades de processamento industrial de tubérculos de batateira, tomate e pimento | 120 |
| 3.4.3 | Análise da curva de progressão da doença em tomateiro (Estudo de Caso) | 121 |
| 3.5 | Discussão Global | 125 |
| 3.6 | Referências Bibliográficas | 129 |
| Capítulo 4 | Caracterização fenética e filogenética de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> obtidos em Portugal | 133 |
| 4.1 | Revisitando a diversidade conhecida de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 135 |
| 4.2 | Objectivos | 145 |
| 4.3 | Métodos experimentais e de análise de dados | 146 |
| 4.3.1 | Os Isolados | 147 |
| 4.3.2 | Estudo do perfil bioquímico para determinação do biovar | 150 |
| 4.3.3 | Estudo dos perfis electroforéticos das proteínas celulares totais | 151 |
| 4.3.3.1 | Preparação dos extractos proteicos totais | 151 |

| | | |
|-------------------|--|------------|
| 4.3.3.2 | Electroforese em sistema descontínuo | 152 |
| 4.3.3.3 | Análise numérica dos perfis electroforéticos de proteínas celulares totais | 152 |
| 4.3.4 | Estudo da diversidade genómica por BOX, ERIC e MSP-PCR | 153 |
| 4.3.4.1 | Extracção do DNA genómico | 155 |
| 4.3.4.2 | 'Primers' e condições de reacção e de amplificação | 155 |
| 4.3.4.3 | Análise numérica dos perfis de rep-PCR e MSP-PCR | 156 |
| 4.3.5 | Estudo da diversidade genómica por FAFLP ('Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism') | 157 |
| 4.3.5.1 | Obtenção do DNA genómico | 159 |
| 4.3.5.2 | Escolha das enzimas de restrição e dos adaptadores | 159 |
| 4.3.5.3 | Escolha dos 'primers' e condições de amplificação | 159 |
| 4.3.5.4 | Separação dos fragmentos por electroforese capilar | 159 |
| 4.3.5.5 | Análise numérica dos perfis de caracteres obtidos por FAFLP | 160 |
| 4.3.6 | Enquadramento filogenético dos isolados Portugueses de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 160 |
| 4.4 | Resultados e Discussão | 161 |
| 4.4.1 | Diferenciação nutricional dos isolados | 161 |
| 4.4.2 | Análise dos perfis electroforéticos das proteínas celulares totais | 163 |
| 4.4.3 | Análise dos perfis de 'fingerprinting' obtidos por rep-PCR e MSP-PCR | 172 |
| 4.4.4 | Análise de fragmentos obtidos por FAFLP | 186 |
| 4.4.5 | Análise Fenética Global | 194 |
| 4.4.6 | Análise Filogenética de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> em Portugal: história epidemiológica | 200 |
| 4.5 | Referências bibliográficas | 205 |
| Capítulo 5 | Patogenicidade de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2/raça 3 nos hospedeiros alternativos <i>Solanum nigrum</i> e <i>Solanum dulcamara</i> | 211 |
| 5.1 | Plantas espontâneas e outros hospedeiros "alternativos" | 213 |
| 5.2 | Objectivos | 218 |
| 5.3 | Métodos experimentais e de análise de dados | 219 |
| 5.3.1 | Culturas bacterianas | 219 |
| 5.3.2 | Material vegetal | 220 |
| 5.3.3 | Substratos | 220 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 5.3.4 | Observações e procedimentos laboratoriais | 221 |
| 5.3.5 | Tratamento dos dados analíticos | 222 |
| 5.4 | Análise dos resultados experimentais | 222 |
| 5.4.1 | Presença de sintomas em <i>Solanum nigrum</i> e <i>Solanum dulcamara</i> | 222 |
| 5.4.1.1 | Sintomas externos da parte aérea dos hospedeiros | 223 |
| 5.4.1.2 | Desenvolvimento radicular | 226 |
| 5.4.1.3 | Colonização dos vasos xilémicos | 227 |
| 5.4.2 | Sobrevivência e dinâmica das populações de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 232 |
| 5.4.2.1 | Efeito do hospedeiro sobre as populações do solo | 232 |
| 5.4.2.2 | Efeito de <i>Solanum dulcamara</i> sobre a população de <i>Ralstonia solanacearum</i> na água | 235 |
| 5.5 | Discussão e Conclusões | 236 |
| 5.6 | Referências bibliográficas | 239 |

Conclusões e Perspectivas Futuras **243**

Anexo

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| Capítulo 1 | Introdução | 5 |
| | Vala de rega de um aproveitamento hidro-agrícola (esquerda). | 5 |
| | Plântula de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculada apresentando sintomas de mal murcho (direita). | 5 |
| 1.1 | Sintomas da doença do pus ou mal murcho causada por <i>Ralstonia solanacearum</i> em plantas de batateira e tomateiro. | 9 |
| 1.2 | Casos de doença do pus ou mal murcho detectados entre 1940 e 1968 na Repartição dos Serviços Fitopatológicos. | 13 |
| 1.3 | Modelo de regulação global de genes ligados à patogenicidade em <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 22 |
| Capítulo 2 | Fidedignidade do diagnóstico da doença do pus ou mal murcho e identificação do seu agente causal em amostras bióticas e ambientais | 35 |
| | Pormenor de um corte de um caule de tomateiro com necrose dos feixes vasculares (esquerda). | 35 |
| | Colónias de <i>Ralstonia solanacearum</i> no meio semi-selectivo SMSA (direita). | 35 |
| 2.1 | Etapas sequenciais na detecção e identificação de <i>Ralstonia solanacearum</i> em diferentes matrizes após processamento inicial da amostra. | 47 |
| 2.2 | Reacção de aglutinação em lâmina. | 51 |
| 2.3 | Realização de ensaios de aglutinação <i>in situ</i> . | 53 |
| 2.4 | Representação gráfica da temperatura média das águas superficiais ao longo do ano, e da temperatura média anual para o período de 2000 a 2006. | 64 |
| 2.5 | Representação gráfica da sensibilidade e especificidade obtidas no ensaio de aglutinação em lâmina para detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> em extractos de plantas e na "identificação" de presumíveis colónias. | 69 |
| 2.6 | Resultados comparativos da sensibilidade e especificidade obtidos para diferentes métodos de rastreio utilizados na detecção e identificação de <i>R. solanacearum</i> em amostras bióticas. | 71 |
| 2.7 | Resultados comparativos da sensibilidade e especificidade obtidos para os diferentes métodos de rastreio utilizados na detecção e identificação de <i>R. solanacearum</i> em amostras ambientais. | 72 |

| | | |
|-------------------|--|------------|
| Capítulo 3 | Incidência da doença do pus ou mal murcho em Portugal (1999-2006). Factores de risco associados e implicações epidemiológicas. | 81 |
| | Plantas de <i>Solanum dulcamara</i> presentes numa vala de rega (esquerda). | 81 |
| | Ápice e uma planta de tomateiro com mal murcho (direita). | 81 |
| 3.1 | Incidência <i>Ralstonia solanacearum</i> em diferentes matrizes e valores dos limites mínimos e máximos dos intervalos de confiança associados. | 95 |
| 3.2 | Variação da frequência relativa do número total de amostras de tubérculos de batateira de origem nacional positivas, provenientes de batata-semente proposta à certificação bem como de batata-consumo nacional, analisadas no período de 1999 a 2006. | 99 |
| 3.3 | Variação da frequência relativa do número total de amostras de tomateiro positivas no período de 1999 a 2006. | 104 |
| 3.4 | Variação da frequência relativa do número total de amostras positivas em função da temperatura das águas superficiais de rega, para o período de 2000 a 2006. | 105 |
| 3.5 | Representação gráfica da temperatura média das águas superficiais e da frequência relativa de amostras positivas ao longo do ano, para o período de 2000 a 2006. | 107 |
| 3.6 | Ciclos médios anuais da temperatura mensal (mínima e máxima) e da precipitação (1961-1990). | 108 |
| 3.7 | Frequência relativa de amostras positivas quanto à presença de <i>Ralstonia solanacearum</i> nos oito aproveitamentos hidroagrícolas monitorizados entre 1999 e 2006. | 110 |
| 3.8 | Representação gráfica da evolução da frequência relativa de amostras positivas em cinco aproveitamentos hidroagrícolas monitorizados entre 1999 e 2006, por classes de anos para os mesmos pontos de colheita de águas superficiais. | 110 |
| 3.9 | Curvas de progressão de mal murcho do tomateiro num campo destinado à produção de tomate para transformação industrial. Áreas sob a curva de progresso da doença (AUDPC) em duas situações distintas. | 123 |
| Capítulo 4 | Caracterização fenética e filogenética de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> obtidos em Portugal | 133 |
| | Fragmento de um gel de SDS-PAGE (esquerda). | 133 |
| | Dendrograma de caracteres de FAFLP (direita). | 133 |
| 4.1 | Caracterização infra-específica de <i>Ralstonia solanacearum</i> . Esquema classificativo de Cook. | 139 |
| 4.2 | Árvore representativa das relações filogenéticas entre sequevares e filotipos. | 143 |
| 4.3 | Caracterização dos biovares e subfenótipos do biovar 2 de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 150 |
| 4.4 | Dendrograma obtido parabréplicas de <i>Psychrobacter immobilis</i> por SDS-PAGE | 164 |
| 4.5 | Perfis electroforéticos de proteínas celulares totais obtidos por SDS-PAGE para caracterização de estirpes de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 165 |

| | | |
|------|--|-----|
| 4.6 | Dendrograma de perfis de 'fingerprinting' por SDS-PAGE, obtido utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de <i>Ralstonia solanacearum</i> , bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados. | 167 |
| 4.7 | Dendrograma de perfis SDS-PAGE para caracterização de isolados de águas superficiais. | 169 |
| 4.8 | Dendrograma de perfis SDS-PAGE para caracterização de isolados obtidos a partir de águas superficiais de Cela e Sorraia (A) e Lis (B). | 170 |
| 4.9 | Dendrograma de perfis SDS-PAGE para caracterização de isolados provenientes de plantas espontâneas. | 170 |
| 4.10 | Dendrograma de perfis SDS-PAGE para caracterização de isolados obtidos de <i>Solanum tuberosum</i> . | 171 |
| 4.11 | Dendrograma de perfis SDS-PAGE u para caracterização de isolados obtidos de <i>Lycopersicon esculentum</i> . | 171 |
| 4.12 | Perfis electroforéticos de 'fingerprinting' obtidos por BOX-PCR a partir de estirpes de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 173 |
| 4.13 | Perfis electroforéticos de 'fingerprinting' obtidos por ERIC-PCR a partir de estirpes de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 173 |
| 4.14 | Perfis electroforéticos de 'fingerprinting' obtidos por MSP-PCR a partir de estirpes de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 174 |
| 4.15 | Dendrograma de perfis de 'fingerprinting' por MSP-PCR ('primer' csM13), obtido utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de <i>Ralstonia solanacearum</i> , bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados. | 175 |
| 4.16 | Dendrograma de perfis de 'fingerprinting' por BOX-PCR ('primer' BOX A1R), obtido utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de <i>Ralstonia solanacearum</i> , bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados. | 177 |
| 4.17 | Dendrograma de perfis de 'fingerprinting' por ERIC-PCR ('primer' ERIC2), obtido utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de <i>Ralstonia solanacearum</i> , bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados. | 179 |
| 4.18 | Dendrograma composto de perfis de 'fingerprinting' por csM13-, BOXA1R- e ERIC2-PCR , obtido a partir da média das experiências e utilizando UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de <i>Ralstonia solanacearum</i> , bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados. | 183 |
| 4.19 | Janela do software CEQ 8000 mostrando perfis obtidos por electroforese capilar em sequenciador automático a partir dos fragmentos de AFLP. | 188 |
| 4.20 | Dendrograma de perfis de caracteres por "Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism" (FAFLP), obtido a partir do coeficiente de Dice e utilizando UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de <i>Ralstonia solanacearum</i> , bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados. | 189 |
| 4.21 | Dendrograma de perfis de FAFLP para caracterização de isolados obtidos a partir de águas superficiais de rega. | 191 |
| 4.22 | Dendrograma de perfis de FAFLP para caracterização de isolados obtidos a partir de <i>Solanum tuberosum</i> . | 192 |
| 4.23 | Dendrograma de perfis de FAFLP para caracterização de isolados obtidos a partir de <i>Lycopersicon esculentum</i> . | 192 |

| | | |
|-------------------|--|------------|
| 4.24 | Dendrograma de perfis de FAFLP para caracterização de isolados obtidos a partir de plantas espontâneas. | 193 |
| 4.25 | Dendrograma composto de perfis de 'fingerprinting' (SDS-PAGE, CsM13-, BOXA1R- e ERIC2-PCR e FAFLP) obtido a partir da média das experiências e utilizando UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de <i>Ralstonia solanacearum</i> , bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados. | 197 |
| 4.26 | Análise comparativa dos diferentes métodos de 'fingerprinting'. | 200 |
| 4.27 | Filogenia de <i>Ralstonia solanacearum</i> construída a partir da análise de 149 sequências de 750 bp do gene da endoglucanase (<i>egl</i>) utilizando uma abordagem bayesiana. | 203 |
| Capítulo 5 | Patogenicidade de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2/raça 3 nos hospedeiros alternativos <i>Solanum nigrum</i> e <i>Solanum dulcamara</i> | 211 |
| | Planta de <i>Solanum nigrum</i> apresentando sintomas de mal murcho (esquerda). | 211 |
| | Plantas de <i>Solanum dulcamara</i> com as raízes imersas em água (direita). | 211 |
| 5.1 | Sobrevivência de <i>Ralstonia solanacearum</i> em solo artificialmente infestado com diferentes concentrações do patógeno, na ausência de plantas hospedeiras 7, 21 e 35 dias após inoculação. | 233 |
| 5.2 | Sobrevivência de <i>Ralstonia solanacearum</i> em solo artificialmente infestado com diferentes concentrações do patógeno, na presença de <i>Solanum dulcamara</i> , 7, 21 e 35 dias após inoculação. | 233 |
| 5.3 | Sobrevivência de <i>Ralstonia solanacearum</i> em solo artificialmente infestado com diferentes concentrações do patógeno, na presença de <i>Solanum nigrum</i> 7, 21 e 35 dias após inoculação. | 234 |
| 5.4 | Sobrevivência de <i>Ralstonia solanacearum</i> em água infestada com diferentes concentrações do patógeno, na presença de <i>Solanum dulcamara</i> . Relação entre a população inicial e a população real após 35 dias de ensaio. | 236 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Capítulo 1 | Introdução | 5 |
| 1.1 | Exemplos de produtos utilizados na desinfecção de alfaias agrícolas e locais de armazenamento de tubérculos de batateira. | 25 |
| 1.2 | Agentes biológicos estudados no controlo de <i>Ralstonia solanacearum</i> em diferentes matrizes. | 28 |
| Capítulo 2 | Fidedignidade do diagnóstico da doença do pus ou mal murcho e identificação do seu agente causal em amostras bióticas e ambientais | 35 |
| 2.1 | Projectos de investigação científica integrando estudos sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> promovidos pela União Europeia em vários domínios. | 38 |
| 2.2 | Análise comparativa dos limiares de detecção para os diferentes métodos de diagnóstico utilizados na detecção e identificação de <i>Ralstonia solanacearum</i> em extracto obtido de tubérculos de batateira contaminados artificialmente. | 39 |
| 2.3 | Métodos de análise laboratorial utilizados nas diferentes fases do diagnóstico em função da matriz. | 46 |
| 2.4 | Resultados dos ensaios de aglutinação em lâmina e recuperação de <i>Ralstonia solanacearum</i> de três locais das plantas inoculadas, durante um período de incubação necessário ao desenvolvimento de sintomas da doença. | 56 |
| 2.5 | Fidedignidade de diferentes métodos de diagnóstico na detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> em tubérculos de batateira utilizando o isolamento em meio gelosado modificado SMSA como 'gold standard'. | 59 |
| 2.6 | Fidedignidade de diferentes métodos de diagnóstico na detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> em tomateiro utilizando o isolamento em meio gelosado modificado SMSA como 'gold standard'. | 61 |
| 2.7 | Resultados de alguns ensaios laboratoriais efectuados, relativamente à localização de <i>Ralstonia solanacearum</i> , em plantas de <i>Solanum dulcamara</i> com necrose dos feixes vasculares. | 62 |
| 2.8 | Fidedignidade dos métodos de aglutinação em lâmina (AGL) e PCR após enriquecimento (E-PCR) na detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> em plantas espontâneas, utilizando o isolamento em meio gelosado modificado SMSA como 'gold standard'. | 62 |
| 2.9 | Fidedignidade dos diferentes métodos de rastreio utilizados na detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> em águas superficiais, utilizando o isolamento em meio gelosado modificado SMSA como 'gold standard'. | 65 |

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| 2.10 | Fidedignidade dos métodos de Imunofluorescência após enriquecimento (E-IIF) e PCR após enriquecimento (E-PCR) na detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> no solo, utilizando o isolamento em meio gelosado modificado SMSA como 'gold standard'. | 66 |
| 2.11 | Fidedignidade dos métodos de Imunofluorescência após enriquecimento (E-IIF) e PCR após enriquecimento (E-PCR) na detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> em resíduos de indústrias, utilizando o isolamento em meio gelosado modificado SMSA como 'gold standard'. | 67 |
| 2.12 | Métodos de análise laboratorial a utilizar nas diferentes fases do diagnóstico em função da matriz. | 74 |
| Capítulo 3 | Incidência da doença do pus ou mal murcho em Portugal (1999-2006). Factores de risco associados e implicações epidemiológicas. | 81 |
| 3..1 | Frequência relativa de amostras positivas obtida nos aproveitamentos hidroagrícolas monitorizados entre 1999 e 2001. | 87 |
| 3.2 | Aproveitamentos hidroagrícolas e respectivos pontos de colheita de águas superficiais monitorizados no período de 1999-2006. | 89 |
| 3.3 | Incidência de <i>Ralstonia solanacearum</i> em diferentes matrizes, em Portugal, no período de 1999-2006. | 94 |
| 3.4 | Evolução do número de amostras tubérculos batata-semente propostas à certificação entre 1999 e 2006, por Concelho na região de Trás-os-Montes, e respectivo número de lotes infectados. | 100 |
| 3.5 | Evolução do número de amostras de tubérculos de batata-consumo de origem nacional analisadas entre 1999 e 2006, por região, e respectivo número de casos positivos. | 101 |
| 3.6 | Amostras de tomateiro colhidas entre 1999 e 2006 e distribuição de casos positivos e negativos. | 103 |
| 3.7 | Aproveitamentos hidroagrícolas monitorizados relativamente à presença de <i>Ralstonia solanacearum</i> em amostras águas superficiais de rega, para o período de 1999 a 2006. | 106 |
| 3.8 | Espécies botânicas hospedeiras alternativas de <i>Ralstonia solanacearum</i> em Portugal, no período de 1999-2006. | 113 |
| 3.9 | Risco associado à presença de algumas espécies botânicas hospedeiras alternativas de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 114 |
| 3.10 | Plantas espontâneas apresentando doença vascular causada por <i>Ralstonia solanacearum</i> e presença de sintomas típicos de mal murcho. | 116 |
| 3.11 | Parcelas de diferentes regiões infectadas com <i>Ralstonia solanacearum</i> no ano de 1995 para as quais se procedeu à análise de amostras de solo no ano de 1999, e respectivo resultado da análise laboratorial. | 117 |
| 3.12 | Relação entre as características físico-químicas dos solos utilizados e a presença de sintomas da doença do mal murcho causada por <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 118 |
| 3.13 | Avaliação do ajustamento de três modelos para descrever a progressão da doença do mal murcho e para estimar a taxa de progresso da doença (r) num campo de tomateiro ao ar livre na região de Muge. | 124 |

| | | |
|-------------------|---|------------|
| Capítulo 4 | Caracterização fenética e filogenética de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> obtidos em Portugal | 133 |
| 4.1 | Ensaio conduzido para determinação de algumas raças de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 136 |
| 4.2 | Ensaio bioquímico para determinação dos biovars de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 137 |
| 4.3 | Ensaio bioquímico para diferenciação de subfenótipos do biovar 2 de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 137 |
| 4.4 | Colecção de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi <i>et al.</i> (1995) obtidos em Portugal e de isolados de outras origens geográficas, bem como de organismos relacionados utilizados nos estudos de diversidade fenotípica e genómica. | 148 |
| 4.5 | Reprodutibilidade média, desvio padrão (s) e coeficiente de variação obtidos em diferentes métodos de 'fingerprinting' genómico, utilizando lisados bacterianos e condições de electroforese pouco padronizadas. | 174 |
| 4.6 | Valores dos índices de diversidade de Simpson (D) e de Shannon-Weiner (H' e J') obtidos para MSP-PCR e rep-PCR. | 182 |
| 4.7 | Comparação de diferentes índices de diversidade obtidos para os diferentes métodos de 'fingerprinting' genómico utilizados na avaliação do poder discriminante de cada método. | 195 |
| Capítulo 5 | Patogenicidade de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2/raça 3 nos hospedeiros alternativos <i>Solanum nigrum</i> e <i>Solanum dulcamara</i> | 211 |
| 5.1 | Modalidades de inóculo a utilizar no ensaio de sobrevivência de <i>Ralstonia solanacearum</i> , e respectivas concentrações. | 219 |
| 5.2 | Análise de variância sobre os factores hospedeiro (<i>Solanum nigrum</i> e <i>Solanum dulcamara</i>) e concentração de inóculo no substrato solo. | 224 |
| 5.3 | Presença de sintomas de murchidão em plantas de <i>Solanum nigrum</i> (Sn) e <i>Solanum dulcamara</i> (Sd) expostas a diferentes níveis de infestação do solo. | 224 |
| 5.4 | Análise de variância sobre os factores substrato (solo e água) e concentração de inóculo no hospedeiro <i>Solanum dulcamara</i> . | 225 |
| 5.5 | Presença de sintomas de murchidão em plantas de <i>Solanum dulcamara</i> (Sd) expostas a diferentes níveis de infestação do solo (s) e da água (a). | 225 |
| 5.6 | Frequência relativa de plantas de <i>Solanum nigrum</i> e <i>Solanum dulcamara</i> , expostas a diferentes níveis de infestação do solo e da água, apresentando atrofia do sistema radicular, no final do ensaio. | 226 |
| 5.7 | Análise de variância sobre os factores hospedeiro (<i>Solanum nigrum</i> e <i>Solanum dulcamara</i>) e concentração de inóculo no desenvolvimento radicular. | 226 |
| 5.8 | Presença de desenvolvimento radicular anómalo em plantas de <i>Solanum nigrum</i> (Sn) e <i>Solanum dulcamara</i> (Sd) expostas a diferentes níveis de infestação do solo (s) e da água (a). | 228 |

| | | |
|------|--|-----|
| 5.9 | Análise de variância sobre os factores local do caule de <i>Solanum dulcamara</i> e concentração de inóculo no substrato água, na colonização dos vasos xilémicos por <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 228 |
| 5.10 | Presença de necrose dos feixes vasculares em plantas de <i>Solanum dulcamara</i> expostas a diferentes níveis de infestação de água. | 229 |
| 5.11 | Presença de necrose dos feixes vasculares em plantas de <i>Solanum dulcamara</i> expostas a diferentes níveis de infestação do solo. | 230 |
| 5.12 | Análise de variância sobre os factores binómio hospedeiro-substrato e concentração de inóculo, na colonização dos vasos xilémicos por <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 230 |
| 5.13 | Presença de necrose dos feixes vasculares junto à raiz de plantas de <i>Solanum nigrum</i> (Sn) e <i>Solanum dulcamara</i> (Sd) expostas a diferentes níveis de infestação do solo (s) e água (a). Comparação múltipla obtida pelo teste de Tukey (HSD). | 231 |
| 5.14 | Frequência relativa do número total de plantas evidenciando diferentes tipos de sintomas de doença causada por <i>Ralstonia solanacearum</i> , biovar 2/raça 3, para os vários binómios hospedeiro-substrato. | 232 |
| 5.15 | Análise de variância para determinação da influência dos factores hospedeiro e concentração de inóculo no solo 7 dias após o estabelecimento do ensaio na manutenção de populações de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 234 |
| 5.16 | Análise de variância para determinação da influência dos factores hospedeiro e concentração de inóculo no solo 21 dias após o estabelecimento do ensaio na manutenção de populações de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 235 |
| 5.17 | Análise de variância para determinação da influência dos factores hospedeiro e concentração de inóculo no solo 35 dias após o estabelecimento do ensaio na manutenção de populações de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 235 |

| Preâmbulo

Ralstonia solanacearum é um organismo bacteriano fitopatogénico, que pelos danos causados se encontra, presentemente, regulado pela legislação da União Europeia, sendo considerada com organismo de quarentena no Espaço Comunitário. Encontra-se presentemente integrado num complexo de espécies de distribuição mundial e possui uma enorme variabilidade, que se encontra caracterizada pela definição de biovars e alguns subfenótipos, raças, divisões e, mais recentemente, pela criação de filotipos e sequevars.

A recorrência da doença do pus ou mal murcho, causada por *Ralstonia solanacearum* biovar 2, subfenótipo A, raça 3, em Portugal e em variados Europa no final do século XX, criou enormes constrangimentos à produção de culturas solanáceas e inúmeros prejuízos de natureza socio-económica.

O conhecimento sobre o comportamento destas estirpes, agora aparentemente adaptadas a climas mais temperados, era reduzido uma vez que os focos da doença referidos em alguns países da Europa na primeira metade daquele século pareciam esporádicos e por vezes de caracterização duvidosa.

Esta pandemia lançou assim novos desafios, pela imperiosa necessidade de controlar e erradicar aquele organismo de quarentena do espaço Europeu. Deste modo tornava-se também imprescindível possuir métodos de análise laboratorial adequados à sua detecção e identificação de modo a proceder à sua caracterização, conhecer a sua bioecologia e controlar factores responsáveis pela sua manutenção.

Em Portugal a Direcção-Geral de Protecção das Culturas (DGPC), à data detentora do estatuto de autoridade fitossanitária nacional, empreendeu, com a colaboração de algumas Direcções-Regionais de Agricultura, o "Plano de Luta Contra *Ralstonia solanacearum*". Os principais objectivos deste programa eram conhecer a situação nacional relativamente à presença do agente causal da doença do pus ou mal murcho, implementar políticas fitossanitárias de controlo e erradicação, e proceder a estudos com vista a um conhecimento mais aprofundado do complexo de espécies de *Ralstonia solanacearum* em Portugal.

É no âmbito deste Plano que se desenvolveram parte dos estudos apresentados nesta dissertação. Em 1999 iniciámos a análise laboratorial de amostras colhidas em prospecções efectuadas em todo o território continental, geralmente colhidas por inspectores fitossanitários e com origem em regiões com produção de culturas solanáceas irrigadas. Coube-nos proceder à detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* nas matrizes tomateiro e outras culturas solanáceas, plantas espontâneas, águas superficiais de irrigação, solos e resíduos resultantes do processamento industrial de tubérculos de batateira, tomate e pimento. A análise de tubérculos de batateira de origem nacional, nomeadamente batata-semente proposta para certificação e batata-consumo, bem como de países comunitários ou terceiros, foi, ao longo destes anos da responsabilidade de colegas do Laboratório de Bacteriologia da DGPC. Além de um conhecimento abrangente sobre a realidade desta doença e do seu agente causal, este trabalho de rotina

permitiu a recolha de um vasto número de isolados com diferentes origens geográficas e provenientes de variadas matrizes bióticas e ambientais.

Durante o período supracitado, o trabalho de investigação foi realizado a par do trabalho de rotina, complementando-se de forma sinérgica, permitindo a resolução de problemas práticos e abrindo espaços para novas pesquisas. Esta dissertação é pois o resultado de uma investigação aplicada que pretendeu dar resposta aos objectivos iniciais e obter novos conhecimentos, que poderão não ser faustosos tendo em conta a amplitude de equipas investigação que a nível mundial desenvolvem trabalhos nesta área, mas que permitiram obter um conhecimento abrangente sobre a realidade da doença do pus ou mal murcho em Portugal.

Esta dissertação apresenta um capítulo introdutório (Capítulo 1) que visa expor o estado da arte dos conhecimentos mais relevantes sobre a doença e seu organismo causal, com particular ênfase para as estirpes do biovar 2 (raça 3), e meios os meios de controlo disponíveis, bem como elucidar acerca da história da doença em Portugal. Nos restantes capítulos, após uma introdução sobre os conhecimentos de partida para o trabalho aí desenvolvido faz-se referência aos objectivos, descrevem-se os métodos experimentais, as ferramentas utilizadas na análise dos resultados obtidos e procede-se à sua análise crítica.

Assim, no Capítulo 2, apresenta-se o estudo comparativo da panóplia de métodos de análise utilizados no diagnóstico da doença em amostras bióticas e na detecção e identificação do seu agente causal em amostras ambientais, com vista à avaliação dos seus indicadores de fidedignidade, e expõem-se alternativas visando alcançar a optimização da eficiência da sua aplicação em rotina laboratorial. Dos trabalhos apresentados neste capítulo resultou ainda obtenção da colecção de isolados utilizados em estudos desenvolvidos em capítulos posteriores.

O Capítulo 3 aborda a incidência de *Ralstonia solanacearum* em diferentes matrizes, para o período de 1999 a 2006, identificando os principais factores de risco para a manutenção da doença em Portugal. Efectua-se igualmente a análise da doença em termos evolutivos nos diferentes aproveitamentos hidro-agrícolas estudados e identificam-se assimetrias decorrentes da influência de condicionantes climáticas distintas. Averigua-se ainda igualmente o contributo de diferentes espécies de plantas espontâneas na manutenção de *Ralstonia solanacearum*. Finalmente, retira-se as consequências epidemiológicas dos diferentes factores estudados.

No Capítulo 4, através de um estudo polifásico, onde se inclui a determinação do biovar, a análise quimiotaxonómica das proteínas celulares totais por SDS-PAGE, o 'fingerprinting' genómico por M13-, e de ERIC- e BOX-PCR, e ainda, a análise de AFLPs com resolução dos fragmentos amplificados suportada por sequenciador automático, procede-se ao estudo da diversidade dos isolados de *R. solanacearum* obtidos em Portugal e identifica-se o seu perfil de virulência e a escala de hospedeiros esperada. Identificam-se igualmente fenómenos de diversificação e adaptação e, pela análise filogenética de uma sequência de 750 pb do gene da endoglucanase, reconstrói-se a história epidemiológica de *R. solanacearum* em Portugal.

O Capítulo 5 apresenta um estudo comparativo sobre a contribuição das espécies espontâneas identificadas como principais hospedeiros alternativos nos países do Norte e Sul da Europa, *Solanum dulcamara* e *Solanum nigrum*, respectivamente. Através de um ensaio realizado em

condições controladas, eliminando a influência de condicionantes ambientais de difícil contabilização, averigua-se o contributo das duas espécies solanáceas para albergar *R. solanacearum* quer endofiticamente, quer ao nível da sua rizosfera, na presença de diferentes níveis de infestação.

No final da primavera de 2007, a identificação da introdução de uma nova população de *R. solanacearum*, pertencente ao subcluster B do filotipo II, em campos do aproveitamento hidroagrícola do Baixo Mondego lançou um novo desafio, por se tratar de uma estirpe com um perfil de virulência muito distinto possuindo um largo espectro de hospedeiros.

Isolados desta nova população foram ainda introduzidos em estudos do Capítulo 4 desta dissertação, embora, por se tratar de um acontecimento muito recente, não tenha sido possível proceder à caracterização completa do seu potencial patogénico, bem como da sua dispersão e gama de potenciais hospedeiros, de modo a avaliar o risco inerente à implantação de novas culturas em locais onde essa população possa vir a tornar-se endémica.

Além das referências ao trabalho desenvolvido nesta dissertação, queremos também neste preâmbulo nomear aqueles que colaboraram em partes destes trabalhos, ou produziram dados que foram depois analisados em alguns dos capítulos. Assim:

Em primeiro lugar, e a título póstumo, cabe-me fazer referência ao Dr. Nigel Fredrick Lyons, Médico e Iumologista do Horticulture Research International (HRI), Wellesbourne, Reino Unido, que procedeu ao desenvolvimento de um antisoro policlonal produzido a partir de estirpes portuguesas de *R. solanacearum*, e desenvolveu o método de aglutinação em lâmina aqui utilizado. No âmbito da sua colaboração nos estudos do "Plano de Luta Contra *Ralstonia solanacearum*", e como resultado de um trabalho efectuado sob sua coordenação, foi publicado um trabalho, e apresentadas algumas comunicações em reuniões científicas nacionais.

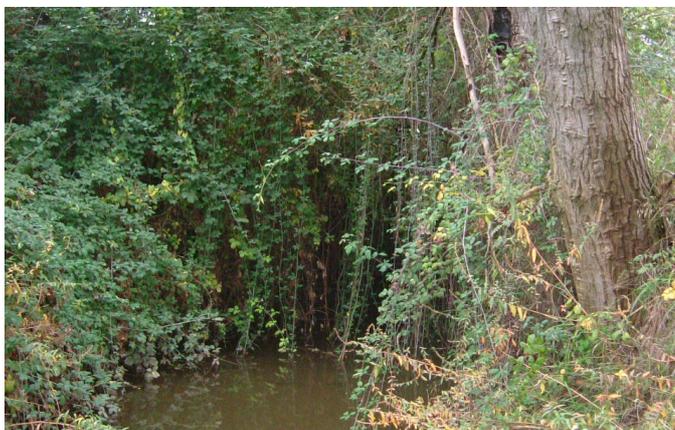
Os resultados das análises laboratoriais provenientes de diversas matrizes, e cujos dados foram aqui utilizados nos estudos desenvolvidos nos Capítulos 2 e 3, foram obtidos no decorrer dos trabalhos de rotina desenvolvidos entre 1999 e 2006 pelo corpo técnico do Laboratório de Bacteriologia da ex-DGPC. Deste modo nomeiam-se, além da autora desta dissertação, os Engenheiros Madalena Eloy e Francisco Quirino responsáveis, entre 1995 e 2005, e 2005 – 2006, repectivamente, pela detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batateira. Colaboraram ainda nas análises de rotina, embora durante um curto período os colegas Ana Costa e Eugénio Diogo.

A colecção de isolados de *R. solanacearum* obtidos em Portugal e caracterizados segundo uma abordagem polifásica no Capítulo 4 foram, igualmente, obtidos pela autora da dissertação, bem como por Madalena Eloy, Nigel Fredrick Lyons, Luísa Henriques e Francisco Quirino, e fazem parte da Colecção Portuguesa da Bactérias Fitopatogénicas, pertencente à ex-DGPC. A nomeação dos obtentores dos diferentes isolados constantes daqueles estudos, por ser de difícil inclusão na Tabela 4.4, encontra-se referida no Anexo.

Por último, o trabalho sobre hospedeiros alternativos, que se apresenta no Capítulo 5, fez também parte do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica de Paulo Jorge Atanásio Manso, tendo a autora da dissertação participado como orientador externo.

Introdução

- 1.1 A doença do pus ou mal murcho em *Solanum* spp.
- 1.2 O organismo causal
- 1.3 Importância socio-económica do cultivo de plantas solanáceas em Portugal
- 1.4 A doença do pus ou mal murcho em Portugal
- 1.5 O genoma da estirpe de *Ralstonia solanacearum* GMI 1000
- 1.6 Patobiologia de *Ralstonia solanacearum*
- 1.7 Estratégias para controlo e erradicação da doença
 - 1.7.1 Profilaxia
 - 1.7.2 Melhoramento genético
 - 1.7.3 Medidas culturais
 - 1.7.4 Medidas de controlo químico
 - 1.7.5 Controlo Biológico
 - 1.7.6 Implementação de Medidas de Quarentena
- 1.8 Referências Bibliográficas



1.1 | A doença do pus ou mal murcho em *Solanum* spp.

A doença do pus ou mal murcho causada por *Ralstonia solanacearum* Yabuuchi *et al.* 1996, referida na bibliografia anglo-saxónica por “brown rot” ou “bacterial wilt”, poderá evidenciar sintomas muito distintos que são o reflexo da vasta gama de hospedeiros que possui, bem como das condições edafoclimáticas prevalentes.

Os sintomas descritos na literatura (EPPO, 2004; União Europeia, 2006), quando a doença se manifesta em plantas da família *Solanaceae*, parecem possuir grande semelhança, e são comuns à batateira e ao tomateiro, produzindo enormes prejuízos, por se traduzirem numa elevada morbidade e mortalidade das plantas afectadas, imediatamente antes da entrada em plena produção.

Em plantas de batateira, na fase inicial da infecção no campo, verifica-se uma murchidão das folhas na parte superior da planta, especialmente quando as temperaturas são elevadas e durante o dia, recuperando a planta durante a noite. Nesta fase, as folhas mantêm a coloração mas, posteriormente, desenvolve-se uma clorose que evolui para necrose. Pode ocorrer igualmente eventual epinastia de algumas folhas (União Europeia, 2006).

A murchidão de uma parte ou de toda a planta torna-se rapidamente irreversível, resultando na sua morte. Geralmente, os tecidos vasculares dos caules das plantas infectadas mostram-se necrosados e apresentam um exsudado bacteriano de cor esbranquiçada, que emerge da superfície quando se procede ao seu corte transversal. Esta expressão da presença de doença não deve, contudo, ser considerada universal e não ocorre frequentemente nas condições climáticas existentes em Portugal (União Europeia, 2006).

A intensidade dos sintomas da doença em tubérculos de batateira pode ser muito variável. O corte longitudinal dos tubérculos intersectando a zona do hilo (extremidade do estolho) permite visualizar, numa fase inicial de infecção, uma coloração amarela vítrea ou castanha clara junto do anel vascular, pelo qual emerge espontaneamente, após alguns minutos, um exsudado bacteriano de cor creme clara. Mais tarde, a descoloração vascular assume um tom castanho mais nítido e a necrose pode alastrar ao parênquima. Nas fases mais avançadas, a infecção progride a partir do hilo e dos “olhos”, nos quais se pode manifestar exsudação bacteriana, para o exterior do tubérculo, que origina a adesão de partículas de solo. Poderão apresentar-se lesões de cor vermelha acastanhada na epiderme, em ligeira depressão, por colapso interno dos tecidos vasculares. Nas fases avançadas da doença, é comum o desenvolvimento de podridões moles secundárias causadas por fungos ou bactérias (EPPO, 2004).

Os sintomas referidos podem não ser tão evidentes ou estar mesmo ausentes, caso se trate de uma infecção latente; neste caso, será recomendável a manutenção dos tubérculos em estufa de incubação a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante alguns dias, de modo a observar a possível progressão dos sintomas.

Em plantas de tomateiro, os primeiros sintomas visíveis são o aspecto flácido das folhas mais jovens. Na presença de condições ambientais favoráveis à doença (temperatura do solo de 25°C, saturação em água), poderá verificar-se, num curto período de tempo, a murchidão de apenas um lado dos folíolos da folha ou de toda a planta, a qual progride até ao seu colapso total. Em condições menos favoráveis (temperatura do solo inferior a 21°C), observa-se uma menor murchidão, mas pode desenvolver-se no caule um grande número de raízes adventícias. Pode também observar-se externamente no caule manchas hidrópicas alongadas que evidenciam a necrose interna do sistema vascular. O corte transversal do caule mostra geralmente a sua descoloração e a possível presença de um exsudado bacteriano de cor esbranquiçada (União Europeia, 2006).

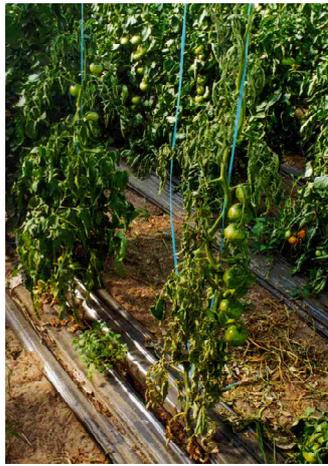
As plantas de *Solanum dulcamara* e *S. nigrum*, bem como as de outras espécies espontâneas, em condições naturais, não apresentam frequentemente, sintomas típicos de doença, nomeadamente murchidão, a menos que as temperaturas do solo ultrapassem os 25°C ou que os níveis de inóculo sejam extremamente elevados (União Europeia, 2006).

Em Portugal foram observados sintomas de doença em *S. dulcamara* apenas em presença de concentrações do patógeno, em águas superficiais, na ordem dos 10^7 ufc.L⁻¹. Quando efectivamente ocorre a murchidão, os sintomas são semelhantes aos descritos para a batateira ou tomateiro. As plantas de *S. dulcamara* que não apresentam murchidão, e com os caules e raízes imersos em água, poderão apresentar uma coloração castanha clara dos tecidos vasculares da base ou de outras partes do caule que se encontrem submersas. Mesmo na ausência de sintomas de murchidão, após um corte transversal dos tecidos vasculares, pode manifestar-se a presença de exsudado bacteriano (L. Cruz, não publicado).

A Figura 1.1 mostra sintomas característicos da doença do pus ou mal murcho em plantas e tubérculos de batateira e em plantas e frutos de tomateiro.

A variabilidade dos sintomas que a doença apresenta nas várias espécies de bananeira e a vasta amplitude geográfica em que ocorre, levaram, inclusive, a que fossem adoptadas diferentes designações para a doença ("Moko", "Bugtock", "Blood Disease Bacterium") e que a origem dos sintomas causados fosse atribuída a agentes fitopatogénicos distintos (Fegan, 2005).

O crescente número de novas espécies vegetais, susceptíveis à doença, pertencentes a famílias botânicas distintas e a variabilidade intra-específica do seu agente causal poderá tornar mais difícil enumerar sintomas comuns da doença para as diferentes espécies vegetais. Talvez por isso, o termo "bacterial wilt" (mal murcho) seja cada vez mais usado, e o termo "brown rot", embora correntemente utilizado, seja frequentemente associado apenas aos sintomas evidenciados por tubérculos de batateira.



A



B



C



D



E



F



G



H



I

Figura 1.1 – Sintomas da doença do pus ou mal murcho causada por *Ralstonia solanacearum* em plantas de batateira e tomateiro. Sintomas em plantas e frutos de tomateiro (A - F) e plantas e tubérculos de batateira (G - I).

1.2 | O organismo causal - Enquadramento sistemático e taxonómico de *Ralstonia solanacearum*

Presentemente, e de acordo com a última edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, publicado em 2005 e o TOBA ("Taxonomic Outline of the Bacteria and Archea", Versão 7.7, 06. Março. 2007), o agente causal da doença do pus ou mal murcho encontra-se integrado num complexo de espécies, designando-se, de acordo com Garrity *et al.* (2005, 2007) por: *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi, Kosako, Yano, Hotta & Nishiuchi 1996, 625^{VP} e fazendo parte dos grupos taxonómicos hierarquicamente superiores:

Classe II. Betaproteobacteria

Ordem I. Burkholderiales

Família I. Burkholderiaceae

Género VII. *Ralstonia* Yabuuchi, Kosako, Yano, Hotta & Nishiuchi 1996

Sinonímia: *Bacillus solanacearum* (Smith 1896)

Burkholderia solanacearum (Yabuuchi *et al.* 1992)

Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith 1914

Basónimo: *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith 1914

Ao longo desta dissertação designaremos este organismo por *R. solanacearum*.

As características fenotípicas e genómicas de *R. solanacearum* encontram-se descritas de forma exaustiva neste manual de referência embora, por possuir uma significativa variabilidade para um conjunto destes caracteres, tenha recentemente sido considerada um complexo de espécies, no qual se integram também outros organismos (Fegan & Prior, 2005). Estas condicionantes dificultam a enumeração de muitas características da espécie frequentemente variáveis e que permitem a sua adaptação à gama de hospedeiros que afecta e aos nichos ecológicos onde pode sobreviver de forma mais ou menos oligotrófica (Van Elsas *et al.*, 2005).

Os aspectos da diversidade do complexo de espécies de *R. solanacearum* serão abordados de forma mais pormenorizada, especialmente no que diz respeito às estirpes do filotipo II, no Capítulo 4 desta dissertação. A heterogeneidade dos diferentes grupos de estirpes em termos fenotípicos e genómicos é de tal modo ampla que seria impossível descrevê-la nesta dissertação, como justificado no preâmbulo.

1.3 | Importância socio-económica do cultivo de plantas solanáceas em Portugal

A cultura de plantas solanáceas assume grande importância em termos económicos e sociais à escala mundial. Em Portugal encontra-se associada tanto à agricultura intensiva como de subsistência. De entre as solanáceas mais cultivadas, destacam-se a batateira, o tomateiro e o pimenteiro, possuindo menor tradição e expressão o tabaco e a beringela. Portugal é um dos países da União Europeia (UE) onde a utilização de tubérculos de batateira na alimentação possui maior peso, embora o consumo deste produto processado possua menor relevância. Relativamente ao tomate não existem dados que sustentem essa importância, a qual é no entanto perceptível.

No que diz respeito à batateira, assume particular relevância a produção de batata primor, nos meses de Março/Abril, e a produção de batata de consumo para conservação, nos meses de Julho/Agosto. Relativamente à cultura do tomateiro, esta existe durante todo o ano fazendo-se quer em cultura protegida quer ao ar livre, destinando-se, no primeiro caso, ao consumo em fresco, e no segundo à indústria de transformação. O tomateiro e a batateira são, de entre as culturas hortícolas, as que possuem um maior peso em termos de volume de produção a nível interno, apenas superado pelo sector vitivinícola (INE, 2007).

Na Europa a 27, a Polónia é o maior produtor de batata-semente, juntamente com a Alemanha, Holanda, Bélgica, França e Inglaterra. Em Portugal, a produção de batata-semente tem vindo a decrescer de forma notória, à semelhança dos outros países da orla mediterrânica que fazem parte da UE. Estes países têm vindo a especializar-se na produção de batata-primor e na sua exportação para os países do Norte da Europa, mas a competição criada pela melhoria dos sistemas de produção da batata de conservação produzida naqueles países, e que prolonga a sua disponibilidade no mercado a preços competitivos até à primavera, tem vindo também a fazer decrescer a produção de batata primor em Portugal (Comissão das Comunidades Europeias, 2007a).

No que diz respeito ao tomate, os países da região mediterrânica são os maiores produtores da UE, situando-se Portugal no quarto lugar, depois da Itália, Espanha e Grécia. A produção de frutos para consumo em fresco e destinados à indústria aumentou significativamente no período 1999-2005, encontrando-se, no entanto, mais próxima de outros países com produções menos importantes. A superfície agrícola cultivada destinada a esta cultura ronda os 15.000 ha, embora a produtividade obtida seja inferior à da Bélgica ou da Holanda (Comissão das Comunidades Europeias, 2007b).

Também no que diz respeito aos produtos exportados, a batata primor e de conservação representavam cerca de 10% do total das exportações de hortícolas e o tomate cerca de 9%, em 1999 (GPPAA, 2000), não existindo dados mais recentes relativos à exportação destes produtos.

O aparecimento na década de 90 de surtos da doença do pus ou mal murcho da batateira e

do tomateiro, nas regiões da Beira Litoral e do Ribatejo-Oeste, conduziu à perda da totalidade das produções dos campos infectados e ao impedimento de efectuar culturas solanáceas por um período de quatro anos (União Europeia, 2006). Além destas regiões, a cultura da batateira e do tomateiro possuem ainda uma elevada importância em termos económicos e sociais em muitas outras áreas do país, associadas tanto à agricultura intensiva, como de subsistência.

A destruição total das plantas e da sua produção, por se tratar de um organismo de quarentena, é imposta pela aplicação da legislação comunitária, e contribui igualmente para grandes prejuízos do agricultor, com consequente redução da área de solanáceas cultivadas. Estes efeitos produzem-se igualmente a jusante, onde ocorrem graves prejuízos para as indústrias de transformação agro-alimentar, que celebram contratos com os agricultores recebendo a sua produção. A gravidade deste problema fitossanitário conduziu mesmo a que o Estado concedesse ajudas extraordinárias para minimizar os prejuízos, bem como à implementação de um conjunto de medidas de política fitossanitária com vista ao controlo e erradicação da doença (DGPC, 1998).

Por outro lado, o desenvolvimento algo insidioso da doença, e o seu difícil controlo, não permitem compreender totalmente as bases da sua erradicação, o que é corroborado pelo recrudescimento da doença em tomateiro no ano 1998, três anos após o surto de 1995 em batateira. De forma a minimizar o impacto social causado pela doença afigura-se prioritário avaliar a capacidade de sobrevivência deste organismo para as condições climáticas existentes no país, encontrar culturas favoráveis para uso em rotações durante o período de quarentena, conhecer o perigo associado à presença de infestantes hospedeiras e ao uso de águas superficiais contaminadas, e proceder ao diagnóstico precoce da doença.

1.4 | A doença do pus ou mal murcho em Portugal – História e Presente

A história da presença de *R. solanacearum* em Portugal encontra-se descrita em algumas publicações das décadas de 40, 50 e 60 do século XX (Maia & Oliveira, 1945; Moraes, 1947; Anónimo 1950; Anónimo, 1952; Oliveira, 1964), bem como em algumas referências anteriores, sendo a primeira datada do final da década de 20. O primeiro caso da doença do pus ou mal murcho da batateira foi relatado em 1929, encontrando-se já dispersa por todo o país na década de 40 (Maia & Oliveira, 1945; Moraes, 1947). Entretanto, severas medidas de erradicação foram tomadas, conduzindo à redução do número de casos e à inexistência de qualquer notificação oficial a partir do final da década de 60.

Alguns registos históricos que dizem respeito às detecções oficiais efectuadas no período de 1940 a 1968, traduzidos por fichas onde constam os dados relativos à detecção da doença do pus em batateira, encontram-se ainda conservados na ex-DGPC (Direcção-Geral de Protecção das Culturas), à data designada por Repartição dos Serviços Fitopatológicos

(Figura 1.2). A sistematização destes dados revela uma importante organização dos serviços fitossanitários da época, bem como o empenhamento dos técnicos responsáveis pelo diagnóstico. Esses registos demonstram a existência de um elevado número de casos no início da década de 40, e um decréscimo progressivo até à década de 60, deixando subsequentemente de possuir expressão. Entre finais da década de 60 e 1995 não se procedeu a qualquer notificação, sendo *R. solanacearum* dada como oficialmente erradicada.

Maia & Oliveira (1945) referem que isolados portugueses de *R. solanacearum* apresentam características mais próximas de *Bacterium solanacearum* var. *asiaticum*, do que de estirpes da mesma espécie isoladas na Europa ou na América do Norte. Contudo, ensaios mais profundos realizados por Moraes (1947) permitiram concluir trataram-se as estirpes portuguesas de *Bacterium solanacearum*. Este autor faz já referência às inúmeras variações deste organismo observadas em diferentes países. Também Oliveira (1964) confirma a identidade do organismo presente em Portugal e faz a sua comparação com estirpes isoladas noutros países. Efectivamente, um exemplar dos isolados obtido por esta investigadora em 1960, e que ainda se encontrava conservado nas colecções NCPPB (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, York, Reino Unido) e PD (Culture Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Wageningen, Holanda), foi recuperado, mostrando que, apesar da perda do seu poder patogénico, pertencia ao biovar 2, subfenótipo A, raça 3, à semelhança de outros isolados obtidos recentemente em Portugal (Capítulo 4).

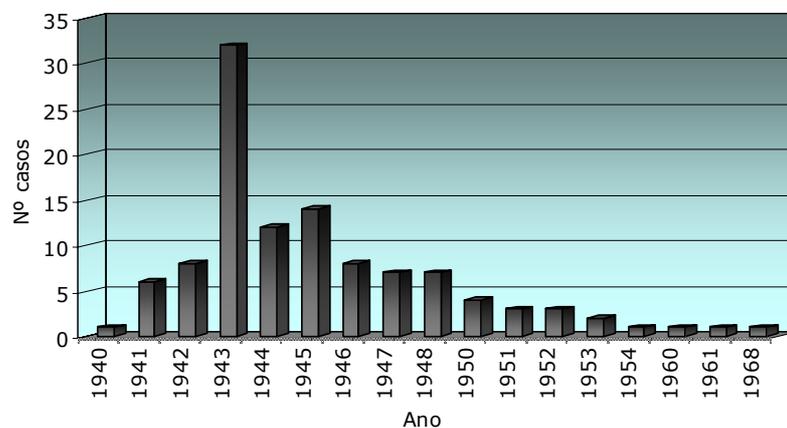


Figura 1.2 – Casos de doença do pus ou mal murcho da batateira e do tomateiro detectados entre 1940 e 1968 na Repartição dos Serviços Fitopatológicos.

Na década de 40, e dada a importância que a doença alcançou, a realização de estudos profundos por diferentes especialistas, que envolveram prospecções mais ou menos minuciosas em todo o país, conduziram também à detecção e identificação de um maior número de casos da doença e revelaram a sua real dispersão e incidência (Figura 1.2).

Em todos esses registos nem sempre a doença recebe a mesma designação, sendo referida como “murcha bacteriana da batatinha e do tomateiro” (Alencar & Drummond, 1944),

“doença do sono”, “mal murcho” e “pus da batateira” Moraes (1947).

Com o objectivo, entre outros, de averiguar o estado fitossanitário da batata-semente produzida em Portugal, a autoridade fitossanitária nacional criou, na década de 70, a Divisão de Batata de Semente. Os procedimentos adoptados para esse fim incluíam inspecções visuais aos campos de produção de propágulos, não havendo registo de suspeitas acerca da doença, à excepção de um caso na região de Nelas, que não veio, no entanto, a confirmar-se (H. Carrinho, comunicação pessoal).

Nas décadas de 70 e 80, a então Direcção-Geral de Protecção da Produção Agrícola (DGPPA) deixou de contar com técnicos superiores para apoio às consultas fitopatológicas, na área da bacteriologia, passando a ser apoiada pela Estação Agronómica Nacional. No entanto, existem registos sobre a entrada e encaminhamento de consultas fitossanitárias. Assim, em 1980 parece ter ocorrido uma importação de batata-semente, posteriormente comercializada por uma Cooperativa de Mangualde, onde constavam algumas variedades aparentemente infectadas por *R. solanacearum*, embora não se tenham verificado casos de mal murcho, em anos posteriores, naquela região. Entre 1974 e 1986, a comunicação de detecções de casos de pus ou mal murcho era obrigatoriamente reportada à OEPP (Organização Europeia e Mediterrânica para a Protecção das Plantas).

Após a entrada de Portugal na Comunidade Económica Europeia (CEE), a 1 de Janeiro de 1986, a necessidade de dar cumprimento à legislação comunitária levou a que fossem introduzidos, embora faseadamente, alguns procedimentos mais exigentes, no que diz respeito à circulação de material vegetal (M. Charrua, comunicação pessoal). Efectivamente, foi transposta a Directiva 77/93/CEE do Conselho, de 21 de Dezembro de 1976, onde, no Anexo II, *Pseudomonas solanacearum* é já contemplada como organismo de quarentena, constando da lista de “Organismos prejudiciais cuja introdução deve ser interdita em todos os Estados membros se forem detectados em certas plantas ou produtos vegetais”. No caso de *P. solanacearum* esses materiais vegetais contemplavam tubérculos de batateira e plantas de tomateiro, à excepção de frutos e sementes. Nestas condições, os Estados Membros ficavam obrigados a tomar medidas de controlo e erradicação apenas no caso de se verificar a ocorrência de material infectado com este organismo de quarentena.

Em Abril de 1995, após várias décadas em que não houve notícia oficial da presença da doença em Portugal, surgiram alguns casos desta bacteriose em campos de batateira da região de Cantanhede (Sousa-Santos & Henriques, 1995). Um estudo sobre a rastreabilidade desses campos revelou que pertenciam a agricultores distintos, mas que em todos eles tinha sido plantado o mesmo lote (5-1032) de batata-semente, cv. “Jaerla”, de proveniência Holandesa. As análises efectuadas a partir de tubérculos colhidos em todos eles, utilizando técnicas laboratoriais distintas, revelavam a presença da bactéria fitopatogénica de quarentena – *Burkholderia solanacearum*, biovar 2, subfenótipo A, raça 3. Outros dados corroboravam esta reintrodução a partir de material de propagação infectado, nomeadamente o facto de alguns daqueles agricultores possuírem outras parcelas de terra plantadas com tubérculos de proveniências diferentes, as quais não se encontravam

infectadas. Esta tese era também apoiada pelo facto de a prospecção de *B. solanacearum*, realizada em amostras de tubérculos de batata-semente da produção nacional e propostos para certificação em 1994, não ter revelado, para um total de 114 amostras analisadas, um único caso positivo (Henriques, 1995).

Foram então efectuadas aturadas prospecções a nível nacional até final desse ano, tendo sido detectada a presença de *R. solanacearum* em 26 campos de produção de batata-consumo, onde tinha sido plantada semente do mesmo lote, e ainda, em campos onde tinham sido plantadas as variedades "Kondor" e "Desirée", da mesma proveniência (DGPC, 1998).

Procedeu-se de imediato à implementação de medidas fitossanitárias conducentes à erradicação da doença, tendo o número de casos diminuído significativamente nos anos subsequentes. No entanto, em Julho e Agosto de 1998 surgiram novos focos da doença em plantas de tomateiro de cultura protegida, do aproveitamento hidroagrícola de Cella (Oeste), bem como em campos de tomateiro, para produção de frutos destinados à indústria, do Vale do Sorraia (Alentejo). Observaram-se igualmente sintomas típicos da doença em algumas infestantes muito frequentes no país (Sousa-Santos *et al.*, 1998). Nestes novos focos da doença, verificou-se também o recurso à rega com águas superficiais, as quais, após análise laboratorial, se mostraram igualmente contaminadas com *R. solanacearum*. O estudo das características fenotípicas dos isolados obtidos revelou, em todos os casos, a presença de estirpes do biovar 2, subfenótipo A, raça 3.

Paralelamente, foi detectado na Região Autónoma dos Açores um foco da doença. Procedeu-se então à realização intensiva de prospecções nas regiões do Arquipélago com produção de batata. Foram detectados cerca de 135 campos infectados com a bactéria, tendo sido implementadas as medidas conducentes à sua erradicação (DGPC, 1998).

Também na Região Autónoma da Madeira surgiram os primeiros focos da doença no ano de 1996, em cerca de 23 campos de batata consumo, tendo igualmente sido realizadas prospecções mais exaustivas e tomadas as medidas de controlo mais adequadas à erradicação de *R. solanacearum* (DGPC, 1998).

Como consequência daquelas novas situações, e tendo em conta que *R. solanacearum* é considerado um organismo de quarentena face à legislação fitossanitária da União Europeia (União Europeia, 1998), a Direcção-Geral de Protecção das Culturas (DGPC) deu início a um conjunto de estudos que integraram o "Plano de Luta Contra *Ralstonia solanacearum*" (DGPC, 1998). Este conjunto de medidas visava caracterizar a situação de Portugal relativamente à presença deste organismo e, ao mesmo tempo, tomar as medidas adequadas à erradicação da doença das zonas de produção de culturas solanáceas identificadas como de risco, após avaliação de alguns factores considerados determinantes. Esses factores seriam a presença de culturas solanáceas (batata, tomate, pimento e beringela), a existência confirmada da doença, a utilização de águas superficiais na rega destas culturas, e a presença de plantas espontâneas hospedeiras de *R. solanacearum*. Assim, com a colaboração do Laboratório de Bacteriologia da DGPC e durante cinco anos

consecutivos (1999-2003) foram identificados os principais focos da doença, localizadas as áreas com águas superficiais contaminadas, reconhecidas espécies espontâneas hospedeiras, verificado o percurso de resíduos e efluentes resultantes das indústrias de transformação de tomate, pimento e tubérculos de batateira e, ainda, detectada a existência de solos contaminados.

Paralelamente, foram implementadas, pela Divisão de Inspeção Fitossanitária da DGPC, as acções conducentes à erradicação de *R. solanacearum* nas principais áreas de produção de culturas solanáceas em Portugal.

Em 2002, uma missão de peritos da "Direction Générale de la Santé et de la Protection des Consommateurs" da Comissão Europeia deslocou-se a Portugal com o intuito de auditar a implementação dos procedimentos consagrados na legislação da União Europeia, no que diz respeito à amostragem, análises laboratoriais e medidas de erradicação, tendo considerado satisfatório o desempenho da autoridade fitossanitária nacional (Comissão Europeia, 2002).

Apesar de todos os esforços por parte da DGPC e das Direcções-Regionais de Agricultura, a situação relativa à presença de *R. solanacearum*, no ano de 2003, não tinha sofrido grande evolução, mostrando-se a bactéria de difícil erradicação. Assim, manteve-se até ao presente o "Programa Nacional de Prospeção" iniciado com o "Plano de Luta Contra *Ralstonia solanacearum*", elegendo-se, para realização de um trabalho mais exaustivo, as áreas agora consideradas de maior risco.

A situação actual da doença do pus ou mal murcho em Portugal será objecto de discussão nos Capítulos 3 e 4 desta dissertação.

1.5 | O genoma da estirpe de *Ralstonia solanacearum* GMI 1000

A sequenciação e análise do genoma completo da estirpe de *R. solanacearum* GMI 1000 pertencente ao filotipo I, biovar 3, raça 1 e isolada de tomateiro na Guiana Francesa, foi publicada por Salanoubat e um vasto grupo de colaboradores na revista *Nature*, em 2002 (Salanoubat *et al.*, 2002). O genoma desta estirpe constituído por 5,8-megabases (Mb) é bipartido, encontrando-se organizado em duas estruturas circulares: um cromossoma de 3,7 Mb e um megaplasmídeo composto por 2,1 Mb, que possuem um teor muito semelhante em G+C de aproximadamente 67%. A sua totalidade parece codificar para mais de 5000 proteínas.

O cromossoma possui todos os genes necessários aos mecanismos básicos de sobrevivência da bactéria, nomeadamente aqueles responsáveis pela replicação e correcção do DNA, bem como pela divisão celular, e ainda outros dirigidos à transcrição ou à tradução.

O megaplasmídeo parece ter coevoluído desde longa data com o cromossoma e, apesar de originalmente ser elemento genómico aparentemente dispensável, adquiriu características

que o tornam essencial para a sobrevivência de *R. solanacearum* em ambientes oligotróficos (Genin & Boucher, 2004). Possui assim alguns genes essenciais ao metabolismo, que também se encontram no cromossoma, inversamente a outros que codificam para algumas enzimas responsáveis pelo metabolismo primário, incluindo a produção de aminoácidos e cofactores, que não se encontram no elemento principal. O megaplasmídeo parece possuir também todos os genes de resposta de hipersensibilidade (*hrp*) indispensáveis à produção de doença e à colonização das raízes do hospedeiro, bem como outros indispensáveis à adaptação de *R. solanacearum* a nichos ecológicos distintos. Codifica ainda todos os constituintes do flagelo polar e possui muitos genes responsáveis pela síntese de exopolissacáridos.

O genoma completo desta estirpe apresenta uma estrutura em mosaico onde fragmentos com a esperada composição em bases e utilização de códons alternam com ACURs (regiões de utilização alternativa de códons), possuidoras de um teor molar de G+C distinto, e flanqueadas por elementos móveis aparentemente adquiridos por LGT (transferência génica lateral). As regiões codificantes correspondem a mais de 90% do genoma total, enquanto 7% pertencem a regiões não codificantes ou a ACURs, distribuídas pelo cromossoma e megaplasmídeo em 'clusters', sendo muitas vezes associadas a tRNAs, elementos móveis como profagos e sequências de inserção (IS). Efectivamente, aproximadamente 50% dos casos correspondem a IS, que no genoma completo possuem 118 cópias pertencentes a três famílias de IS distintas. Algumas destas IS já tinham sido descritas como associadas a fenómenos de alteração fenotípica em *R. solanacearum* (Jeong & Timmis, 2000)

Guidot *et al.* (2007) efectuaram o estudo comparativo entre a distribuição dos genes identificados na estirpe GMI 1000 e a existente numa colecção de 18 estirpes pertencentes aos diferentes filotipos, pela hibridação do DNA genómico destas estirpes num 'microarray', e identificaram 2700 genes essenciais conservados em todas as estirpes estudadas, sendo a grande maioria ligada a funções de patogenicidade, e 2300 genes acessórios. Os genes acessórios situavam-se indistintamente nos dois elementos do genoma, mas 94% da sua totalidade encontrava-se em ACURs reforçando a hipótese da sua introdução por LGT. A análise filogenética hierárquica realizada foi completamente concordante com o esquema de classificação em filotipos criado por Fegan & Prior (2005). Os resultados obtidos mantiveram-se, quer para o genoma completo, quer para genes cromossómicos e plasmídicos, genes de ACURs ou efectores, e genes cuja expressão é regulada pelo sistema Hrp, individualmente. Estes resultados parecem assim confirmar uma longa coevolução do cromossoma e megaplasmídeo, bem como uma aquisição ancestral de ACURs e de genes envolvidos na patogenicidade, e permitem propor um cenário evolutivo para este complexo de espécies.

A sequenciação da estirpe IPO 1609 (filotipo II, biovar 2, raça 3), obtida de batateira, na Holanda, e da estirpe Molk2 (filotipo II, biovar 1, raça 2), obtida de bananeira, nas Filipinas, permitiu identificar 1150 novos genes relacionados com a especificidade da interacção com o hospedeiro, o biovar e a adaptação a nichos ecológicos distintos. Por outro lado, a sequenciação do genoma da estirpe UW551 (filotipo II, biovar 2, raça 3), obtida de *Perlargonium* sp., nos EUA, mostrou a sua clonalidade relativamente à estirpe IPO 1609.

A disponibilidade da sequência total do genoma da estirpe GMI 1000 permitiu igualmente a identificação de todos os sistemas de secreção conhecidos até agora para a totalidade das bactérias Gram-negativas e cuja actividade é regulada na interacção do patogéneo com o hospedeiro e o ambiente (Genin & Boucher, 2004).

1.6 | Patobiologia de *Ralstonia solanacearum* - Interacção patogéneo x hospedeiro x ambiente

Allen *et al.* (2005) descrevem a série de desafios com que *R. solanacearum* se confronta durante o seu ciclo biológico, o qual poderá incluir etapas de patogenicidade e de vida saprofítica. Assim, na sua sobrevivência no solo confrontar-se-á com condições ambientais diversas. Ao efectuar a transição para um estado patogénico, aumentará o seu nível populacional e atingirá a rizosfera e rizoplane de plantas hospedeiras, penetrando através de feridas ou orifícios naturais das raízes. Já no interior do córtex da raiz, *R. solanacearum* multiplica-se, utilizando os nutrientes disponíveis, e procura os feixes do protoxilema que conduzem ao seu habitat preferencial no hospedeiro. Uma vez que os feixes vasculares não constituem um local particularmente rico em nutrientes, são dotados de uma pressão relativamente elevada, e atravessados por um fluxo de água e de minerais rápido (transporte xilémico), em consequência da evapotranspiração da planta, a sua agregação e adesão às paredes dos feixes poderá ser muito dificultada. Por outro lado, os mecanismos de defesa da planta poderão reconhecer a sua presença. As células da membrana e parênquima da medula podem igualmente bloquear a passagem entre vasos xilémicos adjacentes, impedindo a sua dispersão na planta. Os vasos xilémicos encontram-se também frequentemente obstruídos por tiloses e exopolissacáridos. Caso venha a multiplicar-se de forma exuberante, conduzindo à morte das células do hospedeiro, essas células em lise produzirão um ambiente rico em substâncias fenólicas e outros produtos tóxicos para as células bacterianas, e com a desidratação da planta morta, experimentarão situações de stresse hídrico. *R. solanacearum* volta assim a reentrar num período de vida saprofítica onde terá de se adaptar a diferentes habitats.

A sobrevivência saprofítica depende da capacidade de *R. solanacearum* em usar uma gama de compostos orgânicos muito variada, bem como de resistir à presença de compostos, muitas vezes tóxicos, presentes no solo. Possui assim um grande arsenal de genes catabólicos e desenvolveu mecanismos de quimiotaxia e de adesão, que facilitam a colonização ou manutenção em nichos ecológicos menos favoráveis (Genin & Boucher, 2004). É capaz de degradar compostos aromáticos derivados da lenhina, libertados durante o processo de degradação dos feixes lenhosos das plantas no solo, favorecendo a sua manutenção após a morte da planta.

R. solanacearum produz também um grande número de enzimas hidrolíticas extracelulares como pectinases, poligalacturonases, proteases e glucanases capazes de gerar substratos de

baixa massa molecular, que podem depois ser metabolizados. Possui igualmente um elevado número de transportadores capazes de importar um grande número de outros substratos, que podem ser depois metabolizados, bem como de exportar substâncias tóxicas para o exterior.

Denny (2005) efectua uma revisão sobre o estudo da patogenicidade de *R. solanacearum* iniciado por Okabe, Kelman e Sequeira na década de 50, com a identificação dos primeiros factores de virulência, e experiências com alguns mutantes espontâneos, dificultadas pela sua natureza pleiotrópica. Na década de 80, com a utilização de novas técnicas como a mutação de transposões, foi possível identificar o sistema de secreção de proteínas Hrp, a produção de factores de virulência extracelulares, e explicar parcialmente o processo de conversão fenotípica espontânea observado nas células de *R. solanacearum* em cultura.

As alterações espontâneas no fenótipo das células de *R. solanacearum*, relacionadas com modificações no seu nível de virulência (interacção *R. solanacearum* x hospedeiro x ambiente), constituíam um problema de difícil resolução, que se tornou explicável com a descoberta do regulador global da transcrição PhcA (Schell, 2000). Na verdade, as mutações espontâneas de *phcA* podem resultar de um erro genético, mas PhcA possui um papel central na complexa rede reguladora que confere a *R. solanacearum* a capacidade de alterar o seu comportamento fenotípico em resposta à disponibilidade de nutrientes, ou à concentração de células bacterianas no ambiente, actuando como activador ou repressor da transcrição de inúmeros factores de virulência. Este regulador é por sua vez controlado pelo sistema sensor de confinamento Phc, codificado pelo operão *phcBSR*, que produz e detecta um autoindutor, o éster metilado do ácido 3-hidroxipalmítico (3-OH PAME) (Denny, 2005).

Na presença de baixas concentrações de células bacterianas, o confinamento celular é reduzido, não ocorrendo produção de PhcA e permitindo a expressão dos genes reprimidos de forma negativa por PhcA e responsáveis pela sobrevivência e colonização: (i) produção de endopoligalacturonase; (ii) produção do sideróforo estafiloferrina B; (iii) produção de "pili" tipo 4 (Tfp) e consequente motilidade contráctil ("twitching motility"), autoagregação e formação de biofilmes; (iv) motilidade flagelar; (v) tolerância a sais; e (vi) actividade do regulador da transcrição de HrpG. Este comportamento revela-se semelhante ao evidenciado pelos mutantes espontâneos *phcA*, os quais apresentam baixos níveis de virulência. Em presença de confinamento, como acontece nos feixes vasculares densamente colonizados, ocorre a produção de PhcA funcional que activa a expressão dos genes que controla de forma positiva: (i) produção de exopolissacáridos de elevada massa molecular; (ii) produção de endoglucanase; (iii) produção de pectina metilesterase; (iv) competência para transformação natural de DNA; e (v) um sistema "quorum sensing" de lactona acil-homoserina (Bhatt & Denny, 2004; Denny, 2006). Possivelmente existirão outros genes regulados por PhcA ainda não identificados.

O mecanismo referido permite concluir que *R. solanacearum* pode alterar o estado morfológico e fisiológico durante o seu ciclo biológico, em função das condições a que está sujeita, estando as formas de baixa densidade particularmente adaptadas ao solo, e as de

alta densidade especialmente ajustadas à multiplicação em plantas hospedeiras (Poussier *et al.*, 2003). Na realidade confirmou-se que as raízes são invadidas e colonizadas por células bacterianas, presentes na rizosfera das plantas, apresentando fenótipo de baixa densidade e possuindo motilidade natatória ou flagelar (Tans-Kersten *et al.*, 2001). A colonização sistémica dos tecidos do caule é efectuada por fenótipos de alta densidade, nos quais a presença de motilidade flagelar não parece indispensável, mostrando-se, neste caso, mais importante a activação de um sistema Tfp associado a motilidade contráctil (Kang *et al.*, 2005).

Na sua interacção com o ambiente e o hospedeiro, *R. solanacearum* encontra-se assessorada pelos vários sistemas de secreção que permitem o efluxo de variadas proteínas e que são regulados por PhcA e/ou por outros reguladores, dependendo o seu comportamento da fase do ciclo biológico em que se encontra.

Os sistemas de secreção dos tipos II e III parecem possuir uma actividade relevante na patogenicidade, mostrando os mutantes deficientes grande dificuldade em colonizar e multiplicar-se na planta. O sistema de secreção do tipo II (T2SS) de *R. solanacearum* é responsável pela produção de pelo menos seis importantes exoproteínas (EXPs) responsáveis pela degradação das paredes celulares (CWDE) (pectinase, endoglucanase, duas poligalacturonases, Pg1A e PehB) que desempenham uma função essencial no processo de infecção e morte das plantas. As várias cópias deste sistema, existentes no genoma de GMI 1000, parecem estar relacionadas com o potencial adaptativo desta estirpe. A análise de proteínas do secretoma de GMI 1000 permitiu identificar 103 novas proteínas, além das já conhecidas, 36 das quais pareciam referir-se a EXPs translocadas via T2SS, até agora não identificadas (Liu *et al.*, 2006). Também González *et al.* (2007), através do estudo do secretoma, identificaram novas proteínas produzidas pelo sistema de secreção "twin arginine translocation" (Tat) e consideradas potenciais factores de virulência. O sistema T2SS possui um papel igualmente importante na invasão dos vasos xilémicos, conduzindo a uma infecção do tipo sistémico (Ohnishi *et al.*, 2006).

O sistema de secreção do tipo III (T3SS) é responsável pela injeção de proteínas nas células vegetais, e os mutantes deficientes deste sistema não conseguem produzir doença nos seus hospedeiros, nem reacção de hipersensibilidade em plantas resistentes. O T3SS é codificado pelo 'cluster' de genes *hrp*, do megaplasmídeo, e possui a capacidade de inibir o sistema de defesa do hospedeiro (Boucher *et al.*, 2006). Dos 70 a 80 genes potenciais candidatos, cerca de 25 possuem já a sua função devidamente identificada.

O cromossoma de *R. solanacearum* possui igualmente um 'cluster' de genes que fazem parte de um transposição conjugativo (muitas vezes designados por ilhas genómicas), responsáveis pela expressão de um sistema de secreção do tipo IV, semelhante ao existente no plasmídeo Ti de *Agrobacterium*, e que parece pertencer a uma família de elementos móveis comuns a várias espécies de proteobactérias com habitat no solo (Liu *et al.*, 2001). Este 'cluster' é constituído por 13 genes, parte dos quais estão envolvidos no catabolismo de metabolitos secundários e em processos de defesa da célula bacteriana contra terpenos, como o

limoneno, que são produzidos pelo sistema de defesa e comunicação planta-planta.

A capacidade de adesão e motilidade de *R. solanacearum* é conferida pelo flagelo polar (motilidade natatória), bem como por um sistema tipo IV de formação de “pili” (Tfp) responsável pela motilidade contráctil. A estirpe GMI 1000 parece ainda possuir outros tipos de “pili”, os quais serão responsáveis pela produção de biofilmes, nas paredes dos vasos xilémicos das plantas, e que permitem a sua autodefesa e a sua sobrevivência em períodos de infecção latente e de vida saprofítica. Outras moléculas do tipo das adesinas, nomeadamente lectinas, parecem possuir um papel importante na adesão de *R. solanacearum* ao solo, bem como na sua interacção com rizoplano (Genin & Boucher, 2004).

A produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) por parte da planta parece estar directamente envolvida num sistema de defesa antimicrobiano. Durante a colonização de um hospedeiro compatível, *R. solanacearum* reage a este stresse oxidativo através da activação do gene *bcp*, que codifica para uma peroxidase da família AhpC/TSA, criando condições favoráveis à sua sobrevivência naquelas condições (Flores-Cruz *et al.*, 2006).

O papel do tactismo de *R. solanacearum* na sua interacção com hospedeiros compatíveis encontra-se presentemente a ser estudado por Allen *et al.* (2006). A capacidade das células bacterianas se deslocarem em direcção a um ambiente mais favorável foi detectado na estirpe K60, a qual possui quimiotactismo relativamente à rizosfera do hospedeiro, bem como para ambientes ricos em aminoácidos e ácidos orgânicos. Outras estirpes poderão possuir perfis quimiotácticos distintos. A utilização de mutantes permitiu verificar que o tactismo contribui significativamente para a virulência e adaptação das estirpes nas fases mais precoces do processo infeccioso. O aerotactismo parece facilitar igualmente a infecção das raízes do hospedeiro, estando também correlacionada com a formação de biofilmes, embora ainda não se conheça o seu papel nas diferentes fases de desenvolvimento da doença.

Ao atingir a planta hospedeira, *R. solanacearum* liga-se à superfície das raízes, em particular à zona de alongamento e nas regiões de emergência das raízes laterais, invadindo os espaços intercelulares do córtex. Posteriormente multiplica-se, atinge o parênquima, e finalmente os feixes vasculares do protoxilema. A sinalização da planta é reconhecida por PrhA através da membrana externa das células bacterianas e transferida para *hrpB* que se expressa através de uma rede de genes em cascata, PrhA-PrhR/PrhI-PrhJ-HrpG (Ohnishi *et al.*, 2006).

A separação no comportamento das células bacterianas entre os estados mais iniciais do processo infeccioso e a intensa colonização dos vasos xilémicos levou Hikichi *et al.* (2007) a proporem um modelo global de regulação dos genes de virulência para as primeiras fases daquele processo. Este modelo de regulação global envolve os reguladores HrpB e PhcA. Assim, após invasão dos espaços intercelulares por *R. solanacearum*, *hrpB* é activado em resposta à detecção da planta e activa o ‘cluster’ *hrp*, que sintetiza o T3SS. *R. solanacearum* pode então desenvolver-se utilizando proteínas produzidas pelo T3SS, atingindo um nível

populacional que permite a expressão de *phcA*. PhcA impede então a expressão dos genes envolvidos na sinalização da planta, enquanto o regulador *hrp* activa os genes *eps* e outros genes que produzem enzimas degradativas.

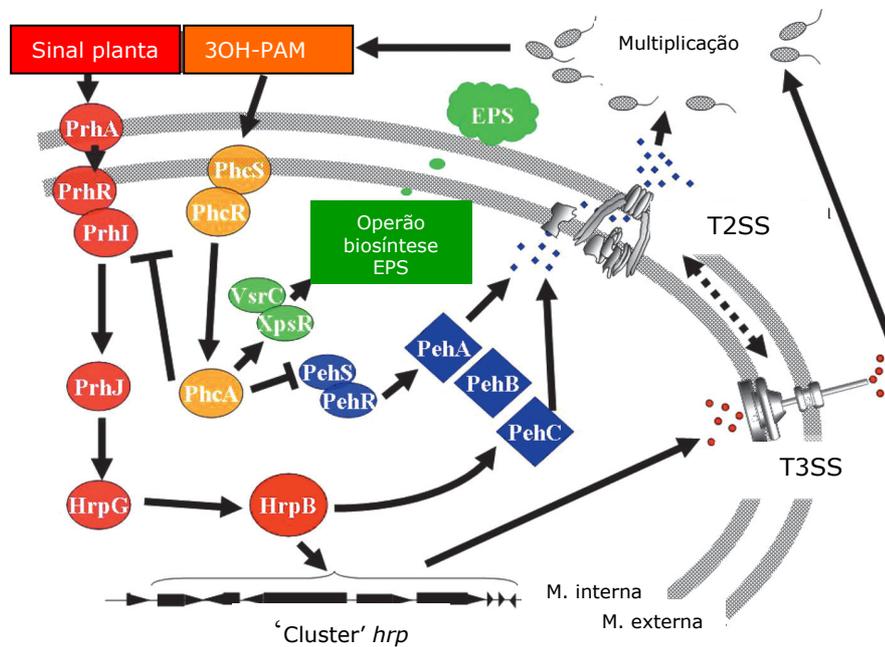


Figura 1.3 – Modelo de regulação global de genes ligados à patogenicidade em *Ralstonia solanacearum*. Após invasão dos espaços intercelulares, a célula bacteriana induz a expressão de *hrpB* em resposta aos sinais da planta e activa o regulador *hrp*, que produz T3SS. As células bacterianas podem então proliferar nos espaços intercelulares com a ajuda das enzimas produzidas por este sistema de secreção, atingindo um nível populacional que desencadeia a activação da expressão de *phcA*. Finalmente a repressão de *phrR* por expressão de PhcA resulta na repressão dos genes regulados por *hrpB* e activação dos genes *eps* com a produção de EPS (adaptado de Hikichi *et al.*, 2007).

1.7 | Estratégias para controlo e erradicação da doença

De acordo com Garry Saddler (2005), o controlo da doença do pus ou mal murcho continua a ser um objectivo pouco tangível devido à falta de conhecimentos sobre a diversidade infraespecífica, meios de disseminação do agente causal e mecanismo de evolução da doença. Por outro lado, a plasticidade ecológica de *R. solanacearum* é elevada, não existindo assim meios de controlo com carácter universal. As zonas agro-climáticas revelaram-se como condicionantes da eficiência dos sistemas de protecção das culturas implementados e o seu estabelecimento coloca Portugal, e os restantes países da área mediterrânica, num grupo distinto dos países da Europa Ocidental, os quais têm realizado e coordenado mais estudos sobre o controlo e erradicação de *R. solanacearum* (Bouma, 2005).

Ainda que o melhoramento genético tenha produzido algum sucesso em culturas como o tabaco e o amendoim, no caso de espécies solanáceas a resistência parece estar associada a condicionalismos regionais (estirpe, clima, entre outros), pelo que a utilização de estratégias

holísticas de produção integrada, incluindo a utilização de variedades com algum grau de resistência/tolerância, pode permitir um controlo mais aceitável da doença (Gildemacher *et al.*, 2006).

Constituirá assim um objectivo mais realista proceder à redução do impacto da doença num determinado sistema de produção agrícola, utilizando os meios de protecção disponíveis e mais apropriados, passando obrigatoriamente pela utilização de material de propagação isento, utilizando rotações adequadas e medidas culturais e incluindo ainda normas de higiene e de sensibilização dos trabalhadores.

Breukers *et al.* (2006) criaram um modelo bio-económico que permite proceder, *a priori*, a uma avaliação de custo-eficiência dos meios de protecção de *R. solanacearum* implementadas na Holanda. A sua aplicação aos sistemas agrícolas holandeses permitiu concluir que, apesar de onerosos, os seus custos foram superados pelos resultados obtidos pela exportação de batata-semente, uma vez que foram criadas condições por parte das autoridades fitossanitárias que originaram confiança nos produtores e no consumidor final.

1.7.1 | Profilaxia

Na Europa, a endemicidade ou estabelecimento de *R. solanacearum* biovar 2, subfenótipo A, raça 3, e a dificuldade em proceder ao seu controlo, levou ao estudo do risco associado à introdução e dispersão deste organismo em zonas de produção de solanáceas ainda não afectadas (Rafoss, 2003; McHugh *et al.*, 2006).

Os outros aspectos envolvidos na prevenção da doença, em zonas ainda não afectadas, encontram-se contemplados, em parte, na legislação fitossanitária da UE, passando por medidas restritivas de higiene, com recurso ao uso de solo, batata-semente e água de rega isentos de *R. solanacearum* (López & Biosca, 2005).

No que diz respeito ao solo, as principais limitações relativamente a este objectivo são, sem dúvida, a heterogeneidade dos solos, a distribuição irregular de *R. solanacearum*, a falta de meios de amostragem adequados e, por fim, a existência de uma flora muito rica e de inibidores que condicionam os resultados obtidos pelos meios de diagnóstico existentes. De qualquer modo, Kinyua *et al.* (2005) referem como princípios importantes a separação geográfica das áreas destinadas à produção de batata-semente, bem como a utilização de parcelas sem história de produção de culturas solanáceas e situadas em regiões que, de acordo com a orografia regional, não recebam escoamentos de águas superficiais.

Relativamente à batata-semente, e uma vez que a existência de infecções latentes parece ser a principal responsável pela dispersão da doença, é imperiosa a sua produção em regiões isentas, com áreas substanciais, que impeçam o fluxo de maquinaria e de mão-de-obra provenientes de outras potencialmente afectadas. O controlo de todos os lotes de batata-semente produzidos, através de ensaios laboratoriais sobre amostras estatisticamente

representativas, parece ser a forma mais importante de controlo da doença. Mienie & Theron (2005) verificaram que a ausência deste rastreio, na África do Sul, teria conduzido a uma percentagem de lotes de batata-semente infectados de 1,5%, o que seria suficiente para dispersar o patógeno em regiões até aí isentas. Em Portugal, o número de lotes de batata-semente produzidos em 1999 e infectados foi de 6,25%, o que potencialmente poderá ter conduzido a vários casos positivos de batata-consumo nos três anos seguintes (Capítulo 3).

O uso de águas superficiais contaminadas como veículo de transmissão de *R. solanacearum* tem vindo a ser subestimado pelos agricultores e pelas autoridades fitossanitárias de alguns países. Sabe-se presentemente que, nalguns casos, a dispersão primária do patógeno em países da Europa resultou da contaminação das águas superficiais e levou ao posterior estabelecimento de *R. solanacearum* em plantas ripícolas de *S. dulcamara* (Elphinstone *et al.*, 1998). A monitorização é assim essencial e a fidedignidade dos métodos de diagnóstico empregues permite estabelecer, com confiança, a permissão ou inibição da sua utilização entre a Primavera e o Outono. Fora deste período, não é possível concluir acerca da presença do patógeno em águas superficiais sendo, no entanto, mais seguro interditar a sua utilização, caso nos meses de Outono se tenham obtido ainda resultados positivos. A este respeito a legislação da UE parece, contudo, ser omissa, permitindo o seu uso na rega de culturas não-solanáceas, as quais poderão permitir a sobrevivência deste organismo no solo ou em hospedeiros alternativos (União Europeia, 2006).

Recentemente, a OEPP (2006) publicou os procedimentos de higiene e desinfecção a ter em conta na fileira de produção de batata, especificamente destinados aos organismos de quarentena *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* e *R. solanacearum*. Nestes refere-se a importância das medidas de higiene que deverão ser usadas em rotina, de modo a impedir o estabelecimento e disseminação destes organismos, nomeadamente: utilizando batata-semente proveniente de zonas isentas, procedendo à separação física entre os locais de plantação e manuseamento de batata-semente e de batata destinada ao consumo, acondicionando a batata-semente em contentores novos ou desinfectados, evitando a divisão e retirada de brotos dos tubérculos de batata-semente, e utilizando em rotina outras medidas de higiene consideradas apropriadas. A desinfecção é aconselhada de forma aditiva e são referidos os condicionalismos que podem afectar a sua eficácia. A desinfecção é considerada compulsiva na sequência de surtos epidémicos, a fim de evitar a sua disseminação, devendo ser dada particular atenção à desinfecção da maquinaria e dos armazéns. Finalmente, dão-se exemplos de desinfectantes, de naturezas diversas, utilizados em diferentes países membros da OEPP, com eficácia no controlo de *R. solanacearum* e de *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (podridão anelar). Na Tabela 1.1 descrevem-se apenas aqueles com acção simultânea sobre os dois organismos. De referir que estes produtos não se encontram homologados, para os fins descritos, em Portugal.

A desinfecção da água de rega, pela utilização combinada de radiação UV e de cloro, parece também ser eficiente, impedindo a contaminação do solo e a dispersão de *R. solanacearum* (Cariglia *et al.*, 2006).

Tabela 1.1 – Exemplos de produtos utilizados na desinfecção de alfaias agrícolas e locais de armazenamento de tubérculos de batateira (adaptado de EPPO, 2006).

| Produto | Nome comercial | Concentrações de aplicação | | | Corrosivo | Eficácia na presença de MO | Eficácia contra podridão anelar | Eficácia contra mal murcho |
|---------------------------|----------------|----------------------------|------|--------|-----------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| | | Pulv. | Neb. | Imers. | | | | |
| Base aldeído | Horti-Desin | 1:400 | na | 1:400 | não | nd | √ | √ |
| Base aldeído | Virakil | 1% | 1% | 1% | nd | √ | √ | √ |
| Amónia 24% | - | 10% | - | - | nd | nd | √ | √ |
| Ac. orgânicos | Menno Florades | 2:100 | - | 2:100 | nd | √ | √ | √ |
| Base Peróxido de oxigénio | Persteril | 1.5% | - | - | nd | nd | √ | √ |
| Hidróxido de sódio | - | 3 – 5% | - | - | nd | nd | √ | √ |

na – não aplicável; nd – não determinado; Pulv – pulverização; Neb – nebulização; Imers – Imersão; MO – matéria orgânica.

1.7.2 | Melhoramento genético

A utilização do melhoramento genético na criação de variedades de batateira resistentes a *R. solanacearum* tem-se mostrado infrutífera. O "International Potato Center" (IPC) possui desde os anos 90 um programa de melhoramento que, no entanto, não conduziu à obtenção de variedades cultiváveis com elevados níveis de resistência ou tolerância. Todas as variedades obtidas se comportam como hospedeiros compatíveis, permitindo o desenvolvimento de níveis populacionais do patógeno que conduzem ao risco de dispersão (Priou *et al.*, 2006). Recentemente, a partir de 4461 genótipos, foi possível obter resistência em cerca de 21, pertencentes às seguintes espécies do género *Solanum*: *S. tuberosum* subsp. *andigena*, *S. acaule*, *S. acaule* f. *incuyo*, *albicans*, *demissum*, *commersonii*, *megistacrolobum* e *sogarandinum*.

A cultivar de tomateiro "Hawaii 7996", dada como resistente a *R. solanacearum*, mostrou-se no entanto susceptível quando inoculada com a estirpe T731, com perfil fenotípico e genómico semelhante a outras estirpes do filotipo I, mas considerada como hipervirulenta. Mostra-se, deste modo, a falta de universalidade da resistência obtida por via do melhoramento genético e o desconhecimento relativamente à totalidade dos genes de *R. solanacearum* responsáveis pelo controlo da virulência (Zarate *et al.*, 2006).

Parece existir ainda um longo caminho a percorrer de forma a obter variedades resistentes, tendo por base métodos de melhoramento mais ou menos convencionais, existindo inúmeros trabalhos recentes que partem dos conhecimentos já existentes sobre a rede de genes reguladores da virulência. Esta abordagem conduzirá à obtenção de variedades transgénicas e, conseqüentemente, à sua dificuldade de introdução no mercado devido a razões de ordem ética e política (Denny, 2005).

1.7.3 | Medidas culturais

As medidas de carácter cultural encontram-se particularmente adequadas às regiões em que *R. solanacearum* adquiriu um carácter endémico e, apesar de poderem gerar impactos mais ou menos importantes a nível social, podem ser de grande valia nos países menos desenvolvidos uma vez que necessitam de um reduzido 'input' financeiro.

Além das medidas de higiene indispensáveis, mas muitas vezes esquecidas, o uso de rotações culturais mostra-se particularmente eficiente na presença de estirpes de espectro de hospedeiros mais reduzido (biovar 2/raça 3), sobretudo quando se utilizam culturas alternativas não hospedeiras durante um período superior a um ciclo cultural. O uso de uma única cultura alternativa mostrou-se ineficiente, mas uma redução significativa dos níveis populacionais de *R. solanacearum* já foi conseguida com dois a cinco anos de rotação, levando a uma redução na incidência da doença de cerca de 70% (Verma & Shekhawat, 1991; *cit. in* Saddler, 2005). De referir que, para o caso de estirpes do biovar 2, esse controlo só será efectivo quando associado ao uso de materiais de propagação isentos, bem como ao controlo adequado das plantas espontâneas, que muitas vezes se comportam como hospedeiros assintomáticos. De entre as culturas alternativas a introduzir em solos infestados com estirpes do biovar 2, Saddler (2005) enumera o feijoeiro, a faveira, o alho francês, o milho, a soja e o trigo.

No caso de estirpes de mais largo espectro de hospedeiros, o uso de espécies alternativas de importância agrícola e económica torna-se mais difícil. No entanto, milho, arroz, quiabo, feijão-frade, sorgo, cana-de-açúcar, festuca, cebolinho e margaridas são indicados como reduzindo a incidência de *R. solanacearum* quando utilizados em rotações (Saddler, 2005). Também neste caso, o controlo das espécies espontâneas durante as rotações parece imperioso, dada a elevada percentagem de espécies que parece funcionar como reservatório de *R. solanacearum* (Pradhanang *et al.*, 2000).

1.7.4 | Medidas de controlo químico

O controlo de *R. solanacearum* com recurso a meios de luta químicos tem vindo a ser realizado por aplicação de produtos aos solos infestados. O uso de fumigantes não produz efeitos sensíveis na redução do nível populacional daquele organismo no solo, embora possa controlar os nemátodos *Meloydogyne* spp., também eles responsáveis pelo aumento dos níveis de incidência da doença. O uso de "Tymol" como fumigante parece conferir redução na incidência da doença; no entanto, esta substância, para além de tóxica, é classificada como perigosa para o ambiente (Momol *et al.*, 2006).

Foi detectada a existência de solos supressivos ao pus ou mal murcho, associados à presença de rizobactérias (Shiomi *et al.*, 1999). Existem no entanto dados contraditórios

sobre o impacto de elevadas concentrações de rizobactérias nas populações de *R. solanacearum* estabelecidas no solo.

Têm sido efectuados diversos estudos onde se recorreu ao uso de hipoclorito de sódio em pó no solo, associado ou não a lavouras profundas, o que parece produzir níveis de redução da incidência da doença que poderão atingir mais de 80%. No entanto, estes valores parecem não ser de carácter universal, estando dependentes do tipo de solo (Saddler, 2005).

As aplicações de fertilizações adequadas com NPK, associadas a correcções com produtos orgânicos ou resíduos de plantas, bem como de soluções de nutrientes acidificantes foram utilizadas ou sugeridas como medidas de controlo. Em particular, as correcções com misturas de enxofre (S-H) (contendo bagaço, pó de concha de ostras, ureia ou cascas de arroz), parecem reduzir em 60% a incidência da doença em campos de tabaco ou de tomateiro, naturalmente infestados (Saddler, 2005).

A utilização de solarização associada a fumigantes ou a correcções de solo não se revelou igualmente de aplicação universal, produzindo resultados variáveis.

1.7.5 | Controlo Biológico

São inúmeros os estudos efectuados com potenciais agentes biológicos no controlo de *R. solanacearum*, nomeadamente o uso de organismos saprófitos com origem, entre outros, no solo, conforme consta da Tabela 1.2.

Até recentemente a generalidade dos organismos apresentando potencialidades evidenciadas em estudos efectuados *in vitro*, ou em condições de ambiente controlado, acabaram por não reflectir essas qualidades no campo. Também mutantes espontâneos e avirulentos, alguns produzindo bacteriocinas, mostraram potencialidades que não se revelaram efectivas, por serem altamente dependentes das condições ambientais.

Mais recentemente, Smith & Saddler (2001) iniciaram o estudo de mutantes avirulentos, obtidos por inserção de um interposição omega (*hrpO*), que codifica para a resistência à canamicina. As estirpes mutantes possuem o mesmo nível de adaptação às condições ambientais e funções celulares, mostrando-se no entanto incapazes de produzir doença. As estirpes virulentas continuam a multiplicar-se, mas o controlo parece produzir-se através de mecanismos de competição por espaço e nutrientes. Os estudos encontram-se em curso de modo a avaliar o impacto sobre a possível comercialização deste agente de controlo biológico transgénico.

Um trabalho recente, utilizando uma estirpe de *Bacillus subtilis*, mostrou que este agente produz o antibiótico viomicina e o flavonóide "chalcone", os quais são capazes de inibir *R. solanacearum*, produzindo uma redução considerável na incidência da doença (Sunaina, 2006).

Tabela 1.2 – Agentes biológicos estudados no controlo de *Ralstonia solanacearum* em diferentes matrizes (adaptado de Saddler, 2005).

| Matriz | Organismo |
|---------------------------------|--|
| Tomateiro | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Burkholderia glumae</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>B. polymyxa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Streptomyces mutabilis</i> , Actinomycetes |
| Batateira | <i>P. fluorescens</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , Actinomycetes |
| Pimenteiro | <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Escherichia</i> sp., <i>Serratia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp. |
| Bananeira, beringela, tomateiro | <i>P. fluorescens</i> , <i>Bacillus</i> spp. |
| Tabaco | <i>Bacillus</i> spp. |
| Eucalipto | Fungos ectomicorrízicos |
| Águas superficiais | Bacteriófagos |

Alvarez *et al.* (2006) estudaram a aplicação de um bacteriófago na água de rega, tendo obtido resultados promissores com decréscimos significativos de plantas de tomateiro sintomáticas em estufa.

Também o estudo de novos agentes antagonistas, de natureza bacteriana, prossegue (Priou *et al.*, 2006) existindo, em certos casos, o cuidado de avaliar os fenómenos que ocorrem paralelamente a nível fisiológico e genético em função do nível de resistência a *R. solanacearum*, previamente determinado, para as variedades introduzidas em ensaios de incidência da doença (Wydra *et al.*, 2006).

A utilização de estirpes de *Pseudomonas* spp., com características semelhantes a PGPR ("Plant Growth Promoting Rhizobacteria"), produziu uma redução sensível nos níveis de incidência da doença em *Zingiber officinale* (Vijayaraghavan & Abraham, 2006).

1.7.6 | Implementação de Medidas de Quarentena

Medidas de quarentena restritivas encontram-se descritas na presente legislação da UE e preconizam a proibição de utilização de águas superficiais contaminadas na rega de culturas solanáceas, a rotação com culturas alternativas não susceptíveis e o impedimento do cultivo de solanáceas em parcelas infestadas, por um período de quatro anos, após detecção de um foco da doença (União Europeia, 2006).

O sucesso no controlo de *R. solanacearum* impõe também a certificação de batata-semente, a exclusão de importação de tubérculos de zonas afectadas e a contínua monitorização deste organismo em campos de solanáceas e nas águas superficiais destinadas a rega (Elphinstone *et al.*, 2006). Embora a erradicação de *R. solanacearum* dos sistemas agrícolas pareça possível à luz dos conhecimentos presentes, a sua erradicação dos ecossistemas tem-se revelado de grande dificuldade. A monitorização de plantas de *S. dulcamara* e a remoção

daquelas identificadas como infectadas têm produzido alguns efeitos no Reino Unido. A associação do tratamento das águas superficiais, destinadas às explorações agrícolas e industriais de transformação, tem contribuído também para atingir este objectivo. A adopção de áreas consideradas livres da doença tem igualmente vindo a contribuir, no Egipto, para uma redução significativa do número de detecções.

1.8 | Referências Bibliográficas

- Alencar J & Drummond OA. 1944. Notas sobre a murcha bacteriana da batatinha e do tomateiro – *Bacterium solanacearum*, Smith. *Ceres*. **5**:178.
- Allen C, Tans-Kestern J & González E. 2005. Genes Involved in Early Bacterial Wilt Pathogenesis. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. p. 343-349.
- Allen C, Yao J & Schoenwalder Milling A. 2006. The role of bacterial taxis in *R. solanacearum* interactions with host plants. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Alvarez B, Biosca EG & López MM. 2006. River water biota affecting *Ralstonia solanacearum* survival: characterization of specific bacteriophages and its potential use for biocontrol in irrigation water. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Anónimo. 1950. A doença do pus ou mal murcho da batateira. *Frutas da Madeira*. p. 5 e 10.
- Anónimo. 1952. Conselhos para a defesa sanitária das culturas. A doença do pus da batateira. Direcção Geral dos Serviços Agrícolas. 7 pp..
- Bhatt G & Denny TP. 2004. *Ralstonia solanacearum* Iron Scavenging by the Siderophore Stappylloferrin B is Controlled by PhcA, the Global Virulence Regulator. *Journal of Bacteriology*. **186**:7896-7904.
- Boucher A, Guidot A, Carrère S, Peeters N, Elbaz M, Prior P & Genin S. 2006. Genomic variability and evolution in *Ralstonia solanacearum*. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Bouma E. 2005. Development of comparable agro-climatic zones for the international exchange of data on the efficacy and crop safety of plant protection products. *EPPO Bulletin*. 35:233-238.
- Breukers A, van der Werf W, Mourits M & Oude Lansink A. 2006. Towards an optimal brown rot control policy: development of a bio-economic model. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Cariglia A, Prior P & Pruvost O. 2006. Preventing bacterial wilt on tomato by cleaning up *Ralstonia solanacearum* from the greenhouse watering system. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Comissão das Comunidades Europeias. 2007a. Groupe de travail Prévisions - Tomates. Document de travail. AGRI-C2 / TOM15 / 07. 122 pp.
- Comissão das Comunidades Europeias. 2007b. The potato sector in the European Union. Commission Staff Working Document. 118 pp.
- Comissão Europeia. 2002. Extrait de Rapport d'une Mission Effectuée par l'Office Alimentaire et Vétérinaire au Portugal. 5pp..
- Denny TP, Cowart T & Morrison C. 2006. Genetic basis of the *Ralstonia solanacearum* biovar assay. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Denny TP. 2005. A Short Story of the Biochemical and Genetic Research on *Ralstonia solanacearum* Pathogenesis. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. p. 323-342.
- Denny TP. 2006. An overview of the tangled regulatory web in *Ralstonia solanacearum* woven by PhcA. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- DGPC. 1998. Plano de Luta Contra *Ralstonia solanacearum*. Direcção Geral de Protecção das Culturas, Lisboa, Portugal. DGPC-DSF, PPA(DSF) 5/98, 91pp.
- Elphinstone JG, Parkinson NM, Tomlinson DL, Bew J & Stanford H. 2006. Ecology and management of the *Ralstonia solanacearum* phylotype II, sequevar 1 strain, pandemic on potato. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Elphinstone JG, Stanford HM & Stead DE. 1998. Survival and transmission of *Ralstonia solanacearum* in aquatic plants of *Solanum dulcamara* and associated surface water in England. *OEPP/EPPO Bulletin* **28**:93-94.
- EPPO. 2006. Phytosanitary treatments. Disinfection procedures in potato production. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. **36**:463-466.

- EPPO/OEPP. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests – *Ralstonia solanacearum*. 10 pp..
- Fegan M & Prior P. 2005. How Complex is the “*Ralstonia solanacearum* Species Complex”? In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- Fegan, M. 2005. Bacterial Wilt Diseases of Banana; Evolution and Ecology. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- Flores-Cruz Z, Brown DG & Allen C. 2006. A plant-induced peroxidase of *Ralstonia solanacearum* is required for wild-type bacterial wilt virulence. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. 2005. The proteobacteria. In: Garrity G (ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 2, Part C. Springer. New York, London:. 2nd ed. 323 pp..
- Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzebey J, Tindall BJ. 2007. “*Taxonomic Outline of the Bacteria and Archea*”. Part 4 – The Bacteria: Phylum Proteobacteria, Class Betaproteobacteria. Versão 7.7, 06. Março.
- Genin S. & Boucher, C. 2004. Lessons Learned from the Genome Analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**:107-34.
- Gildemacher PR, Kinyua ZM, Wakahiu M & Priou S. 2006. Integrated management of bacterial wilt in potatoes in the East African highlands. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Gonzalez ET, Brown DG, Swanson JK & Allen C. 2007. Using the *Ralstonia solanacearum* Tat Secretome To Identify Bacterial Wilt Virulence Factors. *Applied and Environmental Microbiology.* **73**:3779-3786.
- GPPAA .2000. Anuário Hortofrutícola. Gabinete de Planeamento e Política Agro-Alimentar. Lisboa, Portugal. 284 pp.
- Guidot A, Prior P, Schoenfeld J, Carrère S, Genin S & Boucher C. 2007. Genomic Structure of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Inferred from Gene Distribution Analysis. *Journal of Bacteriology.* **189**:377-387.
- Henriques L. 1995. Relatório da Prospecção de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith em amostras de batata provenientes da produção nacional. Colheita 1994. Centro Nacional de Protecção da Produção Agrícola. PPA(ID) – 40/95. 9pp..
- Hikichi Y, Yoshimochi T, Tsujimoto S, Shinohara R, Nakaho K, Kanda A, Kiba A, Ohnishi K. 2007. Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Biotechnology.* **24**:149–154.
- INE. 2007. Estatísticas Agrícolas 2006. 117pp.
- Jeong EL & Timmis JN. 2000. Novel Insertion Sequence Elements Associated with genetic Heterogeneity and Phenotype Conversion in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology.* **182**:4673-4676.
- Kang Y, Liu H, Genin S, Shell MA & Denny TP. 2005. *Ralstonia solanacearum* Requires Type-4 Pili for Twitching Motility, Adherence, Natural Transformation, and Virulence. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. p. 365-370.
- Kinyua ZM, Gildemacher P, Demo P, Priou S & Otipa MJ. 2006. Opportunities and challenges of field sanitation in potato bacterial wilt management. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Liu H, Sherling D, Zuelta C, Wolf J, Wells L, Amster J, Schell MA & Denny TP. 2006. Exploring the secretome of *Ralstonia solanacearum*: mass spectral analysis to identify proteins secreted through the type II system. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- López MM & Biosca EG. 2005. Potato bacterial wilt management: new prospects for an old problem. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- Maia R. & Oliveira O. 1945. Doença da batateira causada por uma variedade do *Bacterium solanacearum* E. F. Smith. *Agronomia Lusitana.* **7**:195-205.
- McHugh RC, van de Graaf P, Danial J, & Saddler Gs. 2006. *Ralstonia solanacearum*: the risk to the Scottish seed potato industry. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.

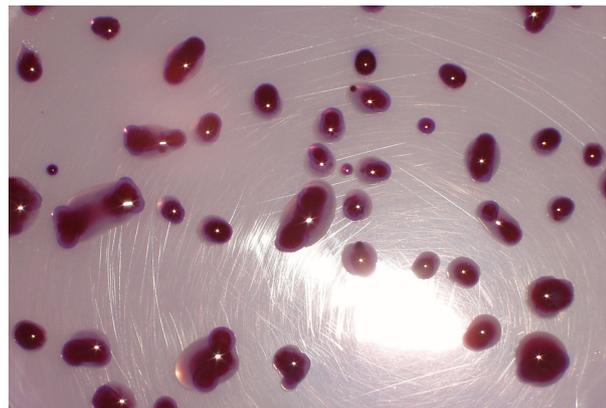
- Mienie NJJ & Theron DJ. 2005. Monitoring of Bacterial Wilt in Potato Propagation Material: A Success Story. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. p. 139-144.
- Momol MT, Ji P, Olson SM & Jones JB. 2006. Integrated management of bacterial wilt on field-grown tomatoes. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Moraes AM (1947) Uma bacteriose vascular da batateira (*Bacterium solanacearum*, E. F. Smith). *Agronomia Lusitana* **9**:277-328
- Ohnishi K, Yoshimochi T, Adachi M, Kiba A & Hikich Yi. 2006. Global regulation of pathogenicity genes at early stages of the infection process of *Ralstonia solanacearum*. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Oliveira ML. 1964. Bacterial wilt of potato and tomato in Portugal. *Agronomia Lusitana*. **26**:273-287.
- Poussier S, Thoquet P, Trigalet-Demmerly D, Barthet S, Meyer D, Arlat M & Trigalet A. 2003. Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via laterations in the *phcA* gene. *Molecular Microbiology*. **49**: 991-1003.
- Pradhanang PM, Elphinstone JG & Fox RTV. 2000. Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. *Plant Pathology*. **49**:403-413.
- Prior P. 2006. A Perspective on Bacterial Wilt. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Priou S, M. Marquez & L. Gutarra. 2006. Biological control of bacterial wilt of potato (*Ralstonia solanacearum*) using an antagonistic endophytic strain of *Pseudomonas putida*. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Rafoss T. 2003. Spatial Stochastic Simulation Offers Potential as a Quantitative Method for Pest Risk Analysis. *Risk Analysis*. **23**:651-661.
- Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Manganot S, Arlat M, Billaut A, Brottier P, Camus JC, Cattolico L, Chandler M, Choisne N, Claudel-Renerd 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 A. 2002. genome Sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*. **415**:497-502.
- Schell, M. A. (2000). Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology*. **38**:263-292.
- Shiomi Y, Nishiyama M, Onizuka T & Marumoto T. 1999. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**:3996-4001.
- Smith JJ & Saddler GS. 2001. The use of avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* to control bacterial wilt disease. In: *Biotic Interactions in plant-pathogen associations*. MJ Jeger & NJ Spence, Eds. CABI Publishing, Wallingford, UK. p. 159-176.
- Sousa Santos M & Henriques L. 1995. Identificação de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith em batateiras provenientes de campos de produção de batata de consumo do Concelho de Cantanhede. Centro Nacional de Protecção da Produção Agrícola. PPA(ID) - 39/95. 9 pp.
- Sousa Santos M, Henriques L. & Cruz L. 1998. Breve síntese sobre os resultados preliminares dos ensaios laboratoriais para prospecção de *Ralstonia solanacearum* em algumas plantas hospedeiras e águas do Vale do Sorraia. DGPC, Lisboa, PPA(IBP) - 7/98, 8 pp.
- Sunaina V. 2006. Viomycin and chalcone metabolites produced by biocontrol agent *Bacillus subtilis* B5 responsible for inhibition of *Ralstonia solanacearum*. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Tans-Kersten J, Huang H & Allen C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*. **183**:3597-3605.
- União Europeia. 1998. Directiva 98/57/CE do Conselho de 20 de Julho de 1998 relativa ao controlo de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* *Jornal Oficial da União Europeia* L 235 de 21/08/1998, 1 - 39.
- União Europeia. 2006. Directiva 2006/63/CE da Comissão de 14 de Julho de 2006 que altera os anexos II a VII da Directiva 98/57/CE do Conselho relativa ao controlo de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* *Jornal Oficial da União Europeia* L 206 de 27/07/2006, 36-106.

- Van Elsas JD, van Overbeek LS & Trigalet A. 2005. The Viable but Non-culturable State in *Ralstonia solanacearum*: Is There a Realistic Threat to Our Strategic Concepts? In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 510 pp..
- Verma RK & Shekhawat GS. 1991. Effect of crop rotation and chemical soil treatment on bacterial wilt of potato. *Indian Phytopathology*. **44**:5-8.
- Vijayaraghavan R & Abraham K. 2006. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in the Management of Bacterial Wilt of Ginger (Rosca). In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Zarate JT, Raymundo AK & Allen C. 2006. Comparative physiological and molecular analyses of wild type and hypervirulent tomato strains of *Ralstonia solanacearum* (E.F. Smith) Yabuuchi *et al.* In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.

Capítulo²

Fidedignidade do diagnóstico da doença do pus ou mal murcho e identificação do seu agente causal em amostras bióticas e ambientais

- 2.1 Detecção e Identificação de *Ralstonia solanacearum* biovar2 / raça 3
- 2.2 Objectivos
- 2.3 Métodos experimentais e de análise de dados
 - 2.3.1 Fases do diagnóstico em diferentes matrizes
 - 2.3.2 Método de aglutinação em lâmina
 - 2.3.3 Análise da fidedignidade dos métodos de rastreio
- 2.4 Análise dos Resultados
 - 2.4.1 Ensaio de aglutinação em lâmina
 - 2.4.2 Fidedignidade dos métodos de rastreio utilizados
- 2.5 Análise Global
- 2.6 Referências Bibliográficas



2.1 | Detecção e Identificação de *Ralstonia solanacearum* biovar 2/raça 3 - Desafios na evolução dos métodos de análise laboratorial

Nos finais do Século XX, a recorrência da doença do pus ou mal murcho da batateira e do mal murcho do tomateiro em Portugal e na Europa, veio recordar um organismo – *Ralstonia solanacearum* - até então dado como afectando principalmente regiões de climas tropicais e sub-tropicais, cuja dispersão que se tornou, de um modo genérico, global.

O estabelecimento de *R. solanacearum* na Europa e a constatação da adaptação de novas estirpes do biovar 2/raça 3 a climas temperados (Bliss *et al.*, 2006), bem como a ameaça à produção e comercialização de tubérculos de batateira entre países da União Europeia, levou a que fosse dada uma particular atenção a este organismo, tanto em termos legais como em termos de investigação, uma vez que se tratava de uma realidade desconhecida, havendo necessidade de avaliar riscos e prejuízos, e desenvolver estratégias de controlo e erradicação.

Os estudos desenvolvidos, até à década de 90, por países onde a doença se tinha estabelecido, afectando plantas solanáceas e outros hospedeiros, não se aplicavam às condições climáticas e sistemas agrícolas europeus, pelo que surgiram numerosos trabalhos, primeiramente avaliando a situação de cada um dos países afectados pelos novos focos (Grousset & Smith, 1998; Turco *et al.*, 1998; Calzolari *et al.*, 1998; De Guenin, 1998; Persson, 1998; Schans & Steeghs, 1998), e posteriormente iniciando estudos relativos à identificação e ecologia de *R. solanacearum* na Europa (Janse & Schans, 1998; Elphinstone *et al.*, 1998, entre outros).

A União Europeia, através da Directiva 2000/29/EC, estabeleceu uma série de requisitos para produção e comercialização de materiais vegetais potenciais portadores de organismos de quarentena (União Europeia, 2000), e promoveu estudos incluídos em Projectos com objectivos distintos, integrando consórcios de diversas instituições pertencentes a diferentes países europeus, nomeando-se alguns desses projectos na Tabela 2.1.

Aquela epifítia mostrou, igualmente, ser um desafio à optimização dos métodos de diagnóstico correntemente utilizados, que preconizavam a utilização de Imunofluorescência Indirecta (IIF) e de testes de patogenicidade, em plantas de tomateiro, para confirmação da positividade de amostras que se tinham revelado positivas ou suspeitas em IIF (Janse, 1988; EPPO, 1990).

Janse (1988) mostrou as potencialidades de IIF para detecção de *R. solanacearum* biovar 2/raça 3 em tubérculos de batateira assintomáticos, após a sua extracção a partir de uma amostra de tecido vegetal obtida a partir de 200 hilos. O limiar de detecção deste método indirecto no diagnóstico era de 10^4 ufc.mL⁻¹, enquanto o teste de patogenicidade permitia obter uma sensibilidade de 10^2 ufc.mL⁻¹, ou seja cerca de 100 vezes superior. Este autor desvalorizava, contudo, a reduzida sensibilidade deste método de rastreio, referindo que, para o universo de amostras sujeitas a análise, apenas um reduzido número mostrava

possuir um baixo nível de células com fluorescência e morfologia características, desde que se utilizasse o antissoro no título correcto. Por outro lado, cumpridos estes requisitos, a proporção de falsos positivos obtidos era de apenas 2 – 3%.

Tabela 2.1 – Projectos de investigação científica integrando estudos sobre *Ralstonia solanacearum* promovidos pela União Europeia em vários domínios.

| Programa | Projecto | Contrato / Acrónimo |
|--------------------------------|--|---------------------|
| SMT | "Community Method for the Detection and Diagnosis of potato Brown Rot" | SMT-4-CT97-2179 |
| FAIR | "Fate, activity and threat of <i>Ralstonia solanacearum</i> , the causal agent of potato brownrot, in european soils, rhizospheres and water systems" | FAIR-CT97-3632 |
| FAIR | "Development of new strategies for resistance engineering in transgenic potato towards <i>Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum</i> and <i>Erwinia carotovora</i> " | FAIR-CT97-3676 |
| FAIR | "The fate, activity and threat of <i>Ralstonia solanacearum</i> ; causal agent of potato brown rot in European soils, rhizospheres and water systems" | FAIR-CT97-3632 |
| Quality of life | "Impact of three selected biotechnological strategies for potato pathogen control on the indigenous soil microbiota" | QLK3-2000-0159 |
| Quality of life | "Management of soil health in horticulture using compost" | QLRT-2000-01442 |
| Scientific Support to Policies | "Development of Generic 'On-site' Molecular Diagnostics for EU Quarantine Pests and Pathogens" | Port Check |

A adopção dos procedimentos descritos por Janse (1988), mimetizados a partir dos anteriormente estabelecidos para detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Comunidade Económica Europeia, 1987), pode ter contribuído para a dispersão de *R. solanacearum* a partir de material de propagação vegetativa possuindo infecções latentes, normalmente associadas a níveis de infecção inferiores a 10^3 ufc.mL⁻¹, inferiores ao limiar de detecção por IIF. Assim, não deverá ser descartada a possibilidade de amostras assintomáticas darem origem a infecções graves em presença de condições propícias ao desenvolvimento da bactéria.

A adopção compulsiva de tolerância zero para materiais potenciais veículos de *R. solanacearum*, após a detecção de um foco da doença na Suécia, na década de 80, criou novos desafios à aplicação e optimização dos métodos de inspecção, até aí apenas visual, bem como dos métodos de diagnóstico a utilizar na detecção, identificação e caracterização deste organismo nocivo na União Europeia e em muitos outros países.

Janse (1996) enumera as medidas a implementar pelos diferentes países da Europa onde se verificaram focos da doença, estabelecendo a comparação com as medidas implementadas com sucesso no século XIX por Koch, para controlo da cólera. Paralelamente, Elphinstone

et al. (1996) procedem ao estudo de diferentes métodos de diagnóstico, determinando o seu limiar de sensibilidade, com vista à detecção de infecções latentes em extractos obtidos de amostras de tubérculos de batateira artificialmente contaminados. Propõem ainda a sua utilização conjunta, na detecção de *R. solanacearum*, de modo a alcançar o diagnóstico com rapidez, fidedignidade e sensibilidade. Esta proposta resulta das potencialidades e fraquezas evidenciadas por cada um dos métodos de diagnóstico empregues. A análise comparativa então efectuada da sensibilidade alcançada para os diferentes métodos (clássicos, serológicos e biomoleculares) encontra-se descrita na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Análise comparativa dos limiares de detecção para os diferentes métodos de diagnóstico utilizados na detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* em extracto obtido de tubérculos de batateira contaminados artificialmente (ufc.mL⁻¹) (adaptado de Elphistone *et al.*, 1996).

| Ensaio | Concentração de células de <i>R. solanacearum</i> em sedimento ressuspenso de batateira | | | | | | | | | | |
|------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|---|
| | 10 ⁸ | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 10 ⁵ | 10 ⁴ | 10 ³ | 10 ² | 10 ¹ | 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 0 |
| DP SMSA | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| ISOL. SMSA | + | + | + | +/- | +/- | - | - | - | - | - | - |
| IFC | + | + | +/- | +/- | +/- | - | - | - | - | - | - |
| IIF | + | + | + | + | +/- | - | - | - | - | - | - |
| ELISA | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| E-ELISA | + | + | + | + | +/- | - | - | - | - | - | - |
| PCR | +/- | +/- | +/- | - | - | - | - | - | - | - | - |
| E-PCR | + | + | + | + | +/- | - | - | - | - | - | - |
| N-PCR | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | - | - |
| E-N-PCR | + | + | + | + | + | +/- | - | - | - | - | - |
| BIOENSAIO | + | + | + | + | + | +/- | - | - | - | - | - |

DP SMSA – diluição em placas com meio semi-selectivo gelosado SMSA; ISOL SMSA – isolamento em meio semi-selectivo gelosado; IFC – “Immunofluorescence colony staining”; IIF – Imunofluorescência indirecta; ELISA – “Enzyme linked immunosorbent assay”; E-ELISA – ELISA após enriquecimento; PCR – Reacção em cadeia da polimerase; E-PCR – PCR após enriquecimento; E-N-PCR – PCR “Nested” após enriquecimento; BIOENSAIO – inoculação de plantas de tomateiro com extractos obtidos de tecidos vegetais e posterior incubação em condições favoráveis ao desenvolvimento de sintomas de doença.

No final da década de 90 surgiram inúmeros trabalhos sobre a aplicabilidade dos métodos serológicos IF (Imunofluorescência) e ELISA (“Enzyme linked immunosorbent assay”) à detecção e identificação de *R. solanacearum*, entre os quais se referem os de: Griep *et al.* (1998), que utilizam anticorpos monoclonais para detecção de estirpes da raça 3; Kang *et al.* (1998), que fazem o estudo da regulação da produção de exopolissacáridos por *R. solanacearum* em plantas e em meio de cultura por imunofluorescência quantitativa (QIF); Van der Wolf *et al.* (1998a), relativo à utilização de uma variante de IF designada IFC (“Immunofluorescence colony staining”), após enriquecimento em meio semi-selectivo; Rajeshwari *et al.* (1998), com a utilização de ELISA para detecção de *R. solanacearum* em sementes de tomateiro.

Mais recentemente, Caruso *et al.* (2002) desenvolvem um “Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect” ELISA com anticorpos monoclonais para detecção de infecções latentes em tubérculos de batateira, e Biosca *et al.* (2005) otimizam este método para detecção de formas cultiváveis e VBNC (“viable but not culturable”) de *R. solanacearum* em águas superficiais. Chandrashekara *et al.* (2006) desenvolvem fragmentos de anticorpos de cadeia simples ligados por transcrição com o gene PhoA de *E. coli*, a serem usados num “kit” de diagnóstico de difusão em látex, para detecção de formas virulentas e avirulentas de *R. solanacearum*.

De entre os diferentes métodos de diagnóstico utilizados, a aplicação, a partir dos anos noventa, de PCR (reação em cadeia da polimerase) ao diagnóstico em microbiologia, permitiu melhorar a sua qualidade em termos de sensibilidade, bem como possibilitar a rastreabilidade da doença. A utilização deste método biomolecular em fitopatologia permitiu igualmente identificar fontes de inóculo e hospedeiros alternativos, avaliar períodos de sobrevivência e conhecer a dinâmica das populações de *R. solanacearum*. Recentemente a aplicação de PCR quantitativo em tempo real permitiu gerar níveis de especificidade e fidedignidade superiores aos obtidos por outros métodos, incluindo PCR tradicional (Gachon *et al.*, 2004).

Após selecção e avaliação dos diferentes métodos de diagnóstico disponíveis para monitorização, em rotina, de *R. solanacearum*, ensaios interlaboratoriais alargados do projecto SMT-4-CT97-2179, referido na Tabela 2.1, integrando 19 laboratórios oficiais de 13 países da União Europeia (entre os quais Portugal), utilizaram, entre outros, os diferentes métodos de identificação descritos na Directiva 98/57/EC (União Europeia, 1998), nomeadamente: diluição em placas utilizando um meio semi-selectivo descrito por Elphinstone *et al.* (1996); ELISA (Robinson-Smith *et al.*, 1995) utilizando três antisoros policlonais comerciais; IIF (Janse, 1988) com três antisoros policlonais, “Fluorescent in situ hybridization” (FISH) de acordo com Wullings *et al.* (1998); PCR utilizando dois pares de “primers” distintos dirigidos para a sequência do gene de 16S rRNA (Seal *et al.*, 1993; Pastrik & Maiss, 2000). Foram ainda utilizadas quatro modalidades de extracção de DNA e aplicados ensaios de patogenicidade em plantas de tomateiro de cultivares susceptíveis (Janse, 1988).

A detecção e identificação de *R. solanacearum* em amostras de tubérculos de batateira mostrou-se fiável na presença de elevados níveis populacionais da bactéria. Contudo, nos casos em que o nível de infecção/contaminação das amostras era reduzido, os resultados obtidos pelos diferentes laboratórios mostraram-se muito variáveis, independentemente do tipo de método utilizado. O método de diluição em placas mostrou ser aquele que apresentava resultados mais consistentes para os diferentes laboratórios e amostras (Elphinstone *et al.*, 2000).

Os métodos serológicos utilizados, IIF e ELISA, mostraram diferentes níveis de sensibilidade. O método IIF, com a utilização de antisoros policlonais, revelou-se mais fidedigno e sensível, especialmente para baixas concentrações de células bacterianas que podiam ser visualizadas

microscopicamente, mas que não produziam qualquer alteração do sinal gerado em ELISA (Elphinstone *et al.*, 2000).

Contrariamente ao esperado, PCR mostrou ser um método menos fiável, produzindo resultados heterogéneos para os diferentes laboratórios, podendo ser afectado por contaminações ocorridas durante o processo de extracção do DNA. Diferentes níveis de experiência entre laboratórios, falta de optimização das condições de amplificação a nível intralaboratorial, bem como de diferenças introduzidas pelas diferentes fontes comerciais de enzimas de amplificação utilizadas, foram as causas apontadas para esta falta de homogeneidade dos resultados. Por outro lado, e como já anteriormente referido, o método de diluição em placas mostrou ser o 'gold standard' da panóplia de métodos de ensaio utilizados nestes estudos (Elphinstone *et al.*, 2000).

Os resultados dos estudos anteriores revelaram, finalmente, a necessidade de utilizar diferentes métodos no rastreio inicial da doença.

À semelhança do que acontece a nível laboratorial, em análise clínica, a validação de métodos alcançada através do projecto referido mostrou-se imprescindível para avaliar a qualidade e aplicabilidade dos diferentes métodos de diagnóstico, bem como evidenciar as dificuldades existentes na obtenção de um diagnóstico rápido, sensível e fidedigno (Van Pelt *et al.*, 1999).

Em 2005, o estado da arte relativamente ao diagnóstico desta doença mostrava que, apesar de um grande esforço aplicado na pesquisa de métodos de diagnóstico adequados, a utilização de meios semi-selectivos para o isolamento continuava a constituir o método essencial ("core test") e o ponto de partida para enriquecimento e utilização no imunodiagnóstico ou em métodos biomoleculares (Elphinstone, 2005). Este autor refere igualmente que a adopção por outros países, como por exemplo Cuba ou Egipto, de esquemas de diagnóstico semelhantes aos validados na Europa, tem permitido reduzir a incidência e o risco de dispersão do patógeno. Em países menos desenvolvidos, a utilização de variados métodos serológicos na prospecção de *R. solanacearum* tem-se mostrado particularmente adequada à monitorização da doença no campo. No que se refere ao uso de PCR, Elphinstone (2005) refere ainda que as vantagens decorrentes da sua elevada sensibilidade e especificidade são muitas vezes menosprezadas pela tendência que possui para produzir resultados falsos negativos, sobretudo em solo ou em material vegetal. Será por isso imperiosa a introdução de ensaios multiplex, com utilização de "primers" para controlos internos de forma a evidenciar a inexistência de inibidores da *Taq* polimerase, bem como de métodos de PCR quantitativo para avaliar a viabilidade do organismo.

É extensa a lista de estudos visando a construção de "primers" específicos para aplicação em diagnóstico, utilizando PCR convencional (Seal *et al.*, 1993; Opina *et al.*, 1997; Boudazin *et al.*, Seal *et al.*, 1999; 1999; Poussier & Luisetti, 2000; Lee & Wang, 2000; Pastrick & Maiss, 2000; Pradhanang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Glick *et al.*, 2002; Pastrick *et al.*, 2002; Schönfeld *et al.*, 2003; Fegan & Prior, 2005; Fouché-Weich *et al.*, 2006, entre outros). A associação de PCR com métodos não tradicionais de detecção do DNA amplificado tem vindo

também a ser utilizada. Entre estes citam-se NASBA ("Nucleic Acid Sequence Based Amplification") (Van der Wolf *et al.*, 1998b) e PCR quantitativo em tempo real (Weller *et al.*, 2000).

Recentemente, Fegan & Prior (2005) criaram um conjunto de "primers", obtido a partir da região ITS ("Internal Transcribed Spacer" do operão de genes de rRNA), que permite diferenciar diferentes sub-espécies (filotipos) de *R. solanacearum* e, de acordo com os resultados obtidos, propõem um novo esquema de classificação, de carácter genómico, para este complexo de espécies. Estes "primers" poderão ser utilizados numa reacção multiplex conjuntamente com o par de "primers" desenhado por Opina *et al.* (1997), que origina um resultado positivo para as estirpes de todos os filotipos (Villa *et al.*, 2003). Fegan & Prior (2006) desenvolveram ainda, com base em sequências de DNA específicas de cada grupo infra-subespecífico (sequevar), métodos de diagnóstico biomoleculares dirigidos para membros específicos deste complexo de espécies.

É notória a dificuldade dos métodos biomoleculares para detectar *R. solanacearum* em amostras ambientais. No que diz respeito ao solo, a utilização de métodos independentes de cultura, também designados por métodos de detecção directa, como DGGE ("Denaturing Gradient Gel Electrophoresis") dirigido para o gene de 16S rRNA, revela a produção de perfis de 'fingerprinting' a partir de solo não cultivado, rizosfera e tecido vegetal, o que possibilita a monitorização de alterações da comunidade microbiana (Van Elsas *et al.*, 2005a). Este método, que permite ultrapassar a impossibilidade de isolar estirpes que se apresentam no estado VBNC ("viable but not culturable") ou que sofreram conversão fenotípica (PC) exige, contudo, equipamentos sofisticados e elevado nível de especialização dos operadores. No entanto, não se conhece ainda completamente o significado ecológico daqueles estados (Van Elsas *et al.*, 2005b).

Poussier *et al.* (2005) referem-se igualmente à inadequabilidade dos métodos existentes, incluindo PCR, para detecção de *R. solanacearum* no solo, onde a qualidade dos resultados obtidos é afectada pela vasta gama de compostos (húmicos e fenólicos) capazes de afectar o processo de amplificação. A utilização de alguns agentes complexantes, como a polivinilpolipirrolidona (PVPP) ou a albumina de soro de bovino (BSA), poderão também melhorar a qualidade da amplificação.

São variados os processos que permitem separar as células bacterianas das matrizes em que se encontram, quer através de processos imunomagnéticos, quer de sondas que reconhecem sequências de DNA específicas (Expert *et al.*, 2000). Os processos de extracção que utilizam microesferas cobertas por sondas de DNA específico, como o Kit Quiagen QIAamp (Quiagen, Hilden, Germany), ou o seu similar MagneSil System (Promega, Madison, Wisconsin, USA), envolvem ainda um número de etapas relativamente elevado, compreendendo uma série de centrifugações a alta velocidade e lavagens, que poderão introduzir contaminações cruzadas. Esta tecnologia utilizada recentemente (2007) nos trabalhos do Projecto da União Europeia "Port Check", que pretende proceder à utilização de PCR em tempo real "On-site" para detecção de *R. solanacearum*, parece encontrar-se ainda aquém do seu objectivo final

relativamente a este organismo, embora pareça possuir elevada sensibilidade e especificidade para o Oomycota *Phytophthora ramorum* (Tomlinson *et al.*, 2005).

A citometria de fluxo (FCM) é um método sofisticado, de aplicação relativamente recente em patologia vegetal, e que permite avaliar o comportamento fisiológico das células recorrendo à tecnologia laser. Neste domínio, foi utilizado pela primeira vez por Chitarra *et al.* (2002) para detecção de *Xanthomonas campestris* em macerados produzidos de sementes de *Brassica* sp.. Van der Wolf *et al.* (2005) utilizaram este método para detectar e identificar células viáveis e VBNC de *R. solanacearum*, bem como para proceder à sua quantificação. Embora a sensibilidade obtida por esta via se mostre elevada - cerca de 10^2 ufc.mL⁻¹ - a sua aplicabilidade actual encontra-se claramente no domínio da investigação.

Os conhecimentos existentes sobre a ampla diversidade fenotípica e genómica de *R. solanacearum* levam a que cada vez mais os métodos de diagnóstico, baseados em características genómicas, procurem a detecção e identificação da diversidade de fenótipos, nomeadamente no que se refere a características importantes em termos epidemiológicos, como por exemplo virulência vs. hospedeiro (Danial *et al.*, 2006). Mesmo a explicação por via genómica dos resultados obtidos por métodos utilizados na caracterização de propriedades fenotípicas, como a determinação do biovar, parecem possuir uma base genética sólida (Denny *et al.*, 2006).

Recentemente, foi ainda desenvolvido um 'microarray' pangenómico (Guidot *et al.*, 2007) que pretende abarcar a diversidade de *R. solanacearum*, e que poderá vir a ser utilizado no diagnóstico.

O trabalho desenvolvido até agora em muitos países da Europa, relativamente ao diagnóstico e epidemiologia de *R. solanacearum* biovar 2, subfenótipo A, raça 3, terá de persistir na medida em que continuamente surgem relatos de novos hospedeiros (Janse *et al.*, 2006). Particularizando, os conhecimentos adquiridos sobre a fidedignidade do diagnóstico para estirpes do biovar 2, subfenótipo A, raça 3 poderão ter que ser reavaliados na identificação de isolados do biovar 1, de largo espectro de hospedeiros (bhr - Capítulo 4), recentemente identificados em Portugal (Cruz *et al.*, 2007). Na verdade, a potencial patogenicidade destas estirpes em hospedeiros diversos, bem como a sua presença em matrizes distintas das habituais, poderá pôr em causa a fidedignidade dos diferentes métodos de diagnóstico empregues, conforme referem Coelho-Netto *et al.* (2003).

Para além dos métodos de diagnóstico que a investigação disponibiliza, é igualmente importante que cada laboratório avalie, com eficácia, a utilização da variada panóplia de métodos disponíveis para detecção e identificação de *R. solanacearum* em rotina. O acesso aos dados de rastreabilidade sobre a variabilidade, natureza das amostras a analisar e métodos de diagnóstico empregues permitirão verificar o contributo dos diferentes métodos de diagnóstico e preconizar alterações fundamentadas que visem, mantendo certos parâmetros de fidedignidade, otimizar também a utilização dos meios disponíveis (MecMenamin *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2002; Miller & Gilligan, 2003; Raoult *et al.*, 2005).

A Directiva 2006/63/CE, publicada em 2006 e em transposição para a legislação nacional em 2007, resultou de introduções e modificações efectuadas na Directiva precedente (98/57/CE) (União Europeia, 1998), relativamente aos métodos utilizados na detecção e identificação de *R. solanacearum* em diferentes matrizes, decorrentes das propostas efectuadas com base nos resultados do projecto SMT-4-CT97-2179. Nestas encontram-se descritos, para as matrizes consideradas mais importantes como veículos deste organismo, os métodos de rastreio, identificação e confirmação da identidade do organismo detectado, com recurso a métodos de diagnóstico clássicos, serológicos e biomoleculares.

Entre 2001 e 2007 muitos estudos têm sido publicados relativamente a *R. solanacearum*. Contudo, muito continua por ser feito no que diz respeito à sua detecção e identificação em certas amostras de origem ambiental, nomeadamente resíduos sólidos e líquidos de indústrias onde se processam solanáceas, solos e águas superficiais. Muitos dos métodos anteriormente referidos, e que normalmente recorrem a técnicas biomoleculares, mostraram-se demasiado sofisticados, tornando-se pouco aplicáveis à rotina, por exigirem procedimentos muito especializados e equipamentos onerosos que não se encontram disponíveis nos laboratórios de análise.

2.2 | Objectivos

A necessidade de implementar medidas de controlo e erradicação da doença do pus ou mal murcho, na presença confirmada de focos ou de fortes suspeitas sobre a natureza do agente causal da doença, leva a que particular atenção seja dada à qualidade dos métodos utilizados no diagnóstico de modo a adoptar, atempadamente, as medidas de contingência julgadas adequadas. Assim, constitui objectivo do presente trabalho avaliar o grau de fidedignidade do diagnóstico presuntivo, dada a sua importância para adopção destas medidas, e verificar a necessidade de tornar os meios de diagnóstico mais ou menos exaustivos em função dos ganhos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos alcançados.

A estratégia adoptada no laboratório de bacteriologia da DGPC, entre 1999 e 2006, foi a de utilizar, em simultâneo, no diagnóstico de amostras de diferentes matrizes, uma panóplia de métodos baseados em diferentes princípios funcionais, de modo a encurtar o período necessário à obtenção de um diagnóstico, quer presuntivo, quer confirmativo, bem como a otimizar a sua fidedignidade. Pretende-se igualmente avaliar o resultado da utilização sistemática e simultânea desta panóplia de métodos de detecção e identificação de *R. solanacearum*, de modo a seleccionar os métodos de rastreio mais adequados à sua detecção em cada matriz, tendo em conta a especificidade de amostras geradas pelos sistemas de produção agrícolas portugueses.

A necessidade de proceder a um diagnóstico rápido e fidedigno de *R. solanacearum* em Portugal levou igualmente ao estabelecimento de um protocolo de cooperação científica com

o Horticulture Research International (HRI) do Reino Unido, daí resultando o desenvolvimento e aplicação de um ensaio de rastreio rápido e fidedigno, baseado num teste de aglutinação em lâmina, com recurso a um antisoro policlonal especificamente produzido a partir de estirpes portuguesas de *R. solanacearum*. Este método foi desenvolvido para aplicação em condições de campo (*in situ*) e igualmente utilizado na confirmação da identidade de colónias suspeitas em laboratório (Lyons *et al.*, 2001). A fidedignidade deste método de rastreio e de confirmação em amostras de diferentes matrizes, bem como a sua utilização individual ou em associação com outros métodos, são também avaliadas.

2.3 | Métodos experimentais e de análise de dados

2.3.1 | Fases do diagnóstico em diferentes matrizes

Os procedimentos laboratoriais utilizados no processamento, análise e estudo das amostras procedentes das matrizes plantas e tubérculos de batateira, plantas de tomateiro e outras de solanáceas cultivadas, nomeadamente pimenteiro, plantas espontâneas, águas superficiais, solos e resíduos líquidos e sólidos (retraço e repiso) das unidades de transformação industrial de tubérculos de batateira e de frutos de tomateiro e pimenteiro, resultaram do disposto no Anexo II da Directiva 98/57/CE do Conselho (União Europeia, 1998) e da experiência adquirida pela participação do corpo técnico do laboratório de fitobacteriologia da DGPC no Projecto da União Europeia - SMT CT97-2179. Os resultados obtidos neste Projecto, que contou com a participação de uma rede de laboratórios oficiais da União Europeia, nomeadamente os progressos alcançados em termos de sensibilidade e fiabilidade do diagnóstico, levaram a que fosse efectuada uma proposta de alteração do Anexo II desta Directiva. Aprovadas as alterações a introduzir, foi publicada uma nova Directiva da Comissão - 2006/63/CE (União Europeia, 2006), que foi recentemente transposta para a legislação portuguesa e já tida em conta desde 2001 para aos ensaios laboratoriais realizados no âmbito do 'Plano de Luta Contra *Ralstonia solanacearum*' em Portugal.

Procedeu-se ainda à introdução, na rotina laboratorial, de pequenas modificações julgadas convenientes, de forma a acelerar o processo de análise em determinados pontos críticos e a aumentar o nível de exigência do diagnóstico, reduzindo o número de resultados falsos negativos ou positivos. Tais modificações encontram-se descritas em procedimentos técnicos internos do Laboratório e validadas em ensaios internacionais interlaboratoriais de competência acreditados do FAPAS ("Food analysis performance assessment scheme", Central Science Laboratory, York, Reino Unido).

Na Tabela 2.3 apresentam-se os diferentes métodos de diagnóstico utilizados nas fases de rastreio, identificação e confirmação de *R. solanacearum* para as diferentes matrizes.

Cabe aqui referir que a fase de rastreio é a mais crítica relativamente à fidedignidade do diagnóstico, uma vez que os métodos utilizados nas fases de identificação e confirmação incidem já sobre presumíveis colónias de *R. solanacearum*, dispensando níveis de sensibilidade tão elevados. Também a especificidade dos métodos de análise empregues no rastreio se torna particularmente relevante. Essa especificidade foi já amplamente validada, aquando da escolha dos métodos a usar em fases precoces do Projecto SMT, pelo que não lhe será dada uma atenção tão particular.

Dá-se um ênfase particular ao método de aglutinação em lâmina e na sua aplicação *in situ*, por se tratar de uma aplicação específica, e desenvolvida no âmbito deste estudo.

Procedeu-se a um diagnóstico faseado baseado em testes de rastreio, identificação e confirmação, conforme mostra o fluxograma da Figura 2.1. O isolamento do agente causal em cultura pura encontra-se referenciado como método essencial e de realização obrigatória.

O método IIF foi realizado utilizando o antígeno policlonal validado - IPO-9523 (União Europeia, 2006).

A determinação do biovar para caracterização das estirpes isoladas foi realizada de acordo com Hayward (1964, 1991).

Tabela 2.3 - Métodos de análise laboratorial utilizados nas diferentes fases do diagnóstico em função da matriz.

| Matriz | Rastreio (extractos) | | | | | Identificação (colónias) | | | | Confirmação/Caracterização | | |
|--------------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|--------------------------|-----|-----|-----|----------------------------|------|------------|
| | ISOL | AGL | IIF | PCR | BIO | ISOL | AGL | PCR | IIF | PAT | BIOV | DNA FING.. |
| Tubérculos | SMSA SPA | * | XD | XD | X | X | X | X | * | X | X | * |
| Plantas solanáceas | SMSA SPA | X | * | XD | X | X | X | X | * | X | X | * |
| Espontâneas | SMSA SPA | X | * | XE | X | X | X | X | * | X | X | * |
| Águas superficiais | SMSA | NA | XE | XE | X | X | X | X | * | X | X | * |
| Solos | SMSA | NA | XE | XE | X | X | X | X | * | X | X | * |
| Resíduos | SMSA | NA | XE | XE | X | X | X | X | * | X | X | * |

ISOL - Isolamento; AGL - Aglutinação; IIF - Imunofluorescência Indirecta; PCR - Reacção em cadeia da polimerase; BIO - Bioensaio; PAT - Ensaio de patogenicidade; BIOV - Determinação do biovar; DNA fingerp. - Métodos de 'fingerprinting' genómico; SMSA - Meio gelosado semiselectivo; SPA - Meio gelosado de sacarose e peptona; X - realizar sempre; D - a partir do extracto; E - após enriquecimento; * - a realizar excepcionalmente; NA - não aplicável.

No que diz respeito aos métodos biomoleculares procedeu-se, em 1999, à substituição da utilização dos "primers" OLY-1/Y2 descritos por Seal *et al.* (1993), que geravam um certo número de resultados falsos positivos, passando a ser utilizados os "primers" 759F e 760R publicados por Opina *et al.* (1997). Este conjunto de "primers" é igualmente preconizado por

Fegan & Prior (2005) para detecção e identificação do complexo de espécies de *R. solanacearum*, por reconhecer e abranger a diversidade genómica deste complexo, não produzindo falsos positivos para organismos taxonomicamente mais distantes (Villa *et al.*, 2003).

A descrição pormenorizada dos métodos e procedimentos operativos, bem como os fluxogramas específicos para cada matriz, encontram-se referidos na Directiva 2006/63/CE (União Europeia, 2006).

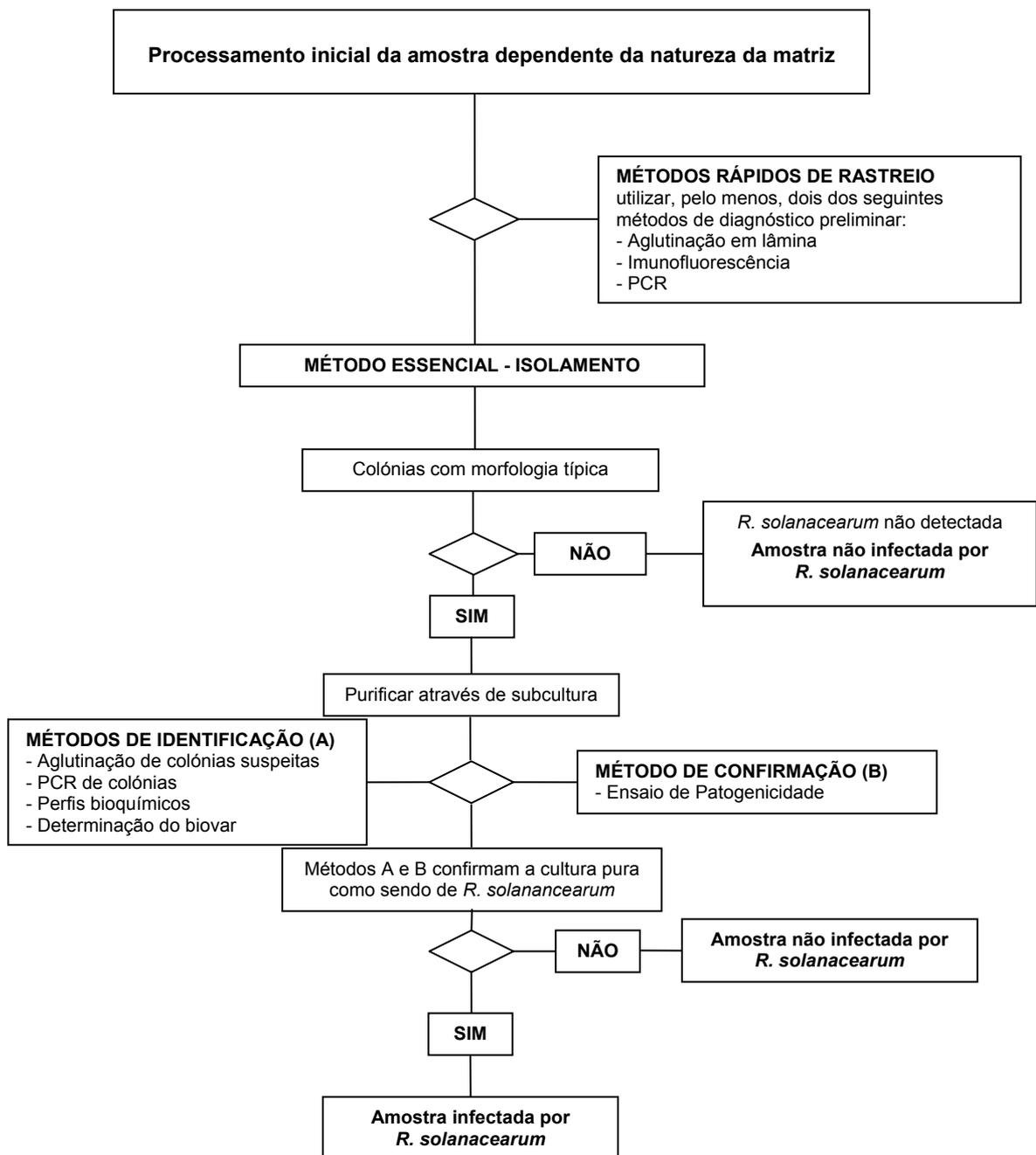


Figura 2.1 – Etapas sequenciais na detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* em diferentes matrizes após processamento inicial da amostra.

2.3.1.1 | Tubérculos de batateira

O processamento inicial da amostra visa a recolha dos hilos, geralmente obtidos a partir de amostras de 200 tubérculos, de acordo com o processo de amostragem preconizado na Directiva 98/57/CE relativa ao controlo de *R. solanacearum* (União Europeia, 1998). Os cones contendo o anel do tecido vascular dos tubérculos são sujeitos a maceração numa solução fosfatada tamponizada (Tampão de extracção - 50 mM, pH 7,0) durante um período variável, dependente da temperatura de incubação. Posteriormente, o líquido de maceração recolhido é sujeito a centrifugação de acordo com o procedimento descrito em União Europeia (2006) e o sedimento final obtido é suspenso num volume de 1mL de solução fosfatada tamponizada (Tampão de ressuspensão -10 mM, pH 7,2).

Na fase de rastreio laboratorial, procede-se à análise da amostra pelas técnicas de aglutinação em lâmina (Lyons *et al.*, 2001), PCR directo e após enriquecimento (Seal *et al.*, 1993; Opina *et al.*, 1997; Pastrok & Maiss, 2000), diluição em placas utilizando o meio semi-selectivo modificado SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996), e bioensaio em plântulas susceptíveis de tomateiro (Janse, 1988).

A identificação e confirmação da presença de *R. solanacearum* efectiva-se pela aplicação das técnicas de aglutinação em lâmina e de PCR em colónias "suspeitas", bem como de ensaios de patogenicidade. Procede-se igualmente à realização de reisolamentos a partir das plantas de tomateiro inoculadas nos bioensaios exibindo sintomas característicos da doença (Lelliott & Stead, 1987), com posterior confirmação da identidade dos organismos reisolados utilizando técnicas laboratoriais baseadas em princípios funcionais distintos.

2.3.1.2 | Plantas de batateira, tomateiro e de outras solanáceas cultivadas

Foram analisadas laboratorialmente plantas apresentando, ou não, sintomas característicos da doença. Proceceu-se à realização de macerados a partir das zonas de transição de tecidos vegetais evidenciando sintomas de doença. No caso de plantas com potenciais infecções latentes, retirou-se tecido vegetal de regiões das plantas onde a probabilidade de conseguir, com sucesso, isolar a bactéria seria superior. A escolha dos locais baseou-se em resultados dos trabalhos descritos em 2.3.2.3. Os tecidos vegetais foram macerados em solução fosfatada tamponizada (Tampão de extracção - 50 mM, pH 7,0) (União Europeia, 2006).

Na fase de rastreio utilizaram-se várias técnicas capazes de permitir a obtenção de um diagnóstico rápido e fiável a partir dos extractos vegetais produzidos por maceração, nomeadamente através do uso de diluição em placas utilizando meio geral de sacarose de agar e peptona (SPA) (Lelliott & Stead, 1987) e semi-selectivo SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996), PCR directo e após enriquecimento (suspeita de infecções latentes), aglutinação em lâmina e bioensaio de acordo com procedimentos previamente descritos (União Europeia, 2006).

Tanto no tomateiro como em batateira é comum a presença de sintomas associada a outros

agentes causais e, por vezes, a presença simultânea de infecções causadas por *R. solanacearum* bem como por outras bactérias fitopatogénicas. Nestes casos, e sempre que ocorram dúvidas relativamente à identidade das bactérias fitopatogénicas presentes, recorre-se, à semelhança de Gouriet *et al.* (2005), ao método JNSP (“Je ne sais pas”) o que vou isolar. Assim, de modo a obter um diagnóstico fiável num espaço de tempo reduzido, recorre-se ao isolamento em diferentes meios de cultura, gerais e/ou semi-selectivos, adequados ao isolamento dos potenciais agentes causais. A mesma estratégia pode ser adoptada para amplificação do DNA directamente a partir de lisados de extractos vegetais.

A identificação de *R. solanacearum* e confirmação do diagnóstico foi efectuada com recurso às técnicas já descritas para os tubérculos de batateira.

2.3.1.3 | Plantas espontâneas

As plantas espontâneas foram analisadas com recurso às técnicas laboratoriais clássicas, serológicas e biomoleculares já referidas, nomeadamente diluição em placas utilizando o meio nutritivo gelosado semiselectivo SMSA, aglutinação em lâmina com antisoro policlonal, IIF, PCR directo ou após enriquecimento (E-PCR), e ainda, bioensaios e ensaios de patogenicidade. A identificação e confirmação da identidade dos isolados obtidos foram efectuadas de acordo com os procedimentos já referidos para as matrizes supracitadas.

2.3.1.4 | Águas superficiais

A colheita de águas superficiais pressupõe a recolha de duas sub-amostras para contentores estéreis (250 mL por sub-amostra) por ponto de colheita, o seu acondicionamento e transporte em condições de refrigeração e subsequente processamento laboratorial num período máximo de 24 h, de acordo com a Directiva 2006/63/CE (União Europeia, 2006).

Após o processamento inicial da amostra, constituído por passos de purificação e concentração, o rastreio de *R. solanacearum* em águas superficiais pressupõe a diluição em placas utilizando o meio semi-selectivo SMSA, o enriquecimento da amostra no mesmo meio semi-selectivo líquido para posterior utilização em métodos de detecção directa (imunofluorescência e PCR) e bioensaio em plantas de tomateiro de cultivares muito susceptíveis a este organismo.

Posteriormente, para amostras revelando resultados potencialmente positivos nos testes de rastreio, procede-se à confirmação da identidade do organismo isolado por aglutinação em lâmina das colónias suspeitas e sua posterior transferência para o meio de cultura geral SPA, para verificação das suas características morfológicas e culturais, PCR de lisados das colónias suspeitas, e patogenicidade em plantas de tomateiro com as características anteriormente descritas.

2.3.1.5 | Solos

Foram efectuadas colheitas de solo em parcelas com solanáceas cultivadas apresentando sintomas de doença, bem como noutras em regime de quarentena por períodos de um até quatro anos.

De modo a averiguar a adaptabilidade dos métodos de amostragem para recuperar *R. solanacearum* a partir deste substrato, aplicou-se o método proposto por Pradhanang (1999) a duas parcelas distintas onde, em pleno ciclo cultural, tinha sido detectada a presença de *R. solanacearum*: uma na região do Alentejo (Mora), onde se tinha cultivado tomateiros destinados à produção de tomate para indústria e na qual se tinha já procedido ao arranque e destruição da cultura alguns dias antes da colheita de solo, e outra na região do Oeste (Cela, Concelho Nazaré), numa estufa de tomateiros para produção de tomate destinada ao consumo em fresco, com as plantas ainda presentes.

Os procedimentos laboratoriais utilizados com vista à recuperação de *R. solanacearum* a partir do solo incluíram a extracção da bactéria a partir desta matriz e a sua concentração (União Europeia, 2006). À semelhança do referido para as outras matrizes em estudo, utilizaram-se, em simultâneo, diferentes técnicas laboratoriais baseadas em princípios funcionais distintos, como diluição em placas utilizando o meio de cultura semi-selectivo SMSA, E-PCR, aglutinação aplicada a colónias suspeitas, PCR dessas mesmas colónias e bioensaio. Do mesmo modo se procedeu à confirmação da identificação dos isolados obtidos utilizando os procedimentos descritos para as outras matrizes.

2.3.1.6 | Unidades de processamento industrial de tubérculos de batateira, tomate e pimento

A riqueza da flora saprofítica destas matrizes torna imperioso o acondicionamento e transporte em condições de refrigeração, bem como o processamento laboratorial das amostras num período de tempo relativamente reduzido (inferior a 24 h).

Os procedimentos laboratoriais utilizados foram semelhantes aos descritos para as águas superficiais ou solos. Assim, no que diz respeito às instalações de transformação industrial de tomate e pimento, os resíduos sólidos, constituídos por reço e lamas, foram processados de acordo com os procedimentos descritos para a análise de solos, enquanto que no caso dos resíduos líquidos se procedeu conforme referido para águas superficiais. No entanto, a concentração da amostra foi em certos casos dispensada, dado que a riqueza da flora saprofítica presente nestas matrizes pode, em muitos casos, condicionar ou mesmo inibir o crescimento de *R. solanacearum* em meio de cultura, bem como afectar a amplificação do DNA alvo por PCR (União Europeia, 2006).

Para instalações de transformação industrial e embalagem de tubérculos de batateira, as terras aderentes, lamas e epiderme dos tubérculos foram processadas como solos, e os resíduos líquidos, como águas superficiais.

Finalmente, os tubérculos de refugo foram tratados individualmente sendo observados e retirados os hilos que foram posteriormente macerados e sujeitos aos ensaios laboratoriais descritos para tubérculos de batateira.

2.3.2 | Método de aglutinação em lâmina

2.3.2.1 | Produção do antisoro policlonal e do reagente de aglutinação

Foi produzido um antisoro policlonal contra a estirpe Portuguesa de *R. solanacearum* patogénica CPBF 666. N. Lyons procedeu à extracção de lipopolissacáridos e posterior inoculação de fêmeas de coelhos brancos da Nova Zelândia, de acordo com o procedimento de Lyons & Taylor (1990).

A produção do reagente de aglutinação em lâmina recorreu à utilização de uma suspensão de células mortas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598) em PBS contendo azida sódica, à qual foi adicionado o antisoro produzido na diluição adequada, tampão fosfatado e uma solução de cloreto de pararosnilina em etanol a 70%.

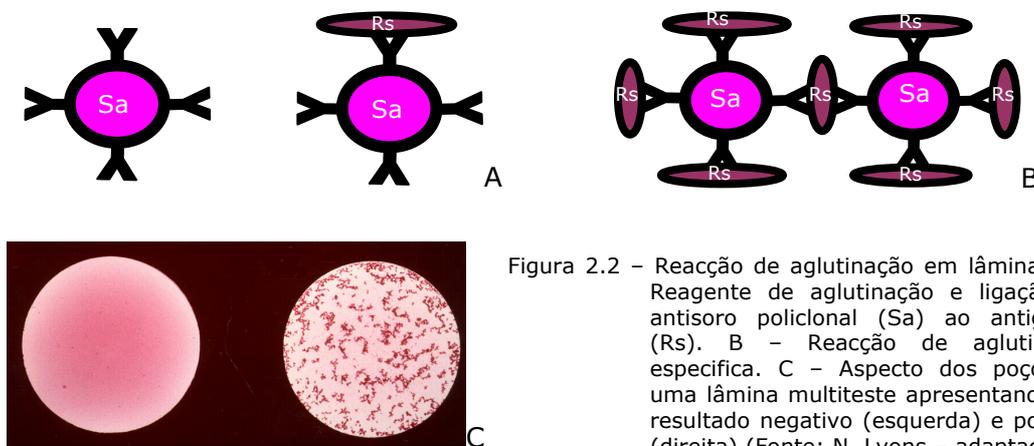


Figura 2.2 – Reacção de aglutinação em lâmina. A – Reagente de aglutinação e ligação do antisoro policlonal (Sa) ao antígeno (Rs). B – Reacção de aglutinação específica. C – Aspecto dos poços de uma lâmina multitestes apresentando um resultado negativo (esquerda) e positivo (direita) (Fonte: N. Lyons – adaptação).

O produto resultante possui uma coloração vermelho-carmim e, quando misturado (5 μ L) no poço de uma lâmina multitestes com idêntico volume de uma suspensão contendo células de uma estirpe bacteriana homóloga, desenvolve uma reacção de aglutinação com a formação de aglomerados de células de tamanho e cor característicos, e que é resultado da actuação das células de *S. aureus* como conjugado, formando-se como que uma rede de células bacterianas (Figura 2.2).

2.3.2.2 | Aglutinação em lâmina em plantas de tomateiro artificialmente inoculadas

Inocularam-se 10 plantas de tomateiro susceptíveis, com duas a três folhas verdadeiras, na região acima dos cotilédones, injectando-se 5µL de uma suspensão do isolado CPBF 676 de *R. solanacearum* contendo 10^8 ufc.mL⁻¹. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em condições óptimas à progressão da doença (temperatura de 25°C e 16 horas de fotoperíodo), até observação de sintomas típicos de doença (Lyons *et al.*, 1999).

Recolheram-se pequenas secções do caule das plantas após zero, 18, 24, 42, 48 e 66 horas de inoculação. Procedeu-se à realização de macerados dessas secções em tampão de maceração, retirando-se uma alíquota para realização do ensaio de aglutinação e utilizando-se a parte remanescente para efectuar o reisolamento em SPA (União Europeia, 2006).

2.3.2.3 | Aglutinação *in situ* em plantas de tomateiro e de batateira

Foram analisadas plantas de tomateiro da cultivar 'Genaro' numa estufa da região de Valado de Frades, pertencente ao aproveitamento hidro-agrícola de Cella. Na fase inicial do surto apenas algumas das plantas, já com cerca de dois metros de altura, apresentavam sintomas típicos da doença, com flacidez das folhas do terço superior da parte aérea e murchidão de alguns frutos nos cachos em plena maturação. As plantas que não evidenciavam sintomas de doença distribuíam-se de forma irregular entre as primeiras. A doença progrediu de forma rápida entre visitas efectuadas com periodicidade semanal, acabando por afectar toda a estufa e impedindo a colheita dos frutos.

Amostras de águas superficiais e de solo foram colhidas no local e analisadas em laboratório, de acordo com os procedimentos referidos em 2.3.1.4 e 2.3.1.5. Paralelamente, numa primeira fase, foram colhidas plantas que foram igualmente analisadas laboratorialmente. Retiraram-se pequenas secções de caule de aproximadamente 0,5 g a intervalos de 10 centímetros entre a região do colo e a extremidade superior do caule, incluindo pequenas porções de tecido vascular.

Os pequenos pedaços de caule foram macerados em tampão de maceração e os extractos produzidos foram utilizados para proceder ao isolamento nos meios gelosados de SPA e de SMSA. A confirmação da identidade das colónias isoladas foi efectuada por IF, PCR e ensaios de patogenicidade em plantas de tomateiro.

Aos frutos evidenciando sintomas de murchidão retiraram-se pequenos pedaços de polpa que foram depois sujeitos a idêntico processamento.

O ensaio de aglutinação em lâmina foi efectuado de imediato a partir dos extractos produzidos para os diferentes órgãos, misturando 5µL reagente com 5µL de extracto, num poço de uma lâmina multiteste, durante cerca de cinco segundos. A presença de uma aglutinação facilmente visível e produzida num curto espaço de tempo foi lida como resultado positivo. A positividade de todas as amostras foi comparada com a reacção produzida por uma suspensão não viável de uma estirpe patogénica de *R. solanacearum*

(OD 0,4; 620 nm), considerada como controlo positivo.



Figura 2.3 - Realização de ensaios de aglutinação *in situ*. A – Remoção não destrutiva de um pequeno segmento de caule de tomateiro para realização do ensaio de aglutinação em pleno campo. B – Realização do ensaio de aglutinação em tubérculos sintomáticos directamente a partir de exsudado bacteriano

O funcionamento deste teste de rastreio, para despistagem rápida da doença em pleno campo (Figura 2.3), foi avaliado em visitas posteriores à mesma parcela, e utilizado em plantas apresentando sintomas correspondentes a diferentes graus de severidade da doença, bem como em plantas com infecções latentes.

No que diz respeito a plantas de batateira, a inspecção visual permitiu identificar dois campos do mesmo aproveitamento hidroagrícola, afectados pela doença, mostrando diferentes níveis de incidência e de severidade da doença. Os ensaios foram efectuados a partir de caules de plantas de batateira, bem como de tubérculos apresentando exsudado bacteriano emergente.

2.3.2.4 | **Detecção de *Ralstonia solanacearum* em extractos obtidos de amostras ambientais**

Procedeu-se à realização de ensaios de aglutinação em lâmina em suspensões resultantes de extractos concentrados de águas superficiais e resíduos líquidos de indústrias, ou de substratos que sofreram uma maceração inicial (solos e resíduos sólidos de industriais de transformação). De igual modo se adicionou 5 μ L da suspensão obtida a igual volume de reagente previamente depositado no poço de uma lâmina multiteste. Procedeu-se à leitura comparativa dos resultados relativamente aos obtidos para controlos positivos e negativos efectuados na mesma lâmina.

2.3.2.5 | Confirmação da identidade de colónias suspeitas em laboratório

O ensaio de aglutinação em lâmina tem vindo a ser também correntemente utilizado na confirmação da identidade de colónias suspeitas obtidas de diluição em placas ou isolamento em meio gelosado SMSA ou SPA, respectivamente, para todas as matrizes sujeitas a análise laboratorial. Neste caso, uma pequena porção de cada colónia suspeita é retirada com um auxílio de um palito estéril e misturada com 5µL de reagente de aglutinação numa lâmina multiteste.

2.3.3 | Análise da fidedignidade dos métodos de rastreio utilizados na detecção de *Ralstonia solanacearum* em matrizes bióticas e ambientais

A necessidade de proceder ao diagnóstico a partir de amostras bióticas e ambientais, bem como o desconhecimento relativamente à realidade epidemiológica das amostras bióticas a analisar laboratorialmente (amostras cegas), reflecte a necessidade de recorrer a métodos de diagnóstico baseados em princípios funcionais distintos, rápidos, fidedignos e adequados às diferentes matrizes.

Para determinada matriz, o número de amostras utilizadas para análise estatística dos resultados obtidos variou em função da natureza dos métodos utilizados.

Para determinação dos parâmetros de fidedignidade dos métodos de diagnóstico utilizados procedeu-se ao cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), de acordo com as equações:

| | | | |
|----------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|
| $^{1}Pv/(Pv+Nf)*100$ | $Nv/(Nv+Pf)*100$ | $Pv/(Pv+Pf)*100$ | $Nv/(Nv+Nf)*100$ |
| Sensibilidade | Especificidade | Valor preditivo positivo | Valor preditivo negativo |
| (SENS) | (ESP) | (VPP) | (VPN) |

¹Pv - nº positivos verdadeiros, Pf - nº positivos falsos, Nv - nº negativos verdadeiros, Nf - nº negativos falsos.

Em função dos resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais do projecto SMT referido anteriormente, o método de diluição em placas foi utilizado como "gold standard" na determinação da fidedignidade do diagnóstico relativamente aos métodos, ou combinações de métodos, utilizados no rastreio e identificação.

De modo a avaliar a associação entre os resultados obtidos por cada método relativamente ao método de diluição em placas, procedeu-se à construção de tabelas de contingência e à sua análise usando o teste de χ^2 (Zar, 1998).

Sempre que apropriado, foram igualmente calculados os “odds ratios” (ORs) e os respectivos intervalos de confiança de 95% (Gardner & Altman, 1989).

Deve referir-se, contudo, que para a generalidade das matrizes, exceptuando-se apenas o tomateiro, o número de casos clínicos positivos (incidência da doença para o período entre 1999 e 2006 – Capítulo 3) foi muito inferior ao número de casos negativos. Por outro lado, o número de resultados analisado por matriz e método é heterogéneo. Deste modo, e de forma a obter uma confiança de 95% no cálculo de comparações múltiplas para a sensibilidade e especificidade alcançadas nos métodos de rastreio de diferentes matrizes, procedeu-se à correcção do nível de significância (α) de acordo com a equação:

$$(1-\alpha')^k=0,95$$

Em que k representa o número de comparações efectuadas, sendo o cálculo dos intervalos de confiança de 95 % das proporções obtido por:

$$p \pm t_{\alpha', n-1} * sd$$

p - incidência da doença

t - distribuição T de Student

$$q = p - 1$$

sd - desvio padrão

$$sd = \sqrt{pq/n-1}$$

α - nível de significância

n - dimensão da amostra

2.4 | Análise dos Resultados

2.4.1 | Ensaio de aglutinação em lâmina

2.4.1.1 | Plantas infectadas artificialmente

A Tabela 2.4 refere os resultados obtidos para a reacção de aglutinação em lâmina, isolamento e presença de sintomas nas folhas localizadas nos terços inferior, médio e superior de plantas de tomateiro susceptíveis sujeitas a inoculação, ao longo do tempo.

Todos os extractos vegetais produzidos a partir de plantas com sintomas mostraram resultados positivos para aglutinação, enquanto que para os extractos produzidos a partir dos controlos negativos não se observou qualquer aglutinação. Em todos os casos de reacção positiva, a aglutinação produziu-se num curto espaço de tempo (duração inferior a 10 segundos).

Apesar de as plantas mostrarem o início de sintomas visíveis cerca de 3 dias após inoculação, foi possível isolar a bactéria a partir de determinados locais da planta cerca de 18 horas após inoculação, bem como obter uma reacção de aglutinação positiva após um período de 24 horas, mostrando estes resultados que ambos os métodos permitem a detecção de infecções latentes (Figura 2.2).

Os métodos de imunodiagnóstico parecem possuir, no caso de algumas doenças vasculares, vantagem sobre os métodos de diagnóstico que se baseiam no isolamento. Este aspecto foi constatado por Linfield *et al.* (1995) na detecção de *Botrytis allii* por ELISA. Estes autores constataram que a produção de lipopolissacáridos solúveis por este fungo fitopatogénico permitia a sua detecção precoce através daquele método.

Tabela 2.4 – Resultados dos ensaios de aglutinação em lâmina e recuperação de *Ralstonia solanacearum* de três locais das plantas inoculadas, durante um período de incubação necessário ao desenvolvimento de sintomas da doença.

| Tempo (horas) | Local da planta* | Aglutinação | Isolamento em SPA | Presença sintomas |
|---------------|------------------|-------------|-------------------|-------------------|
| 18 | A | - | + | |
| | B | - | - | - |
| | C | - | - | |
| 24 | A | + | + | |
| | B | - | - | - |
| | C | - | - | |
| 42 | A | + | + | |
| | B | + | + | - |
| | C | - | - | |
| 48 | A | + | + | |
| | B | + | + | - |
| | C | + | + | |
| 66 | A | + | + | |
| | B | + | + | + |
| | C | + | + | |

* A - Terço inferior da folhagem, B - Terço médio da folhagem, C - Terço superior da folhagem, + - 100% casos positivos, - - 100% casos negativos.

2.4.1.2 | Utilização *in situ*

Os resultados positivos, obtidos para os ensaios de aglutinação em lâmina *in situ*, foram sempre confirmados por resultados positivos nos ensaios laboratoriais de rotina descritos para o tomateiro. Não foram detectados falsos resultados negativos, mesmo nas plantas evidenciando sintomas muito ténues da doença.

Os resultados positivos obtidos para aglutinação em lâmina resultaram de extractos efectuados a partir de tecidos da região do colo e do terço inferior do caule até cerca de 30 cm de altura. As reacções efectuadas a partir de regiões do terço superior do caule

originaram sistematicamente resultados negativos, mesmo quando presentes sintomas evidentes de doença.

Foram também obtidos cerca de 60% de resultados positivos para os ensaios de aglutinação efectuados a partir de cachos de frutos em plena maturação exibindo sintomas de flacidez, do terço inferior das plantas.

No caso de tubérculos de batateira, exibindo sintomas de doença com presença de exsudado bacteriano, obtiveram-se igualmente resultados positivos que foram confirmados nos ensaios laboratoriais utilizados em rotina.

O método de aglutinação em lâmina manifestou possuir potencialidades na detecção de *R. solanacearum* como ensaio de rastreio em pleno campo e em laboratório. A utilização de um "Kit" de aglutinação em lâmina para detecção preliminar da doença em fase muito precoce no campo, nomeadamente em presença de infecções latentes, mostrou-se também possível, podendo, no entanto, os resultados obtidos depender das quantidades de antigéneos presentes na planta. Nestes casos, torna-se mais difícil conseguir, com sucesso, o isolamento, uma vez que os baixos níveis populacionais da bactéria e o crescimento rápido da flora saprofítica são condicionantes.

O método de aglutinação em lâmina utilizando como conjugado *Staphylococcus aureus* mostrou-se rápido, de fácil utilização e barato, necessitando apenas de equipamento básico e permitindo a sua utilização por técnicos menos qualificados. Por outro lado, a sua inclusão em programas de prospecção permite efectuar uma triagem inicial da doença e reduzir o número de amostras a encaminhar para laboratório.

2.4.1.3 | Utilização em extractos de amostras ambientais

A aplicação directa do método de aglutinação em lâmina na detecção de *R. solanacearum*, em extractos obtidos após processamento de amostras de águas superficiais, solos e resíduos líquidos e sólidos resultantes da transformação industrial de tubérculos e frutos de plantas solanáceas, não permite obter reacções de aglutinação claramente positivas. Nestas suspensões, os níveis populacionais deste organismo são normalmente mais baixos (10^2 a 10^3 ufc.L⁻¹ para águas superficiais, p. ex.) que os presentes em material vegetal sintomático ou com infecções latentes.

Para estas matrizes, o método de aglutinação em lâmina deverá assim ser utilizado apenas na "identificação" de presumíveis colónias de *R. solanacearum*.

2.4.1.4 | Utilização na confirmação da identificação de colónias suspeitas

O método de aglutinação em lâmina origina resultados positivos muito característicos na presença de estirpes de *R. solanacearum* do biovar 2/ raça 3, produzindo-se a aglutinação em alguns segundos. O resultado da reacção de aglutinação pode ser comparado com a

aglutinação produzida por uma suspensão de um controlo positivo. Reacções atípicas são consideradas negativas e diferem em cor, tamanho dos aglomerados e tempo de reacção.

Tratando-se de um antisoro policlonal, a presença de reacções cruzadas é possível. No entanto, nestes casos a reacção de aglutinação mostra-se, geralmente, incaracterística.

2.4.2 | Fidedignidade dos métodos de rastreio utilizados

Em primeiro lugar deve referir-se novamente que, resultando os dados aqui estudados da realidade epidemiológica das amostras bióticas e ambientais colhidas no âmbito do “Plano de Luta Contra *Ralstonia solanacearum*” entre 1999 e 2006 em Portugal, o número de amostras analisado por matriz é variável, e o número de métodos aplicados à detecção e identificação deste organismo, nas diferentes matrizes, é heterogéneo.

O nível populacional de *R. solanacearum* nas amostras de diferentes matrizes poderá, por outro lado, ser também muito variável, e poderá interferir, em certos casos, no resultado final do diagnóstico, por ser inferior ao limite de detecção dos métodos utilizados em análises de rotina.

2.4.2.1 | Amostras bióticas

Tubérculos de batateira

Em virtude dos focos que promoveram a recorrência da doença na década de 90 poderem ter origem em tubérculos de batateira com infecções latentes, e da existência de tolerância zero no que diz respeito a este organismo nocivo, foi posto um grande esforço no trabalho laboratorial, por forma a obter um diagnóstico fidedigno em amostras desta matriz.

No caso da batateira foi sujeito a análise laboratorial um reduzido número de plantas apresentando sintomas de doença, pelo que os resultados obtidos através do diagnóstico incidiram, sobretudo, sobre amostras de tubérculos.

Parece existir uma associação significativa entre a presença de sintomas da doença visíveis e os resultados das análises laboratoriais ($\chi^2 = 1,167$; $p=0,2799$). Existe, contudo, uma clara diferença entre o número de amostras apresentando sintomas e o resultado final do diagnóstico, correspondendo cerca de 44,5% dos casos positivos a amostras com infecções latentes.

Conforme se mostra na Tabela 2.5, é vasta a panóplia de métodos de rastreio empregues, uma vez que esta fase do diagnóstico é crítica, conduzindo, ou não, à detecção de *R. solanacearum*, e condicionando o resultado final da análise.

Entre os vários métodos apresentados, poderá fazer-se a distinção entre aqueles que permitem obter um resultado presuntivo no prazo de 24 a 48 horas, como D-IIF e D-PCR ou E-PCR, e outros, como a aglutinação a partir de colónias ou o bioensaio, que permitem uma leitura mais tardia dos resultados.

A aglutinação em lâmina tem vindo a ser aplicada nesta matriz, sobretudo na “identificação” de colónias suspeitas obtidas em meio semi-selectivo após seis dias de incubação. A sua utilização na detecção de *R. solanacearum* em extractos não tem sido realizada de forma sistemática na análise laboratorial, uma vez que a quase totalidade das amostras de tubérculos não apresentava sintomas visíveis de doença e que, na presença de infecções latentes, o nível da população bacteriana se pode situar abaixo do limiar de detecção deste método.

O bioensaio poderá revelar a presença de sintomas característicos de doença para amostras com elevados níveis populacionais, passados quatro dias da inoculação.

Tabela 2.5 - Fidedignidade de diferentes métodos de diagnóstico na detecção de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batateira utilizando o isolamento em meio glosado modificado SMSA como 'gold standard' (%).

| | AGL | D-IIF | D-PCR | E-PCR | BIO |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Positivos V | 1,4 (4)* | 1,3 (9) | 1,4 (3) | 2,0 (14) | 1,4 (6) |
| Positivos F | 0,0 (0) | 4,3 (29) | 0,5 (1) | 0,6 (4) | 0,0 (0) |
| Negativos V | 98,6 (292) | 94,4 (644) | 98,2 (214) | 97,4 (671) | 98,6 (419) |
| Negativos F | 0,0 (0) | 0,0 (0) | 0,0 (0) | 0,1 (1) | 0,0 (0) |
| SENS | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 93,3 | 100,0 |
| ESP | 100,0 | 95,7 | 99,5 | 99,4 | 100,0 |
| VPP | 100,0 | 23,7 | 75,0 | 77,8 | 100,0 |
| VPN | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 99,9 | 100,0 |

AGL - Aglutinação em lâmina; D-IIF - Imunofluorescência indirecta sem enriquecimento; D-PCR - Reacção em cadeia da polimerase sem enriquecimento; E-PCR - Reacção em cadeia da polimerase com enriquecimento; BIO - Bioensaio; * - Os valores assinalados entre parêntesis referem-se ao número de casos em cada categoria.

Os métodos D-IIF, D-PCR e E-PCR possuem elevados níveis de sensibilidade e especificidade, parecendo não haver qualquer vantagem, neste caso, em proceder ao enriquecimento do extracto em meio líquido durante 48 horas. Possuem igualmente elevados valores preditivos para amostras negativas. Inversamente, os valores preditivos mais baixos para as amostras positivas poderão, em parte, resultar do baixo número de casos positivos nas amostras estudadas, conduzindo a algum enviesamento na análise do seu potencial de detecção neste tipo de amostras.

O limiar de detecção conseguido sem recorrer a processos de purificação de DNA, ou seja, promovendo apenas a libertação de DNA por utilização de choque térmico, e utilizando os “primers” desenhados por Opina *et al.* (1997), foi de 10^3 ufc.mL⁻¹. Para níveis populacionais

inferiores, a obtenção de resultados positivos só se mostrou possível utilizando métodos de extracção e purificação de DNA mais sofisticados (Sousa Santos *et al.*, 1999).

No que diz respeito a D-IIF é também elevado o número de amostras consideradas suspeitas (14,03%), por possuírem células com fluorescência e/ou morfologias características semelhantes às de *R. solanacearum*, cuja identidade não é confirmada por isolamento e ensaios de patogenicidade.

Resultados positivos para aglutinação em lâmina de colónias suspeitas e bioensaio, permitem concluir que o resultado final da amostra é positivo, embora seja usual proceder a essa confirmação por reisolamento, PCR de lisados de colónias suspeitas e ensaio de patogenicidade, procedimentos que se tornam dispensáveis. Esta conclusão poderá ser discutível na medida em que não implica o cumprimento dos Postulados de Koch.

Tomateiro

A utilização de diversas técnicas laboratoriais, baseadas em princípios biológicos distintos, permitiu a detecção e identificação quase sistemática de *R. solanacearum* em plantas com sintomas característicos da doença. Verifica-se que existem diferenças significativas entre a presença de sintomas visíveis da doença e a identificação de *R. solanacearum* nas amostras em estudo ($\chi^2 = 8,697$; $p=0,0032$), uma vez que sintomas característicos da doença, como murchidão e necrose dos feixes vasculares poderão ser atribuíveis a outras causas, incluindo outras bactérias ou fungos fitopatogénicos (23,88% dos casos em que se procedeu ao registo dos sintomas). Assim, a correlação entre a presença destes sintomas e a identificação de *R. solanacearum* não é absoluta.

Foi igualmente possível identificar este organismo a partir de plantas com infecções latentes, obtendo-se resultados positivos nos ensaios de rastreio de aglutinação em lâmina e de isolamento.

Sthephani *et al.* (2005) utilizando em condições experimentais os métodos propostos pelos trabalhos do projecto SMT e agora descrito na Directiva 2006/63/CE, conseguiram detectar e identificar *R. solanacearum* numa amostra em que procederam à adição de um segmento de caule infectado a 999 potencialmente sãos, revelando também, deste modo, a elevada sensibilidade dos métodos de diagnóstico disponíveis para esta matriz.

No que diz respeito ao tomateiro, E-PCR parece não possuir grandes vantagens relativamente a D-PCR uma vez que a sua utilização implica maiores recursos e que os seus resultados são obtidos passadas 48 horas, altura em que já é possível visualizar colónias típicas de *R. solanacearum* em SPA e proceder à confirmação da sua identidade por aglutinação em lâmina. Deste modo, a sua utilização foi abandonada nesta matriz.

A D-PCR possui elevados padrões de fiabilidade (Tabela 2.6) e a obtenção de falsos negativos pode facilmente ser ultrapassada pela utilização de polivinilpolipirrolidona, que complexa parte importante dos inibidores da amplificação presentes nos extractos obtidos a

partir de tomateiro, ou pela realização de diluições decimais a partir dos extractos iniciais, em se tratando de material sintomático (Cruz, 1996).

O ensaio de aglutinação em lâmina, realizado a partir dos macerados iniciais possui, comparativamente aos outros métodos apresentados, valores muito semelhantes de avaliação dos parâmetros de qualidade (Tabela 2.6). Por outro lado, possui valores de sensibilidade superiores a D-PCR, parecendo não ser afectado por resultados negativos falsos. D-IIF possui um desempenho inferior. Assim, sendo menos oneroso, moroso e menos exigente em termos de qualificação dos operadores, a escolha recairá sobre o ensaio serológico de aglutinação em lâmina.

O bioensaio possui uma fidedignidade absoluta, pelo que parece poder substituir o ensaio de patogenicidade na determinação da virulência de *R. solanacearum* como agente causal da doença.

Tabela 2.6 - Fidedignidade de diferentes métodos de diagnóstico na detecção de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro utilizando o isolamento em meio gelosado modificado SMSA como 'gold standard' (%).

| | AGL | D-IIF | D-PCR | BIO |
|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| Positivos V | 29,3 (27)* | 44,7 (17) | 32,0 (24) | 36,0 (27) |
| Positivos F | 1,1 (1) | 2,6 (1) | 0,0 (0) | 0,0 (0) |
| Negativos V | 69,6 (64) | 50,0 (19) | 66,7 (50) | 64,0 (48) |
| Negativos F | 0,0 (0) | 2,6 (1) | 1,3 (1) | 0,0 (0) |
| SENS | 100,0 | 94,4 | 96,0 | 100,0 |
| ESP | 98,5 | 95,0 | 100,0 | 100,0 |
| VPP | 96,4 | 94,4 | 100,0 | 100,0 |
| VPN | 100,0 | 95,0 | 98,0 | 100,0 |

AGL - Aglutinação em lâmina; D-IIF - Imunofluorescência indirecta sem enriquecimento; D-PCR - Reacção em cadeia da polimerase sem enriquecimento; BIO - Bioensaio; * - Os valores assinalados entre parêntesis referem-se ao número de casos em cada categoria.

Plantas espontâneas

A análise de várias centenas de plantas espontâneas permitiu obter diagnósticos positivos, comprovados pelo isolamento da bactéria a partir de lesões vasculares, para as espécies *Capsella rubella*, *Chenopodium album*, *Datura stramonium*, *Polygonum arenastrum*, *Portulaca oleracea*, *Senecio vulgaris*, *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *S. sublobatum* e *Urtica urens* (Cruz et al., 2001).

O estudo efectuado em plantas de *S. dulcamara* com necrose dos feixes vasculares ao nível do colo, em que se procedeu ao corte transversal dos caules sarmentosos de quatro plantas a cada 10 cm ao longo das guias, permitiu verificar que o sucesso dos ensaios laboratoriais poderá depender do local da planta onde se procede ao isolamento, bem como do grau de desenvolvimento que a planta detém (Tabela 2.7).

Outros aspectos condicionantes serão, sem dúvida, o estado vegetativo da planta, a estação do ano e o facto de as raízes da planta se encontrarem ou não submersas. Este último aspecto foi confirmado em Inglaterra por Elphinstone *et al.* (1998), onde só foi possível isolar *R. solanacearum* a partir de plantas cujas raízes se encontram imersas em água.

Tabela 2.7 – Resultados de alguns ensaios laboratoriais efectuados, relativamente à localização de *Ralstonia solanacearum*, em plantas de *Solanum dulcamara* com necrose dos feixes vasculares.

| Local | Distância (cm) | AGL | ISOL | E-PCR |
|-------|----------------|-----|------|-------|
| Raiz | 0 | + | - | - |
| a | 10 | - | - | + |
| b | 20 | - | + | - |
| c | 30 | - | - | - |
| d | 40 | - | - | - |
| e | 50 | - | - | - |
| f | 60 | - | - | - |
| g | 70 | - | - | - |

No que diz respeito às plantas espontâneas, parece não advir qualquer vantagem em proceder a realização de E-PCR uma vez que, quer o seu valor individual, quer aditivo, não interfere nos resultados do rastreio e do diagnóstico final (Tabela 2.8). Por outro lado, dado o interesse em identificar, neste caso particular, hospedeiros alternativos para *R. solanacearum*, procedeu-se sistematicamente ao isolamento em SPA e SMSA modificado. Deste modo, foi possível, em muitos casos, obter isolados de *R. solanacearum* após 48 horas de incubação das placas, que foram depois sujeitos a confirmação da sua identidade. Por este motivo e dado o elevado custo logístico, não se procedeu ao bioensaio mas apenas a ensaios de patogenicidade.

Tabela 2.8 – Fidedignidade dos métodos de aglutinação em lâmina (AGL) e PCR após enriquecimento (E-PCR) na detecção de *Ralstonia solanacearum* em plantas espontâneas, utilizando o isolamento em meio gelosado modificado SMSA como 'gold standard' (%).

| | AGL | E-PCR | AGL + E-PCR |
|-------------|------------|------------|-------------|
| Positivos V | 6,3 (19)* | 5,9 (15) | 6,1 (34) |
| Positivos F | 8,9 (27) | 8,7 (22) | 8,8 (49) |
| Negativos V | 83,8 (253) | 82,7 (210) | 83,3 (463) |
| Negativos F | 1 (3) | 2,8 (7) | 1,8 (10) |
| SENS | 86,4 | 68,2 | 77,3 |
| ESP | 90,4 | 90,5 | 90,4 |
| VPP | 41,3 | 40,5 | 41,0 |
| VPN | 98,8 | 96,8 | 97,9 |

* - Os valores assinalados entre parêntesis referem-se ao número de casos em cada categoria.

Também a utilização de D-IIF foi dispensada, uma vez que a maior parte das plantas a analisar não era hospedeira conhecida e apresentava apenas infecções latentes. A variante pós enriquecimento conduziria a um resultado apenas indicativo passadas 48 horas, pelo que se optou pela sua substituição recorrendo ao isolamento em SPA.

A aglutinação em lâmina de extractos obtidos por maceração de secções das plantas, na maior parte dos casos com infecções latentes, produziu valores de sensibilidade, especificidade e de valores preditivos negativos elevados. No entanto, os valores preditivos positivos foram reduzidos. Aparentemente, os resultados produzidos pelo método de aglutinação em lâmina foram de qualidade ligeiramente superior à E-PCR, dispensando o período de incubação de 48 horas. Tal como já referido, revela-se dispensável a realização de ambos os ensaios.

Além das espécies de plantas já referidas, constatou-se a existência de outras espécies espontâneas como potenciais hospedeiras. Estão neste grupo *Amaranthus retroflexus*, *Apium nodiflorum*, *Cyperus rotundus*, *Cyperus longus*, *Digitaria sanguinalis*, *Heliotropium europaeum*, *Lathyrus annus*, *Polygonum persicaria*, *Scanix* sp., *Tribulus terrestris* e *Typha* sp.. Apesar de estas espécies apresentarem resultados positivos em pelo menos um ensaio laboratorial de rastreio (aglutinação em lâmina e/ou E-PCR), não foi contudo possível proceder à confirmação destes resultados através do isolamento de *R. solanacearum*. Estes resultados poderão decorrer dos baixos níveis populacionais de *R. solanacearum* naqueles hospedeiros ou, pelo facto de não se tratar de hospedeiros primários (*Solanaceae* spp.), de as células bacterianas se encontrarem num estado VBNC, que lhes permitiria sobreviver até ao ciclo cultural seguinte, ou até se encontrarem presentes condições climáticas mais favoráveis.

2.4.2.2 | Amostras ambientais

Águas superficiais

O registo da temperatura das águas superficiais na colheita permitiu verificar que, para a totalidade das colheitas efectuadas entre 1999 e 2006, as amostras possuíam temperaturas entre os 12 e os 29°C. A detecção e identificação de *R. solanacearum*, com a confirmação das características dos isolados obtidos, verificou-se para temperaturas superiores a 13°C. Agrupando os dados em três classes de temperatura das águas superficiais (<15°C; ≥15 e ≤20°C; >20°C), verifica-se que existe uma associação altamente significativa entre os intervalos das temperaturas das águas superficiais e os resultados dos ensaios laboratoriais ($\chi^2 = 23,310$; $p=0,0000087$). Parece, assim, mais fácil detectar e identificar *R. solanacearum* para temperaturas mais amenas (15 a 20°C).

Entre os meses de Março e Novembro, os valores médios das temperaturas parecem encontrar-se sistematicamente acima dos 13°C (Figura 2.4), revelando assim a possibilidade

de se obterem resultados positivos para os ensaios laboratoriais.

Utilizando o conjunto de métodos de diagnóstico acima referidos, essa detecção não é possível entre Dezembro e Fevereiro, tornando-se clara a necessidade de intensificar as análises laboratoriais entre os meses de Março e Novembro.

Um estudo efectuado em Espanha por Caruso *et al.* (2005) confirmou também a existência de uma correlação entre a capacidade de isolar *R. solanacearum* em meio sólido e a temperatura das águas superficiais, tornando-se impossível o seu isolamento para temperaturas inferiores a 14°C. Conclusões semelhantes tinham já sido retiradas no Reino Unido (Elphinstone *et al.*, 1998) e Holanda (Janse *et al.*, 1998; Janse & Schans, 1998).

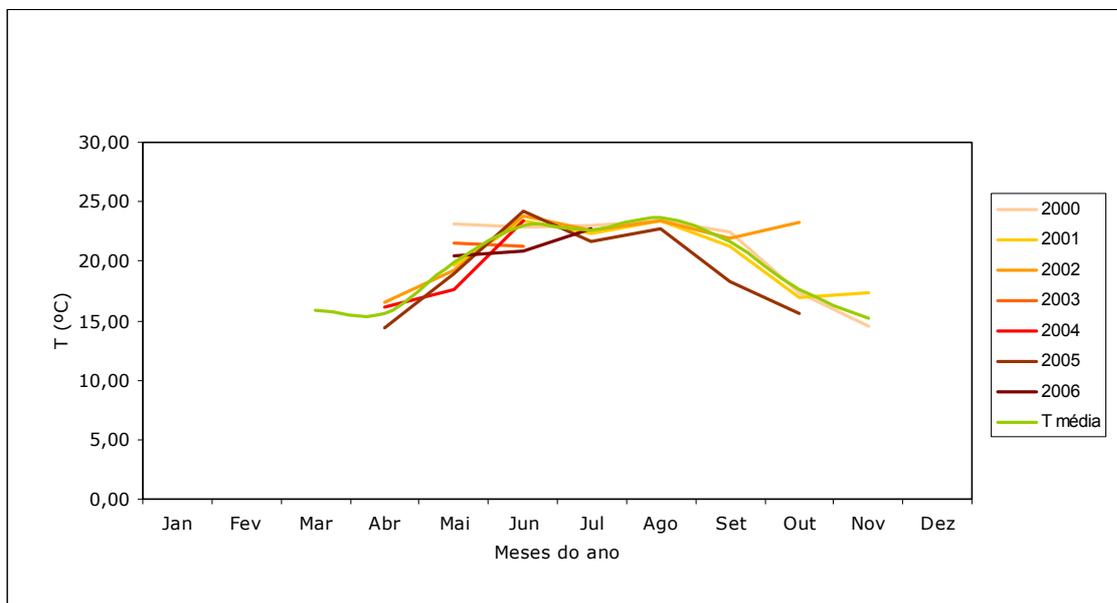


Figura 2.4 – Representação gráfica da temperatura média das águas superficiais ao longo do ano, e da temperatura média anual para o período de 2000 a 2006.

É notório que a sensibilidade obtida pelos métodos de rastreio E-PCR e E-IIF fica aquém da desejada na análise de águas superficiais (Tabela 2.9).

A utilização de um passo intermédio de enriquecimento dos sedimentos parece não ser suficiente. Estes resultados poderão resultar, em parte, dos baixos níveis populacionais que este organismo frequentemente detém nesta matriz, donde resulta a possibilidade de detecção de um reduzido número de colónias utilizando uma alíquota de 50µL de suspensão no método de diluição em placas (10^2 a 10^3 ufc.L⁻¹), mas não nos 5 ou 20 µL utilizados em E-PCR e E-IIF, respectivamente. Por outro lado, e no que diz respeito a E-IIF, a constituição dos sedimentos, onde se inclui uma enorme variedade de outros organismos (protozoários e bactérias), originam uma fluorescência incaracterística e podem sobrepor-se, nas lâminas, às células de *R. solanacearum*, explicando, também, o reduzido contributo que este método possui para determinação dos casos positivos (14,6%).

Tabela 2.9 – Fidedignidade dos diferentes métodos de rastreio utilizados na detecção de *Ralstonia solanacearum* em águas superficiais, utilizando o isolamento em meio gelosado modificado SMSA como 'gold standard' (%).

| | AGL | E-PCR | E-IIF | BIO |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|
| Positivos V | 30,3 (149)* | 18,6 (100) | 14,6 (69) | 18,2 (107) |
| Positivos F | 1,4 (7) | 6,1 (33) | 2,5 (12) | 1,4 (8) |
| Negativos V | 67,9 (334) | 67,7 (365) | 74,9 (353) | 70,8 (417) |
| Negativos F | 0,4 (2) | 7,6 (41) | 7,9 (37) | 9,7 (57) |
| SENS | 98,7 | 70,9 | 65,1 | 65,2 |
| ESP | 97,9 | 91,7 | 96,7 | 98,1 |
| VPP | 95,5 | 75,2 | 85,2 | 93,0 |
| VPN | 99,4 | 89,9 | 90,5 | 88,0 |

AGL – Aglutinação em lâmina; E-PCR – Reacção em cadeia da polimerase com enriquecimento; E-IIF – Imunofluorescência indirecta após enriquecimento; BIO – Bioensaio; * - Os valores assinalados entre parêntesis referem-se ao número de casos em cada categoria.

Esta reduzida sensibilidade revela igualmente a necessidade imperiosa de prosseguir para a etapa seguinte do diagnóstico, mesmo no caso em que ambos os resultados são negativos, uma vez que os seus valores preditivos, sobretudo os de positividade, são reduzidos.

Solo

No decurso do ciclo cultural, torna-se aparentemente fácil isolar *R. solanacearum* a partir da rizosfera de plantas hospedeiras apresentando sintomas da doença. No entanto, essa dificuldade aumenta caso a colheita da amostra se faça aleatoriamente em toda a superfície da parcela. Estas observações foram confirmadas através de estudos efectuados em duas parcelas distintas já referidas em 2.3.1.5. Os resultados laboratoriais obtidos pela amostragem de solo de ambas as parcelas, de acordo com a técnica proposta por Pradhanang (1999), revelaram a existência de diferenças significativas relativamente à detecção e identificação de *R. solanacearum* nas duas parcelas ($\chi^2 = 10,000$; $p=0,0016$). É de negligenciar a existência de outros factores que pudessem vir a intervir nos resultados laboratoriais, uma vez que as amostragens foram efectuadas em dias consecutivos, e as respectivas sub-amostras processadas paralelamente no laboratório.

Por outro lado, observa-se que, em certos casos, a doença se concentra em manchas e não prolifera por toda a parcela devido a determinados factores, como sejam a orografia do terreno ou o seu pH. Por isso, resultados laboratoriais negativos não se devem, em muitos casos, à ausência de contaminação por *R. solanacearum*, mas novamente à incapacidade dos meios de diagnóstico para detectar baixas populações deste organismo, associadas a uma flora natural do solo muito rica e a elevados níveis de inibidores.

Os valores de sensibilidade e especificidade observados para E-IIF e E-PCR (Tabela 2.10) não parecem ser particularmente desadequados, contudo, os baixos níveis de resultados positivos resultam do fraco desempenho de SMSA, usado na análise comparativa como método de referência, e que decorre da sua falta de selectividade para a flora presente nesta matriz, a qual compete e inibe o desenvolvimento de *R. solanacearum*.

Os resultados obtidos para E-PCR resultaram da utilização de extracção de DNA por choque térmico, ou seja, não recorrendo métodos de extracção e purificação de DNA mais sofisticados. Existem numerosos trabalhos onde se recorre a diversos procedimentos, com o objectivo de promover a remoção dos ácidos húmicos presentes nesta matriz e principais responsáveis pela inibição do processo de amplificação, os quais não são compatíveis com o processamento rotineiro destas amostras (Tsai & Olson, 1991; Ito *et al.*, 1998). Efectivamente, Miller *et al.* (2002), num estudo comparativo entre o isolamento e PCR, utilizando "primers" dirigidos para 16S rDNA para detecção e identificação de *Burkholderia cepacia* a partir do solo, obtiveram resultados muito divergentes, com maior número casos positivos para PCR. Neste estudo foi, contudo, utilizado DNA purificado e os "primers" utilizados pareciam não possuir a especificidade adequada, amplificando o DNA de outras espécies bacterianas.

Tabela 2.10 - Fidedignidade dos métodos de Imunofluorescência após enriquecimento (E-IIF) e PCR após enriquecimento (E-PCR) na detecção de *Ralstonia solanacearum* no solo, utilizando o isolamento em meio gelosado modificado SMSA como 'gold standard' (%).

| | E-IIF | E-PCR | E-IIF + E-PCR |
|-------------|------------|-----------|---------------|
| Positivos V | 16,4 (12)* | 21,9 (16) | 19,2 (28) |
| Positivos F | 0,0 (0) | 2,7 (2) | 1,4 (2) |
| Negativos V | 83,6 (61) | 74,0 (54) | 78,8 (115) |
| Negativos F | 0,0 (0) | 1,4 (1) | 0,7 (1) |
| SENS | 100,0 | 94,1 | 96,6 |
| ESP | 100,0 | 96,4 | 98,3 |
| VPP | 100,0 | 88,9 | 93,3 |
| VPN | 100,0 | 98,2 | 99,1 |

* - Os valores assinalados entre parêntesis referem-se ao número de casos em cada categoria.

A utilização de novos métodos de diagnóstico visando a detecção das formas cultiváveis e de métodos de detecção directa ou independentes de cultura, para detecção de formas VBNC, permitem agora detectar, de forma mais aproximada, as populações reais e compreender a resposta fisiológica de *R. solanacearum* ao stress a que se encontra sujeita nos solos de latitudes temperadas (Van Elsas *et al.*, 2000). Entre estes novos meios de diagnóstico

molecular nomeiam-se RT-PCR, capaz de monitorizar a transcrição de mRNA produzido em resposta a um stress, ou a aplicação de cDNA-AFLP para comparação de perfis de mRNA de células sujeitas a diferentes condições de stress (Van Elsas *et al.*, 2005b). Outro método molecular, PCR-DGGE, também já se encontra amplamente divulgado em microbiologia ambiental, para estudo de comunidades microbianas do solo, uma vez que sendo um meio de detecção directa tem em conta uma fracção importante do microbiota do solo não cultivável *in vitro* (Gelsomino *et al.*, 1999). Embora muito fiáveis, estas estratégias ainda não se encontram em fase de fácil aplicação à rotina laboratorial.

Resíduos de indústrias de processamento de produtos de solanáceas

Os resíduos provenientes das instalações de transformação industrial e embalagem de tomate e de tubérculos de batateira possuem natureza muito variada, mas têm em comum o facto de possuírem uma flora bacteriana muito rica, ou seja, a quantidade e variedade dos saprófitas presentes é elevadíssima, dificultando muito o isolamento da bactéria no meio nutritivo semi-selectivo SMSA. Efectivamente, este meio não possui uma selectividade adequada ao controlo dos contaminantes presentes nestas matrizes, os quais proliferam de tal modo que podem impedir o crescimento de *R. solanacearum*.

A análise da Tabela 2.11 mostra níveis de sensibilidade relativamente baixos e valores preditivos para a positividade muito reduzidos, revelando a falta de fiabilidade destes métodos de rastreio para amostras de resíduos destas indústrias.

Tabela 2.11 - Fidedignidade dos métodos de Imunofluorescência após enriquecimento (E-IIF) e PCR após enriquecimento (E-PCR) na detecção de *Ralstonia solanacearum* em resíduos de indústrias, utilizando o isolamento em meio gelosado modificado SMSA como 'gold standard' (%).

| | E-IIF | E-PCR | E-IIF+E-PCR |
|-------------|-----------|-----------|-------------|
| Positivos V | 4,5 (4)* | 4,3 (4) | 4,4 (8) |
| Positivos F | 5,7 (5) | 3,3 (3) | 4,4 (8) |
| Negativos V | 88,6 (78) | 91,3 (84) | 90,0 (162) |
| Negativos F | 1,1 (1) | 1,1 (1) | 1,1 (2) |
| SENS | 80,0 | 80,0 | 80,0 |
| ESP | 94,0 | 96,6 | 95,3 |
| VPP | 44,4 | 57,1 | 50,0 |
| VPN | 98,7 | 98,8 | 98,8 |

* - Os valores assinalados entre parêntesis referem-se ao número de casos em cada categoria.

O uso de E-IIF não parece particularmente adequado, dando origem a resultados falsos positivos, uma vez que alguns dos saprófitas presentes possuem determinantes antigénicos comuns a *R. solanacearum*. O mesmo se verifica também nos ensaios de aglutinação em lâmina.

No que diz respeito à realização de bioensaios em plantas de tomateiro susceptíveis, verifica-se que algumas acabam por morrer como resultado de doenças causadas por fungos e, possivelmente, também devido a toxinas produzidas pelos contaminantes existentes nos extractos inoculados.

2.5 | Análise Global

A qualidade dos resultados obtidos na análise laboratorial pode ser particularmente afectada por factores que se situam a montante desta fase, nomeadamente, pelos métodos de amostragem, muitas vezes condicionados por aspectos particulares dos diferentes sistemas de produção agrícola, mas que não cabem no âmbito deste trabalho.

O método de aglutinação em lâmina revelou-se uma excelente ferramenta como método rápido de rastreio de *R. solanacearum* a partir de extractos produzidos por maceração de tecidos vegetais (plantas e tubérculos), tanto no campo como em laboratório. A sua utilização na "identificação" de presumíveis colónias de *R. solanacearum* é igualmente de extrema utilidade, uma vez que o seu aspecto morfológico em meio gelosado pode ser muito variável (de fluidas a iridiscentes) e a selectividade de SMSA se mostra particularmente diminuída, em consequência da flora saprofítica presente em suspensões de amostras ambientais. Como resultado final da sua utilização na fase de rastreio, o número colónias suspeitas a sujeitar à fase de identificação pode ser mais ou menos reduzido, em função da experiência do operador. Por outro lado, é ainda um método pouco exigente em termos de consumíveis e equipamentos necessários, tornando muito versátil a sua aplicação.

Tratando-se de um método que recorre à utilização de um antisoro policlonal, poderá estar sujeito a reacções cruzadas, particularmente nas amostras de origem ambiental, produzindo-se sempre, neste caso, uma aglutinação normalmente lenta e de aspecto atípico (cor e dimensão dos aglutinados). Neste contexto, a sua especificidade poderá mostrar-se ligeiramente reduzida (Figura 2.5).

A análise global dos resultados obtidos para as diferentes matrizes e métodos de diagnóstico reflecte alguma heterogeneidade em termos qualitativos, permitindo verificar a existência de diferenças significativas entre as amostras bióticas e ambientais, no que diz respeito à sensibilidade dos métodos empregues (OR=3,85, IC 95%: 2,12-6,99) (isolamento usado como "gold standard"). Parece assim verificar-se a necessidade de otimizar ainda o desempenho de alguns destes procedimentos e, caso isso não seja possível, tentar implementar alguns dos novos métodos já referidos, promovendo a sua adaptação às

condições de rotina laboratorial.

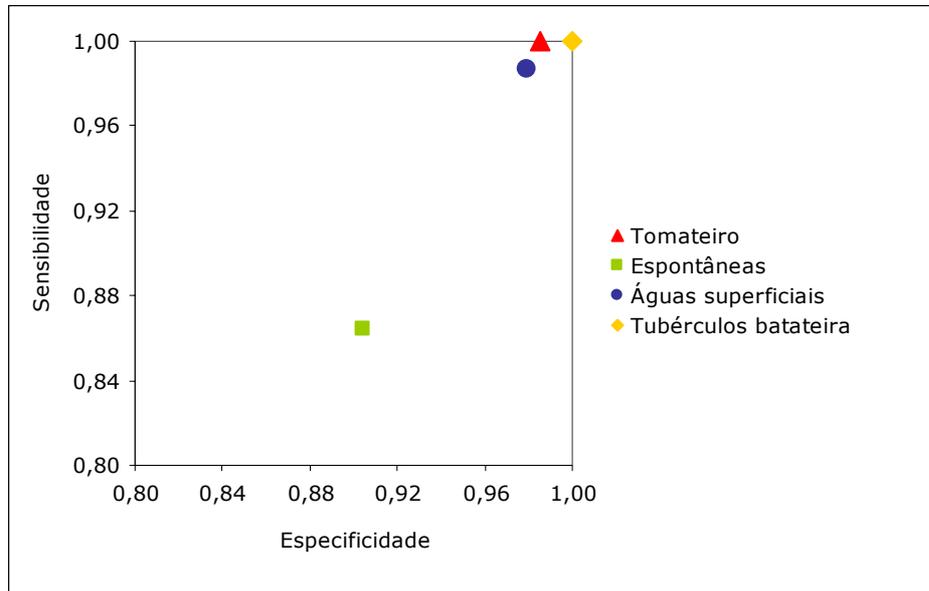


Figura 2.5 – Representação gráfica da sensibilidade e especificidade obtidas no ensaio de aglutinação em lâmina para detecção de *Ralstonia solanacearum* em extractos de plantas (tomateiro e plantas espontâneas) e na “identificação” de presumíveis colónias (águas superficiais e tubérculos de batateira).

Em termos de especificidade, que na generalidade se mostra elevada, parecem não existir diferenças significativas para estes dois tipos de matrizes (OR=1,23, IC 95%: 0,89-1,69).

As Figuras 2.6 e 2.7 sistematizam esta análise através de gráficos, fazendo a comparação do desempenho, em termos de sensibilidade e especificidade, dos vários métodos em função da matriz. Encontram-se igualmente esquematizados os limites desses valores, para um intervalo de confiança de 95%, após correcção do nível de significância (α).

Em amostras bióticas apresentando sintomas característicos de doença, podem ser suprimidos alguns passos, nomeadamente a fase de enriquecimento em meio líquido semi-selectivo, o que poderá encurtar o período de diagnóstico em 48 horas. Também nestas amostras, o diagnóstico poderá ser mais rápido e económico podendo dispensar-se em certos casos, a decidir pelo especialista, o uso de meios semi-selectivos no isolamento, os quais poderão ser substituídos por um meio geral adequado. Contudo, não deverá nunca omitir-se o isolamento e verificação da patogenicidade das colónias obtidas, pelo que no caso de plantas de hospedeiros conhecidos como primários, a utilização exclusiva de métodos clássicos poderia permitir obter um diagnóstico fiável (rastreamento e identificação) em pouco mais de uma semana. O período necessário recorrendo também a métodos biomoleculares seria semelhante ao atrás mencionado.

No que diz respeito aos tubérculos de batateira, a análise comparativa dos diferentes métodos de diagnóstico utilizados parece conferir elevados padrões de qualidade ao

diagnóstico. E-PCR mostra um desempenho menos adequado não apresentando, contudo, resultados significativamente diferentes dos apresentados pelos outros métodos utilizados (OR=0,81, IC 95%: 0,47-1,39).

A análise do desempenho do método de aglutinação em lâmina na detecção de *R. solanacearum* em tomateiro não difere significativamente em sensibilidade ($\chi^2 = 3,922$; $p=0,0477$) e especificidade ($\chi^2 = 4,646$; $p=0,0311$), relativamente aos resultados que produz na análise de extractos de plantas espontâneas. Os resultados, aparentemente mais fidedignos para tomateiro, poderão decorrer da presença mais sistemática de sintomas em plantas deste hospedeiro relativamente à sua presença nas plantas espontâneas.

Existe uma heterogeneidade estatística no que diz respeito à sensibilidade obtida por E-IIF nas amostras de origem ambiental, verificando-se um desempenho menos adequado deste método para detecção de *R. solanacearum* em águas superficiais relativamente ao solo ou aos resíduos das indústrias ($\chi^2 = 6,442$; $p=0,0399$). Já no que diz respeito a E-PCR parece verificar-se uma homogeneidade estatística para este parâmetro ($\chi^2 = 4,311$; $p=0,1158$)

As especificidades de E-IIF e E-PCR são geralmente elevadas e não diferem significativamente para as matrizes ambientais, obtendo-se valores de $\chi^2 = 3,963$ ($p=0,1378$) e $\chi^2 = 3,704$ ($p=0,1569$), respectivamente.

A realização de D-PCR a partir dos extractos obtidos de amostras ambientais, à semelhança do método de aglutinação em lâmina, não possui uma sensibilidade capaz de permitir a detecção de *R. solanacearum* em amostras pouco infestadas, produzindo resultados sistematicamente negativos.

A qualidade dos resultados obtidos nos ensaios de E-PCR e E-IIF mostra-se muito condicionada pela natureza destas amostras. Estes constrangimentos mostram a necessidade de recorrer ao contributo de diferentes métodos de rastreio em amostras ambientais, de forma a reduzir o número de falsos negativos diagnosticado. Mais uma vez se constata a necessidade de recorrer, no caso de E-PCR, a novos processos de extracção e purificação de DNA mais eficientes, seguros e expeditos.

Perante estes dados, a necessidade de se proceder ao isolamento de *R. solanacearum*, por se tratar de um organismo de quarentena, poderá ser posta em causa para algumas matrizes, nomeadamente as ambientais, quando se aplicam métodos de diagnóstico capazes de concluir acerca da viabilidade das células bacterianas de determinada amostra. Tendo em conta que FISH ("Fluorescent in situ hybridization") possui a capacidade de determinar esta característica, seria interessante verificar a sua fidedignidade relativamente às amostras ambientais, nomeadamente solo e resíduos industriais, por comparação com os métodos até agora empregues. Este método permite obter resultados em 24 horas e parece possuir elevada fidedignidade. Não tem, contudo, vindo a ser correntemente utilizado entre nós, por ser de preparação sofisticada, recorrer a reagentes de manipulação perigosa e por se revelar algo dispendioso. A construção das sondas RSOLA e RSOLB a partir das sequências do gene 23S de rRNA confere a este método uma vantagem relativamente a IIF e PCR, que é a

detecção de células viáveis de *R. solanacearum* apresentando as células não viáveis uma fluorescência atípica (Wullings *et al.*, 1998).

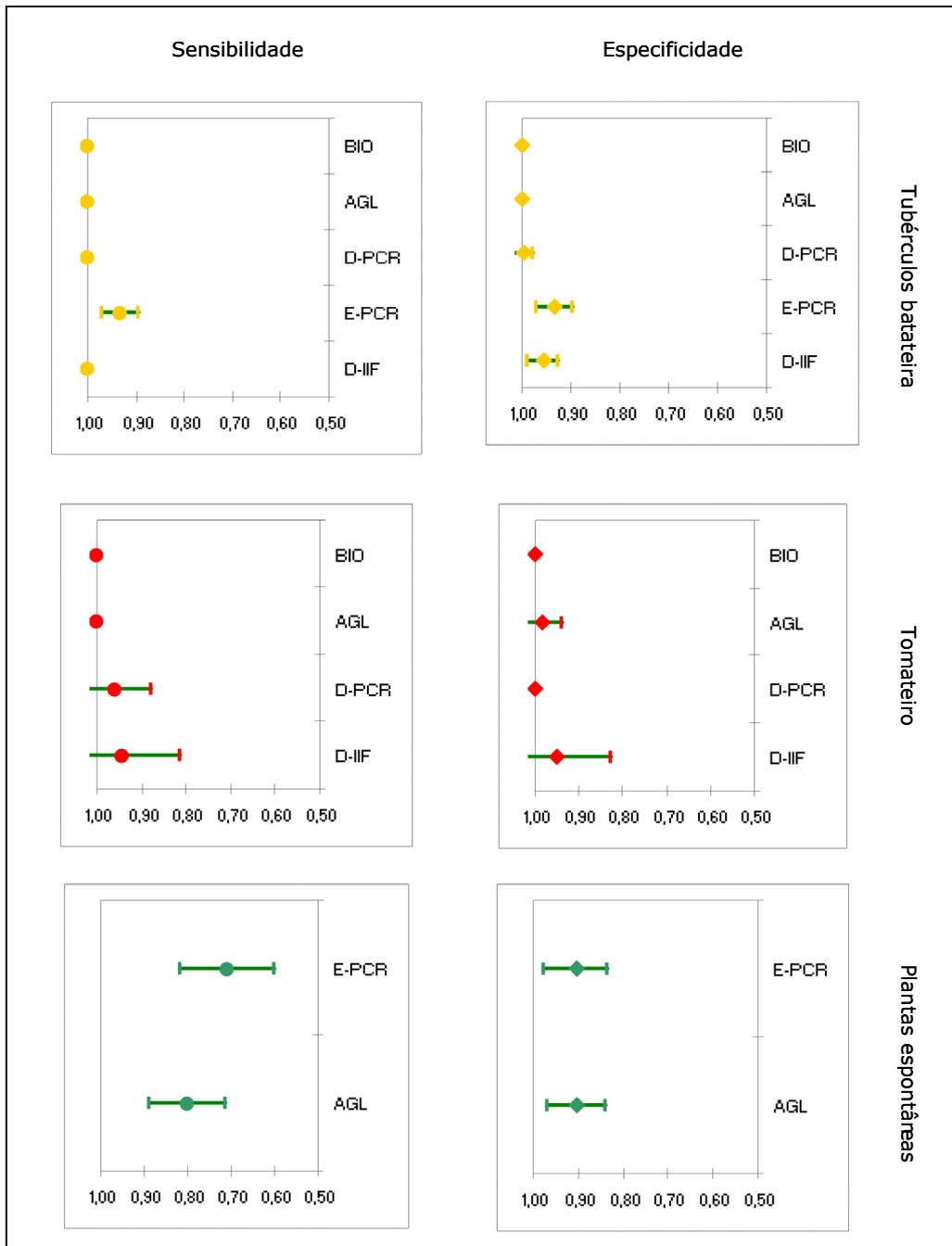


Figura 2. 6 – Resultados comparativos da sensibilidade e especificidade obtidos para os diferentes métodos de rastreio utilizados na detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* em amostras bióticas e limites mínimos e máximos para intervalos de confiança de 95%. (AGL – Aglutinação em lâmina; BIO – Bioensaio; D-IIF – Imunofluorescência indirecta sem enriquecimento; D-PCR – Reacção em cadeia da polimerase sem enriquecimento; E-PCR – Reacção em cadeia da polimerase após enriquecimento).

FISH possui, assim, potencialidades para ser utilizado como método de confirmação do diagnóstico, embora se verifique a necessidade de avaliar a sua sensibilidade e especificidade para amostras e estirpes portuguesas.

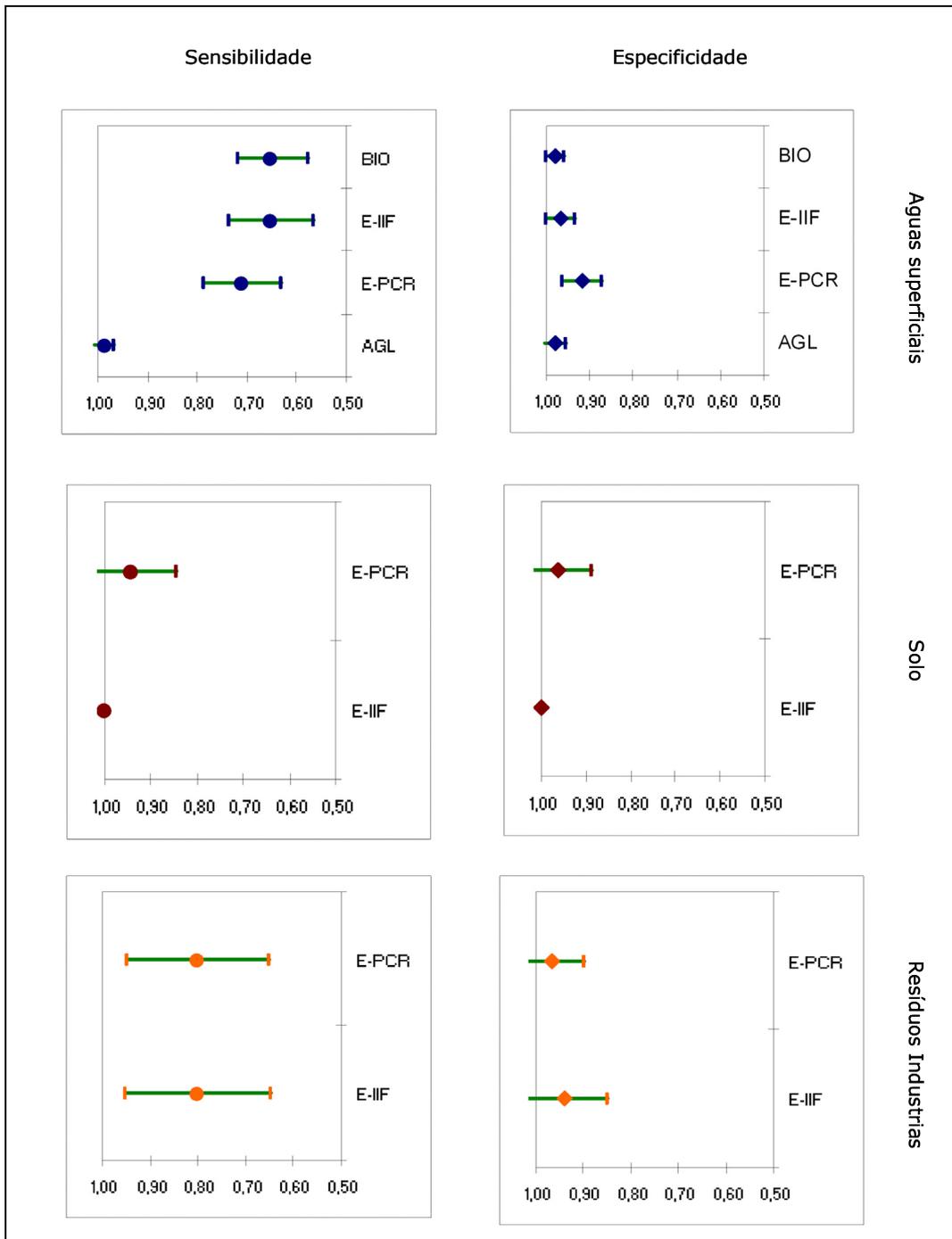


Figura 2. 7 - Resultados comparativos da sensibilidade e especificidade obtidos para os diferentes métodos de rastreio utilizados na detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* em amostras ambientais e limites mínimos e máximos para intervalos de confiança de 95%.(AGL - Aglutinação em lâmina; BIO - Bioensaio; D-IIF - Imunofluorescência indirecta sem enriquecimento; E-PCR - Reacção em cadeia da polimerase após enriquecimento)

Em função das disponibilidades de equipamento, o uso de DGGE (“Denaturing gradient gel electrophoresis”) deveria ser igualmente avaliado.

Outra alternativa, mas no âmbito de uma investigação mais profunda, prende-se com a necessidade de usar novas ferramentas, de modo a recriar um ambiente adequado ao cultivo de *R. solanacearum*, utilizando meios de cultura inovadores (Bull *et al.*, 2000).

A elevada fidedignidade de muitos dos métodos utilizados na fase de rastreio permite que eles sejam também empregues na confirmação da identidade dos isolados obtidos, os quais deverão ser posteriormente sujeitos a prova da sua patogenicidade.

No que diz respeito aos métodos de diagnóstico utilizados na confirmação e/ou caracterização de isolados de *R. solanacearum*, tendo em conta a recente alteração da realidade epidemiológica com a identificação de estirpes do biovar 1 em Portugal continental, será compulsivo proceder à sua utilização para a generalidade das amostras onde foi detectado e identificado este organismo. Neste âmbito, a determinação do biovar, de utilização mais ou menos expedita, deverá ser realizada e, em presença de resultados diferentes dos esperados, convirá recorrer a métodos de ‘fingerprinting’ genómico, que se mostram de execução mais complexa.

Os resultados da análise aqui efectuada permitem realizar algumas alterações nos procedimentos de rotina laboratorial que têm vindo a ser empregues (ver Tabela 2.12 comparativamente à Tabela 2.3). De facto, apesar dos condicionalismos existentes relativamente a algumas matrizes, a experiência adquirida permite verificar que a utilização de determinados métodos não condiciona o resultado final do diagnóstico nem contribui para aumentar o seu rigor.

Tabela 2.12 - Métodos de análise laboratorial a utilizar nas diferentes fases do diagnóstico em função da matriz.

| | Rastreio (extractos) | | | | | Identificação (colónias) | | | | Confirm / Caract. | | |
|--------------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|--------------------------|-----|-----|-----|-------------------|------|-----------|
| | ISOL | AGL | IIF | PCR | BIO | ISOL | AGL | PCR | IIF | PAT | BIOV | DNA FING. |
| Tubérculos | SMSA SPA | * | | XD | X | SPA | X | X | * | X | X | * |
| Plantas solanáceas | SMSA SPA | X | * | XD | X | SPA | X | X | * | X | X | * |
| Espontâneas | SMSA SPA | X | * | | X | SPA | X | X | * | X | X | * |
| Águas superficiais | SMSA | NA | *E | *E | X | SPA | X | X | * | X | X | * |
| Solos | SMSA | NA | *E | *E | X | SPA | X | X | * | X | X | * |
| Resíduos | SMSA | NA | *E | *D | X | SPA | X | X | * | X | X | * |

ISOL – Isolamento; AGL – Aglutinação em lâmina; BIO – Bioensaio; IIF – Imunofluorescência indirecta; PCR – Reacção em cadeia da polimerase; PAT – Ensaio de patogenicidade; BIOV – Ensaio de determinação do biovar; DNA FING. – Métodos de ‘fingerprinting’ genómico; SMSA – Meio gelosado semiselectivo; SPA – Meio gelosado de sacarose e peptona; X – realizar sempre, D – a partir do extracto, E – após enriquecimento, * - a realizar excepcionalmente, NA – não aplicável.

O processo de enriquecimento mostra-se assim dispensável, não conferindo ganhos significativos de qualidade do diagnóstico. E-IIF e E-PCR podem ser realizados a título excepcional e/ou alternadamente, e a sua utilização poderá ter utilidade, em presença de amostras ambientais com elevados níveis de infestação por *R. solanacearum*, onde produzem resultados positivos após 48 horas. Nestes casos, o seu resultado poderá indiciar a presença de contaminação que só será confirmada 10 dias após o processamento inicial da amostra. A sua aplicação conjunta não revela também quaisquer vantagens em termos de fidedignidade do diagnóstico.

Estes resultados revelam, necessariamente, o imprescindível investimento que tem de ser feito na optimização dos métodos de diagnóstico existentes e, sobretudo, a implementação de novos métodos particularmente dirigidos à detecção e "identificação" de *R. solanacearum* em amostras ambientais, nas quais se poderão vir a incluir também novas matrizes.

Por outro lado, o conceito de que *R. solanacearum* poderá ser considerado um elemento de bioterrorismo levou a que uma atenção muito particular fosse dada aos métodos de detecção e identificação deste organismo e à obtenção de dados de rastreabilidade face à potencial origem de determinados focos de doença. O estudo forense em patologia vegetal tem permitido também averiguar a qualidade dos métodos de diagnóstico existentes e determinar a sua evolução, de modo a dar resposta às suas necessidades (Fletcher *et al.*, 2006).

Por fim, a descoberta cíclica de novos hospedeiros e matrizes para as diferentes estirpes deste complexo de espécies, muitas vezes associados a elevadas perdas económicas (Alfenas, 2006; Janse *et al.*, 2006), tornam imperiosa a necessidade de tornar o diagnóstico um processo dependente da realidade epidemiológica e em constante evolução.

2.6 | Referências Bibliográficas

- Alfenas AC, Mafia RG, Sartório Rc, Binoti DHB; Silva RR, Lau D & Vanetti CA. 2006: *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. **31**:357-366.
- Biosca EG, Caruso P, Bertolini E, Alvarez B, Palomo JL, Gorris MT López MM. 2005. Improved Detection of *Ralstonia solanacearum* in Culturable and VBNC State from Water Samples at Low Temperatures. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- Bliss K, Mansfield JW, Elphinstone J & Thwaites R. 2006. Adaptation of *Ralstonia solanacearum* to temperate conditions. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Boudazin G, Le Roux AC, Josi K, Labarre P & Jouan B. 1999. Design of specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European Isolates. *European Journal of Plant Pathology* **105**:373-380.
- Bull AT, Ward AC & Goodfellow M. 2000. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64**:573-606.
- Calzolari A, Contessi A & Mucciolini G. 1998. Monitoring of *Ralstonia solanacearum* in Egyptian potatoes imported through the Port of Ravenna (Italy). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. **28**:95- 100.
- Caruso P, Gorris MT, Cambra M, Palomo JL, Collar J & López MM. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:3634-3638.
- Caruso P, Palomo JL, Bertolini E, Álvarez B, López MM & Biosca EG. 2005. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: recovery of stressed cells at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:140-148.
- Chandrashekara KN, Jagadish K, Krishnamurthy KB, Rashmi S, Prasannakumar MK, Khan ANA, Ramachandra YL & Vani A. 2006. Development of SSR markers for differentiation of *Ralstonia solanacearum* isolates. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Chitarra LG, Langerak CJ, Bergervoet JHW & Van den Bulk RW. 2002. Detection of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in seed extracts of *Brassica* sp. Applying fluorescent antibodies and flow cytometry. *Cytometry*. **47**:118-126.
- Coelho-Netto RA, Pereira BG, Noda H & Boher B. 2003. Caracterização de Isolados de *Ralstonia solanacearum* Obtidos de Tomateiros em Várzea e em terra Firme, no Estado do Amazonas. *Fitopatologia Brasileira*. **28**:362-366.
- Comunidade Económica Europeia. 1987. Scheme for the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission of the European Communities, Luxembourg, Report EUR 11288.
- Cruz L. 1996. *Técnicas Clássicas e Biomoleculares na Diagnose da Pinta Negra do Tomateiro Causada por Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 139 pp..
- Cruz L, Sousa-Santos M, Costa A. & Carrinho H. 2001. Present Status of *Ralstonia solanacearum* in Portugal. In: *Proceedings of the 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, Évora, Portugal. p. 252-254.
- Danial J, McHugh RC & Saddler GS. 2006. Molecular characterisation of the potato brown rot pathogen *Ralstonia solanacearum* race 3/biovar 2A. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- De Guenin MC. 1998. Management and monitoring of *Ralstonia solanacearum* in France. *EPPO Bulletin*. **28**:109-112.
- Denny TP, Cowart T & Morrison C. 2006. Genetic basis of the *Ralstonia solanacearum* biovar assay. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Elphinstone JG. 2005. The Current Bacterial Wilt Situation: A Global Overview. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..

- Elphinstone, JG, Hennessy J, Wilson J K. & Stead DE. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **26**: 663-678.
- Elphinstone JG, Stanford HM & Stead DE. 1998. Survival and transmission of *Ralstonia solanacearum* in aquatic plants of *Solanum dulcamara* and associated surface water in England. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **28**:93-94.
- Elphinstone JG, Stead DE, Caffier D, Janse JD, Lopez MM, Mazzucchi U, Müller P, Persson P, Rauscher E, Schiessendoppler E, Sousa Santos M, Stefani E, van Vaerenbergh J. 2000. Standardization of methods for detection of *Ralstonia solanacearum* in potato. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**:391-395.
- EPPO/OEPP. 1990. Quarantine procedures. Nº26 – *Pseudomonas solanacearum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. **20**:255-262.
- Expert JM, Noublanche F, Poliakoff F & Caffier D. 2000. Evaluation of magnetic capture for the detection of *Ralstonia solanacearum* in various substrates. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. **30**:385-389.
- Fegan M & Prior P. 2005. How Complex is the “*Ralstonia solanacearum* Species Complex”? In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- Fegan M & Prior P. 2006. Sub-specific characterisation and development of molecular diagnostic tests for members of the *R. solanacearum* species complex. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Fletcher J, Bender C, Budowle B, Cobb WT, Gold SE, Ishimaru CA, Luster D, Melcher U, Murch R, Scherm H, Seem R, Sherwood JR, Sobral BW & Tolin SA. 2006. Plant Pathogen Forensics: Capabilities, Needs, and Recommendations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **70**:450-471.
- Fouché-Weich J, Poussier S, Trigalet-Demery D, Berger D & Coutinho T. 2006. Molecular identification of some African strains of *Ralstonia solanacearum* from eucalypt and potato. *Journal of Plant Pathology*. **72**:369-373.
- Gachon C, Annaïck M & Bénédicte C. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*. **55**:1445-1454.
- Gardner MJ & Altman DG. 1989. *Statistics with confidence*. British Medical Journal Publications. Londres, Inglaterra.
- Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G & van Elsas JD. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. **38**:1-15.
- Glick DL, Coffey CM & Sulzinski MA. 2002. Simultaneous PCR detection of the two major bacterial pathogens of geranium. *Journal of Phytopathology*. **150**:54-59.
- Gouriet F, Fenollar F, Patrice JY, Drancourt M & Raoult D. 2005. Use of Shell-Vial Cell Culture Assay for Isolation of Bacteria from Clinical Specimens: 13 Years of Experience. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**:4993-5002
- Griep RA, van Twisk C, van Beckhoven JRCM, van der Wolf J & Schots A. 1998. Development of Specific Recombinant Monoclonal Antibodies Against the Lypopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* Race 3. *Phytopathology* **88**:795-803.
- Grousset F, Roy AS & Smith IM. 1998. Situation of *Ralstonia solanacearum* in the EPPO region in 1997. *EPPO Bulletin*. **28**:53-64.
- Guidot A, Prior P, Schoenfeld J, Carrère S, Genin S & Boucher C. 2007. Genomic Structure of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Inferred from Gene Distribution Analysis. *Journal of Bacteriology*. **189**:377-387.
- Hayward AC. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*. **27**: 265-277.
- Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **29**:65-87.
- Ito S, Ushijima Y, Fujih T, Tanaka S, Kameya-Iwaki M, Yoshiwara S & Kishi F. 1998. Detection of Viable Cells of *Ralstonia solanacearum* in Soil Using a Semiselective Medium and a PCR Technique. *Journal of Phytopathology*. **146**:379-384.
- Janse JD. 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **18**:343-351.
- Janse JD. 1996. Potato brown rot in Western Europe – history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **26**:679-695.

- Janse JD & Schans J. 1998. Experiences with the diagnosis and epidemiology of bacterial brown rot (*Ralstonia solanacearum*) in the Netherlands. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **28**:65-67.
- Janse JD, Araluppan FAX, Schans J, Wenneker M & Westerhuis W. 1998. In: Prior P, Allen C Elphinstone J (eds). *Bacterial wilt disease. Molecular and Ecological Aspects*. Springer-Verlag. Heidelberg, Germany. p. 146-152.
- Janse JD, Goossens E, van Beuningen AE, Gaisch K & Tjou Tam Sin NNA. 2006. *Begonia elatior*, a new host for *Ralstonia solanacearum* race 1, biovar 1. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Kang Y, Saile E, Schell MA & Denny TP. 1998. Quantitative Immunofluorescence of Regulated *eps* Gene Expression in Single Cells of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**:2356-2362.
- Lee Y-A & Wang C-C. 2000. The design off specific primers for the detection of *Ralstonia solanacearum* in soil samples by polymerase chain reaction. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **41**:121-128.
- Lee Y-A, Fan S-S, Chiu L-Y & Hsia K-C. 2001. Isolation off an Insertion Sequence from *Ralstonia solanacearum* Race 1 and its Potential Use for Strain Characterization and Detection. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**:3943-3950.
- Lelliott RA. & Stead DE. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell Scientific Publicatons Ltd., Oxford, 216pp.
- Linfield, C. A., Kenny, S. R., and Lyons, N. F. 1995. A serological test for detecting *Botrytis allii*, the causal agent of neck rot of onion bulbs. *Ann. Appl. Biol.* **126**:259-268.
- Lyons N, Cruz L & Sousa-Santos M. 1999. A rapid screening test for *Ralstonia solanacearum*, the causative organism of bacterial wilt. In: *2º Workshop – Biotecnologia de Plantas*. Praxis XXI. Universidade do Algarve, Faro, Portugal.
- Lyons N, Cruz L & Sousa-Santos M. 2001. Rapid field detection of *Ralstonia solanacearum* in infected tomato and potato plants using *Staphylococcus aureus* slide agglutination test. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**:91-93.
- Lyons NF & Taylor JD. 1990. Serological detection and identification of bacteria from plants by conjugated *Staphylococcus aureus* slide agglutination test. *Plant Pathology*. **39**:584-590.
- McMenamin JD, Zacccone TM & Coenye T. 2000. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US Cystic Fibrosis Treatment Centers. *Clinical investigations*. **6**:1661-1665.
- Miller MB & Gilligan PH. 2003. Laboratory Aspects of Management of Chronic Pulmonary Infections in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**:4009-4015.
- Miller SCM, Lipuma JL & Parke JL. 2002. Culture-Based and Non-Growth-Dependent Detection of the *Burkholderia cepacia* Complex in Soil Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**:3750-3758.
- Nair B, Stapp J, Bugni L, Van Daltsen J & Burns J. 2002. Utility of Gram Staining for Evaluation of the quality of Cystic Fibrosis Spuntum Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**:2791-2794.
- Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N.Timmis. (1997). A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* **5**:19-33.
- Pastrik KH & Maiss E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathol.* **148**:619-626.
- Pastrik KH, Elphisntone JG & Pukall R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification off 16-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology*. **108**: 831-842.
- Persson P. 1998. Successfu eradication of *Ralstonia solanacearum* from Sweden. *EPPO Bulletin*. **28**:113-120.
- Poussier S & Luisetti J. 2000. Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by Nested-PCR-RFLP. *European Journal of Plant Pathology*. **106**:255-265.
- Poussier S, Chéron JJ, Couteau A & Luisetti J. 2005. Methods to ensure de detection by PCR of *Ralstonia solanacearum* in Environment Using DNA Capture and a Commercial DNA Extraction mini Kit. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- Pradhanang PM, Elphinstone JG & Fox RTV. 2000. Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. *Plant Pathology*. **49**:403-413.

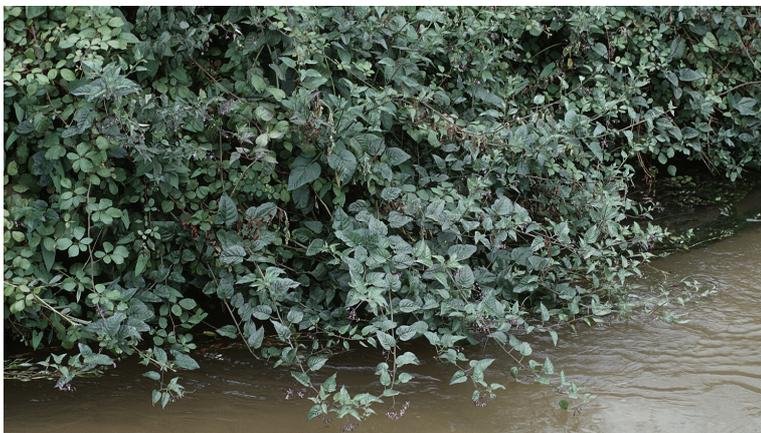
- Pradhanang PM. 1999. Optimization of sampling method for accurate detection of *Ralstonia solanacearum* in naturally infected soil. *Bacterial Wilt Newsletter* **16**:2-5.
- Rajeshwari N, Shylaja MD, Krishnappa M, Shetty HS, Mortensen CN & Mathur SB. 1998. Development of ELISA for the detection of *Ralstonia solanacearum* in tomato: its application in seed health testing. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **14**:697-704.
- Raoult D, Casalta JP, Richet H, Khan M, Bernit E, Rovey C, Branger S, Gouriet F, Imbert G, Bothello E, Collart F & Habib G. 2005. Contribution of Systematic Serological Testing in Diagnosis of Infective Endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**:5238-5242.
- Robinson-Smith A, Jones P, Elphinstone JG & Forde SMD. 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology*. **7**: 67-79.
- Schans J & Steeghs MHCG. 1998. Strategy and results off eradication of brown rot in The Netherlands. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. **28**:121-133.
- Schönfeld J, Heuer H, van Elsas JD & Smalla K. 2003. Specific and Sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Soil on the Basis of PCR Amplification of *fliC* Fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**:7248-7256.
- Seal SE, Jackson LA, Young JPW & Daniels MJ. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii*, and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology*. **139**:1587-1594.
- Seal SE, Taghavi M, Fegan N, Hayward AC & Fegan M. 1999. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. *Plant Pathology*. **48**:115-120.
- Sousa Santos M, Cruz L & Lyons N. 1999. Avaliação da técnica PCR para detecção de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batateira. 2º *Workshop Biotecnologia de plantas*. Livro de Resumos. Universidade do Algarve, Faro. Portugal.
- Stefani E, Giosuè S & Mazzucchi U. 2005. Detection of Latent Infections of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, Race 3 in Tomato Crops. *Journal of Plant Pathology*. **87**: 167-171.
- Tomlinson JA, Boonham N, Hughes KJD, Griffen RL & Barker I. 2005. On-site DNA extraction and Real-Time PCR for Detection of *Phytophthora ramorum* in the Field. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**:6702-6710.
- Tsai Y & Olson LBH. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**:1070-1074.
- Turco P, Sacardi A, Piazzi E, Martini G, Melegatti A, Xodo E & Gambin E. 1998. Monitoring of *Ralstonia solanacearum* in the Veneto Region (Italy). *EPPO Bulletin*. **28**:85-92.
- União Europeia. 1998. Directiva 98/57/CE do Conselho de 20 de Julho de 1998 relativa ao controlo de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. *Jornal Oficial da União Europeia* L 235 de 21/08/1998, 1 - 39.
- União Europeia. 2000. Directiva 2000/29/EC do Conselho de 8 de Maio de 2000 relativa às medidas de protecção contra a introdução na Comunidade de organismos prejudiciais aos vegetais e produtos vegetais e contra a sua propagação no interior da Comunidade. *Jornal Oficial da União Europeia* L 169 de 10/07/2000, 112pp..
- União Europeia. 2006. Directiva 2006/63/CE da Comissão de 14 de Julho de 2006 que altera os anexos II a VII da Directiva 98/57/CE do Conselho relativa ao controlo de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. *Jornal Oficial da União Europeia* L 206 de 27/07/2006, 36-106.
- Van der Wolf JM, Bentsink L, Van Beckhoven JRCM & Leone GOM. 1998. NASBA amplification for Detection of *Ralstonia solanacearum*. *Mass Scale Diagnosis of Plant Pathogens by Nucleic Acids Amplification Methodologies*. COST 823. Livro de Resumos. Universidade do Algarve, Faro, Portugal.
- Van der Wolf JM, Sledz V, van Elsas JD, van Overbeek L & Bergervoet JHW. 2005b. Flow Cytometry to Detect *Ralstonia solanacearum* and to Assess Viability. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- Van der Wolf JM, Van Bekkum PJ, Van Elsas JD, Nijhus Eh, Vriend SGC & Ruissen MA. 1998a. Immunofluorescence colony staining and selective enrichment in liquid medium for studying the population dynamics of *Ralstonia solanacearum* (race 3) in soil. *EPPO Bulletin*. **28**:71-79.
- Van Elsas JD, van Overbeek LS & Trigalet A. 2005a. The Viable but Non-culturable State in *Ralstonia solanacearum*: Is There a Realistic Threat to Our Strategic Concepts? In: Allen C, Prior P &

- Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- Van Elsas JD, van Overbeek LS, Bailey MJ, Schönfeld J & Smalla K. 2005b. Fate of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 as Affected by Conditions and Soil Treatments in Temperate Zone Climates. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- Van Elsas JD; Kastelein P, van Bekkum P, van der Wolf JM, de Vries PM & van Overbeek LS. 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and in microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology* **90**:1358-1366.
- Van Pelt C, Verduin CN, Goessens WHF, Vos MC, Tummler B, Segonds C, Reubsat F, Verbrugh H & van Belkum H. 1999. Identification of *Burkholderia* spp. in the Clinical Microbiology Laboratory: Comparison of Conventional and Molecular Methods. *Journal Of Clinical Microbiology*. **39**:2158-2164
- Villa J, Tsuchiya K, Horita M, Natural M, Opina N & Hyakumachi M. 2003. DNA analysis of *Ralstonia solanacearum* and related bacteria based on 282-bp PCR-amplified fragment. *Plant Disease*. **87**:1337-1343.
- Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, Boonham N & Stead DE. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a quantitative Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (Taqman) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**:2853-2858.
- Wullings BA, van Beuningen AR, Janse JD & Akkermans ADL. 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, Which causes Brown Rot of Potato, by Fluorescent In Situ Hybridization with 23 rRNA-Targeted Probes. *Applied an Environmental Microbiology*. **64**:4546-4554.
- Zar JH. 1998. *Biostatistical analysis*. 3rd Edition. Prentice-Hall International Editions. London, United Kingdom. 662 pp..

Capítulo³

Incidência da doença do pus ou mal murcho em Portugal (1999-2006). Factores de risco associados e implicações epidemiológicas.

| | |
|-------|--|
| 3.1 | Epidemiologia conhecida de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2/raça 3 |
| 3.2 | Objectivos |
| 3.3 | Métodos experimentais e de análise de dados |
| 3.3.1 | Identificação de factores de risco |
| 3.3.2 | Análise epidemiológica dos dados |
| 3.3.3 | Determinação da curva de progressão da doença (Estudo de Caso) |
| 3.4 | Análise dos dados experimentais |
| 3.4.1 | Incidência de <i>Ralstonia solanacearum</i> em diversas matrizes |
| 3.4.2 | Explorando o Contributo de Diferentes Factores de Risco. Que Evolução? |
| 3.4.3 | Análise da curva de progressão da doença (Estudo de Caso) |
| 3.5 | Discussão Global |
| 3.6 | Referências Bibliográficas |



3.1 | Epidemiologia conhecida de *Ralstonia solanacearum* biovar 2/raça 3 em climas temperados

Tal como referido anteriormente *R. solanacearum* provoca avultados prejuízos numa vasta variedade de espécies cultivadas à escala mundial. É por isso considerado um organismo de quarentena face à legislação da União Europeia - Directiva da Comissão 2000/29/EC de 8 de Maio e anterior (União Europeia, 2000), o que se traduz na necessidade de se proceder à sua erradicação. Dado este estatuto, já em 1998 tinha sido publicada uma Directiva do Conselho específica (União Europeia, 1998) a qual foi transposta como Lei geral da República para a legislação portuguesa no Decreto-lei nº 494/99 de 18 de Novembro (República Portuguesa, 1999). Posteriormente, e dados os progressos alcançados ao nível da qualidade do diagnóstico, esta legislação foi alterada dando origem a uma nova Directiva da Comissão - 2006/63/CE de 14 de Julho (União Europeia, 2006). Na nota introdutória da transposição ainda vigente, *R. solanacearum* é referida como "um factor de redução da produção da cultura da batateira e do tomateiro, representando um risco para estas culturas não só no nosso país como também em todo o território comunitário".

Kelman (1998), entre outros, refere-se a *R. solanacearum* como o organismo de origem bacteriana afectando maior número de espécies vegetais. Por outro lado, continuamente surgem registos de novos hospedeiros incluindo plantas cultivadas e espontâneas.

Após a introdução em várias áreas dos Estados Unidos da América a partir de propágulos de *Pelargonium* sp. importados da Guatemala, este organismo foi classificado, neste país, como um dos dez organismos fitopatogénicos controlados sob o 'Agricultural Bioterrorism Protection Act' de 2002, sujeito a requisitos de erradicação e medidas de controlo muito exigentes (Huang, 2006). Foi também reintroduzido no Reino Unido, Bélgica, Alemanha e Holanda em plantas de *Pelargonium* sp. originárias do Quénia (Janse *et al.*, 2005). Existem outros relatos anteriores associados à disseminação de *R. solanacearum* em plantas pertencentes a diferentes espécies deste género, na Austrália (Pittman, 1933), Tanganica (Wallace, 1934) e Ilhas Reunião (Hayward, 1964), as quais são apreciadas como plantas ornamentais e geram grandes fluxos económicos entre países e continentes, aumentando também o risco de dispersão do patógeno.

Os factos relatados lançaram também um alerta sobre a sua potencial sobrevivência em plantas ornamentais cultivadas e em plantas espontâneas, até agora desconhecidas, mostrando que *R. solanacearum* poderá possuir uma gama de hospedeiros, mais vasta, incluindo famílias botânicas não identificadas até à data como hospedeiros alternativos aos tradicionais. Por outro lado, o risco de introdução e dispersão poderá ainda ser acrescido uma vez que a caracterização da raça e biovar não é comum quando ocorre uma detecção em novos hospedeiros. Esta informação é, no entanto, preciosa para a adopção de medidas de controlo e erradicação da doença (Huang, 2006). Estudos efectuados por este autor revelaram que *Nicotiana x alata*, *Zinnia elegans*, e *Portulaca grandiflora*, plantadas em solo

artificialmente infestado com *R. solanacearum* biovar 2/raça 3, se mostraram susceptíveis, podendo comportar-se como potenciais hospedeiros em viveiros de plantas ornamentais.

A epidemiologia da doença causada por *R. solanacearum* permanece ainda algo obscura, devido certamente à complexidade deste organismo, e dependerá, sem dúvida, dos condicionalismos edafo-climáticos de determinada região, dos hospedeiros presentes e da raça ou biovar. Em 1994, Sequeira referia que a ecologia era um dos elementos esquecidos na investigação da doença do mal murcho, sendo imperiosa a necessidade de conhecer a sobrevivência de *R. solanacearum*, não só para conhecer a sua biologia, mas sobretudo, para implementar medidas de controlo racionais e eficazes. Desde então verificaram-se alguns progressos, existindo aspectos já bem esclarecidos na sua sobrevivência e dispersão, como por exemplo no que diz respeito ao contributo da mecanização na dispersão do patógeno em determinadas culturas e sistemas de produção agrícolas (Fortnum & Kluepfel, 2005; Breukers *et al.*, 2006). Contudo, existem outros factores cujo contributo se encontra bem menos esclarecido. Entre eles, refere-se a ocorrência deste organismo em sementes, solo e águas, e o papel das infecções latentes em hospedeiros cultivados e plantas espontâneas (Coutinho, 2005). Associa-se ainda a falta de conhecimento sobre o contributo dado pela existência de formas viáveis mas não cultiváveis (VBNC) de *R. solanacearum* (Caruso *et al.*, 2005; van Elsas *et al.*, 2005) na manutenção de formas virulentas deste organismo em condições mais ou menos adversas (águas superficiais no período de Inverno; solos não cultivados e/ou expostos a grandes amplitudes térmicas). Para a existência desta lacuna contribuiu também a falta de métodos de diagnóstico (detecção e identificação) adequados à análise de amostras ambientais, embora nos últimos anos tenha ocorrido uma evolução positiva relativamente à sensibilidade e especificidade dos mesmos (Van Elsas *et al.*, 2005; Messiha, 2006).

A recorrência da doença do pus ou mal murcho da batateira na Europa, na última década do século 20, levou à implementação de medidas severas para controlo e erradicação do seu agente causal, e mostrou a necessidade de se conhecer melhor a epidemiologia da doença em climas temperados. Na persecução destes objectivos, define-se no Artigo 2º da transposição (República Portuguesa, 1999) da Directiva 98/57/EC (União Europeia, 1998) a aplicação de um programa nacional de prospecção de execução anual que incide obrigatoriamente sobre plantas e tubérculos de *Solanum tuberosum* (batateira) e plantas de *Lycopersicon esculentum* (tomateiro). Neste mesmo artigo refere-se que “De acordo com a avaliação do risco de dispersão (...) efectuada no decurso da execução do programa referido, as prospecções podem incidir sobre outras plantas solanáceas para além dos materiais vegetais (...) e infestantes da mesma família, águas superficiais (...), resíduos líquidos de descarga e resíduos sólidos provenientes de instalações de transformação industrial de batata e tomate ou de embalagem de batata, meios de cultura e solo (...)”.

Na Holanda, a implementação de medidas desta natureza aliadas ao controlo de todos os lotes de batata-semente e batata-consumo produzidos levaram a um decréscimo, entre 1995 e 1996, de 90% de casos de mal murcho (Janse *et al.*, 1998).

Em Portugal, a recorrência da doença em 1995, por introdução a partir de material de propagação importado infectado, levou a Direcção-Geral de Protecção das Culturas (DGPC) a criar em 1998 o 'Plano Nacional de Luta Contra *Ralstonia solanacearum*', do qual constava um 'Programa Nacional de Prospecção' em diferentes hospedeiros e substratos e que tinha como objectivos: monitorizar a situação real da doença do pus ou mal murcho e implementar medidas de controlo julgadas convenientes (DGPC, 1998).

3.2 | Objectivos

A situação geográfica de Portugal continental reflecte-se na presença de características climáticas muito próprias impostas pela sua localização no extremo sudoeste da Europa, incrustado entre Espanha, o Oceano Atlântico e o Mar Mediterrâneo. O Clima de Portugal é Mediterrâneo, distinguindo-se pela existência de Verões quentes e secos e pela suavidade dos Invernos, e evidencia 4 estações do ano, típico dos Climas Temperados. A originalidade do Clima Mediterrâneo reside na coincidência temporal entre a estação mais quente e a estação mais seca. No território português, estas características Mediterrâneas variam de intensidade consoante a proximidade ao Oceano Atlântico, regulador do clima por excelência, amenizador de temperaturas e fornecedor da humidade transportada pelos ventos vindos de Oeste. A temperatura e a duração da estação seca aumentam de Norte para Sul e de Oeste para Este, enquanto que a precipitação se concentra nas áreas próximas do litoral, nas terras altas e nas fachadas expostas aos ventos oceânicos. Nas áreas onde a temperatura é mais elevada, a evaporação é também mais elevada, reflectindo-se numa menor disponibilidade de água (<http://www.quercus.pt>). Estas diferenças relativamente aos climas tipicamente temperados são importantes pois traduzem-se em alterações dos sistemas de produção agrícolas, da constituição da flora espontânea, das disponibilidades hídricas dos regadios e das características dos solos no que diz respeito ao armazenamento de água e à presença de matéria orgânica indispensável à manutenção de *R. solanacearum*. Assim sendo, poderão existir diferenças mais ou menos significativas no que diz respeito à incidência da doença do pus ou mal murcho em diferentes matrizes e ao contributo dos vários factores já identificados como responsáveis pela sua manutenção de disseminação, e que interessa estudar, nas condições edafoclimáticas prevaletentes em Portugal Continental.

Os conhecimentos decorrentes dos dados recolhidos no referido 'Programa Nacional de Prospecção', a partir do processamento de amostras bióticas e ambientais recebidas no laboratório de fitobacteriologia da DGPC entre 1999 e 2006, levaram-nos a tentar compreender melhor a bioecologia deste organismo em Portugal, nomeadamente no que diz respeito à incidência da doença e factores de risco associados à sobrevivência e dispersão de *R. solanacearum*.

Os métodos aplicados no diagnóstico destas amostras encontram-se descritos e foram alvo de discussão no Capítulo 2.

3.3 | Métodos experimentais e de análise de dados

3.3.1 | Identificação de factores de risco

3.3.1.1 | Tubérculos de batateira

Neste período foram analisadas, 1463 amostras provenientes de lotes de tubérculos de batateira propostos à certificação ou destinados ao consumo, produzidos em Portugal, bem como de lotes de batata-semente originários da UE (Alemanha, Dinamarca, Escócia, Espanha, França, Holanda, Irlanda do Norte e Luxemburgo) ou importados do Canadá, e de batata-consumo produzidos no exterior, originários da UE (Espanha, França, Holanda), ou importados de Israel e de Marrocos.

3.3.1.2 | Tomateiro e outras plantas solanáceas

No que diz respeito ao tomateiro, em 1999 foram eleitas três regiões onde a produção de tomate para consumo em fresco e indústria adquiria maior preponderância: Alentejo, Beira Litoral e Ribatejo-e-Oeste. Nestas, elegeram-se pontos para colheita de material vegetal destinado a análise laboratorial, tendo-se processado 109 amostras. Também para a cultura do pimenteiro se procedeu de igual forma, embora se tenha recebido para análise um número de amostras muito inferior (10 amostras).

O acompanhamento de campos de cultivo de batateira, onde se tinha anteriormente detectado a presença deste organismo, levou também à análise de 'zorras' (plantas de batateira espontâneas resultantes de pequenos tubérculos que são abandonados no campo no ciclo cultural anterior), sempre que presentes.

Além destas amostras foram ainda analisadas plantas de batateira com sintomas suspeitos de doença do mal murcho.

3.3.1.3 | Águas superficiais

A existência de águas superficiais contaminadas, utilizadas na rega das culturas solanáceas onde se identificou a doença no Verão de 1998, permitiu concluir que estas seriam também um dos factores a contribuir para a disseminação de *R. solanacearum* em importantes áreas

de regadio associadas à cultura da batateira e do tomateiro. Inicialmente consideradas de menor importância na manutenção da doença em Portugal, por se pensar que os materiais de propagação vegetativa, responsáveis pela reintrodução da doença no país, teriam um papel preponderante, verificou-se que a persistência deste organismo em determinadas áreas parece estar, sem dúvida, dependente deste veículo de disseminação. No âmbito do Programa Nacional de Prospecção foram analisadas, entre 1999 e 2006, 661 amostras deste substrato, provenientes dos principais aproveitamentos hidroagrícolas onde o cultivo de espécies solanáceas se encontra implantado.

Em 1999 identificaram-se 17 aproveitamentos hidroagrícolas que foram avaliados, na maior parte dos casos, por um período inicial de 3 anos (1999-2001), relativamente à presença de culturas solanáceas e à existência de águas superficiais contaminadas com *R. solanacearum* (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Frequência relativa (%) de amostras positivas obtida nos aproveitamentos hidroagrícolas monitorizados entre 1999 e 2001.

| Aproveitamentos hidroagrícolas | 1999 | 2000 | 2001 |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Sorraia | 4,00 (2/50)* | 2,04 (1/49) | 0,00 (0/44) |
| Lis | 50,00 (11/22) | 45,16 (14/31) | 50,00 (8/16) |
| Cela | 45,45 (10/22) | 53,33 (8/15) | 92,31 (12/13) |
| Tâmega | 20,00 (1/5) | 80,00 (8/10) | 33,33 (2/6) |
| Idanha | 0,00 (0/3) | 0,00 (0/2) | |
| Caia | 0,00 (0/1) | | |
| Rib. Canha | 33,33 (1/3) | 0,00 (0/6) | 0,00 (0/4) |
| Rib. Muge | | 50 (3/6) | 40 (4/10) |
| Sado | 0,00 (0/21) | 0,00 (0/15) | 0,00 (0/2) |
| Alvalade | 0,00 (0/14) | | |
| Alvor | 0,00 (0/6) | | |
| Arraiolos | 0,00 (0/1) | | |
| Guadiana | 0,00 (0/2) | | |
| Mira | 0,00 (0/7) | 0,00 (0/4) | 0,00 (0/1) |
| Vigia | 0,00 (0/1) | | |
| S. Magos | 0,00 (0/4) | | 0,00 (0/2) |

* - nº amostras positivas/nº total de amostras.

A selecção dos pontos de colheita e o número de amostras colhidas foi função da localização e da importância das áreas das culturas de batateira e de tomateiro para os diversos aproveitamentos, sendo por vezes igualmente influenciada por disponibilidades logísticas.

Os resultados preliminares desta avaliação permitiram identificar os locais com águas superficiais contaminadas e eger, para uma monitorização mais exaustiva a partir de 2002, seis aproveitamentos hidroagrícolas, potenciais áreas de risco onde se utilizavam águas superficiais para rega de culturas solanáceas: Tâmega, Lis, Cela, Sorraia e Ribeiras de Muge e de Canha (Tabela 3.2).

Em 2002 e em 2003, foram introduzidos no esquema de monitorização das águas superficiais os aproveitamentos hidroagrícolas do Baixo Mondego e do Caia, respectivamente, por se ter verificado a existência de culturas solanáceas infectadas com *R. solanacearum* em campos onde se tinham utilizado águas superficiais para rega, passando a oito o total de aproveitamentos hidroagrícolas a monitorizar.

Para cada um destes aproveitamentos hidroagrícolas seleccionaram-se vários pontos, cobrindo áreas de regadio de culturas solanáceas, os quais tinham sido monitorizados, na maior parte dos casos, com cadência mensal nos primeiros dois anos de estudo (1999-2000), sendo depois essa periodicidade alterada em função dos conhecimentos adquiridos e de alguns condicionalismos logísticos e financeiros.

O trabalho desenvolvido nos anos de 1999 e 2000 permitiu também verificar a impossibilidade de isolar a bactéria a partir de águas superficiais contaminadas durante os meses mais frios do ano. Por esse motivo, a partir do ano 2000 foi pedida colaboração aos inspectores fitossanitários, responsáveis pela colheita de amostras de águas superficiais nas várias regiões, no sentido de procederem à medição da temperatura das águas, nos pontos de colheita eleitos, nos diferentes aproveitamentos hidroagrícolas. Assim, nesse ano e em anos posteriores, a colheita de amostras e a análise laboratorial das mesmas concentrou-se especialmente nos meses mais quentes em que a possibilidade de vir a obter resultados falsos negativos no diagnóstico podia ser eliminada com elevado grau de certeza.

3.3.1.4 | Plantas espontâneas

As espécies espontâneas, normalmente mais resistentes a *R. solanacearum* do que as plantas cultivadas, muitas vezes não manifestam sintomas tão evidentes da doença, podendo por isso constituir fontes alternativas de repositório de inóculo no ambiente. Entre 1999 e 2006 foram estudadas, relativamente à presença deste organismo, mais de 250 amostras de plantas espontâneas, constituídas por exemplares únicos ou amostras compostas, de 82 espécies vegetais identificadas pertencentes a 67 géneros botânicos distintos.

Tabela 3.2 – Aproveitamentos hidroagrícolas e respectivos pontos de colheita de águas superficiais monitorizados no período de 1999-2006.

| Aproveitamentos Hidroagrícolas | Ponto de colheita - Concelho | Nº colheitas |
|--------------------------------|---|--------------|
| Tâmega | A. Tâmega-Chaves Frenteira-Chaves V. Verde Raia-Chaves | 27 |
| Lis | Casal Mil Homens (R. Lena) - Batalha Ponte Monterral - Leiria Pousos-Leiria Ponte da Gandara - Leiria Rib. Caranguejeira - Leiria R. Caranguejeira (Olho da Ponte)-Leiria R. Caranguejeira (Azambujo)-Leiria R. Caranguejeira (Campino)-Leiria | 81 |
| Baixo Mondego | Vala do Monte-M. Velho Casal novo do rio-M. Velho Canal de rega-F. Foz Canal de rega-Coimbra | 17 |
| Cela | Nascente - Alcobaça Nascente Juzante -Alcobaça Póvoa montante-Alcobaça Rib. Pereiro-Alcobaça Rio Areia-Alcobaça Rio da Areia - Ponte-Nazaré R. Areia (Viveiro)-Nazaré Rio do Meio-Nazaré R. Alcoa-Nazaré | 67 |
| Sorraia | Pesqueiro Raia A. Furadouro-Mora B. Montargil-Ponte de Sôr B. Maranhão-Avis A. Gameiro-Mora A. Furadouro-Mora P. Benavente-Benavente M. Quinta-Benavente Amieira-Coruche Canejo-Mora Raposeira (Canal Sorraia) | 291 |
| Rib. Canha | Rib. de Canha (montante)-Montijo H. Montinho-Montijo H. Escatelar-Montijo H. Vidigal-Vendas Novas H. Vale de Cebolas-Montijo | 23 |
| Rib. Muge | Açude dos Gagos-Almeirim Herd. Caniçais (Parque Merendas) - Coruche Herd. Caniçais (Açude) - Coruche Parque Merendas - S. Magos Amieira - Coruche | 31 |
| Caia | B. do Caia-Campo Maior Est. Ol. Elvas (Caiola)-Elvas H. Enchadinha-Elvas M. Perdigão-Elvas R. Caia (antes lig. Ceto)-Elvas R. Caia (depois lig. Ceto)-Elvas R. Caiola (Frenteira)-Elvas | 44 |

Entre as espécies espontâneas contam-se algumas amplamente divulgadas como hospedeiros alternativos, como é o caso de *Solanum dulcamara*, planta perene sarmentosa ripícola da família *Solanaceae*, muito comum nos países da Europa com clima temperado, como a Holanda, Bélgica e o Reino Unido. Esta espécie, conhecida como fazendo parte da flora espontânea de Portugal e facilmente identificada através de características morfológicas muito particulares das suas flores (pétalas de cor roxa muito intensa possuindo duas máculas de cor amarela esverdeada na sua base), só foi por nós identificada nos

aproveitamentos hidroagrícolas do rio Lis e de Cela no Verão e Outono de 2000, respectivamente. Foi igualmente observada no perímetro de rega do Caia em 2003 e na Bacia do rio Sorraia em 2004, encontrando-se portanto amplamente dispersa em termos geográficos. Outras plantas espontâneas igualmente identificadas como alternativas aos hospedeiros tradicionais cultivados, fazendo parte da flora espontânea presente em Portugal, são *Datura stramonium* e *Solanum nigrum*, muito comuns nas nossas condições climáticas.

As plantas espontâneas, bem como algumas espécies cultivadas não conhecidas como hospedeiras, estudadas eram provenientes das áreas de influência dos vários aproveitamentos hidroagrícolas monitorizados, tendo-se analisado infestantes provenientes de zonas ripícolas e de áreas cultivadas.

Mais do que a detecção de casos positivos, o estudo em causa teve por fim averiguar a presença e identificar as espécies vegetais espontâneas que se comportam como verdadeiros hospedeiros (Kelman, 1953) alternativos às espécies vegetais susceptíveis, nas condições prevalentes em Portugal, e que reflectissem as características da flora autóctone desses locais.

As plantas espontâneas eram provenientes de solos com culturas solanáceas ou em quarentena, ou ainda, espontâneas rícolas de zonas com águas superficiais contaminadas.

3.3.1.5 | Solos

O contributo dado pelo factor solo nas condições climáticas prevalentes no país foi igualmente estudado em parcelas naturalmente infestadas em pleno ciclo cultural ou em regime de quarentena (um a quatro anos), tendo-se analisado, entre 1999 e 2006, 90 amostras deste substrato. Contudo, a concentração da doença em manchas, no caso de solos não mobilizados, o pH algo desfavorável para a sobrevivência da bactéria que possuem muitos dos solos agrícolas do país, com níveis de acidez próximos de pH 5, e a falta de fidedignidade das técnicas de amostragem (mesmo utilizando técnicas de amostragem dependentes da área da parcela, em locais escolhidos aleatoriamente e com um número de repetições julgado conveniente) e de diagnóstico tornam difícil tirar conclusões sobre o verdadeiro contributo deste factor na manutenção de *R. solanacearum*. Efectivamente, o método de amostragem proposto por Pradhanang (1999) para recuperar *R. solanacearum* a partir deste substrato, já estudado no Capítulo 2, revelou possuir uma reduzida fidedignidade.

Efectuou-se um pequeno ensaio de sobrevivência de *R. solanacearum* em aliquotas de solos provenientes de parcelas infestadas no ano de 1999, com características físico-químicas distintas, determinadas no Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva. Procedeu-se também à detecção da presença de nemátodos dos géneros *Meloidogyne* e *Rothylemchus* (Laboratório de Nematologia da DGPC), responsáveis por lesões radiculares que facilitam a penetração deste organismo nas plantas. Procedeu-se à plantação de três plântulas de

tomateiro de uma variedade muito susceptível em vasos contendo solo (seis vasos por tipo de solo).

Efectuou-se igualmente a monitorização do solo de um campo de tomateiros destinados à indústria, da região de Muge, regado com águas contaminadas procedentes da Ribeira de Muge e onde, no ano 2000, se verificaram prejuízos devastadores com níveis de incidência da doença superiores a 90%. Este campo foi acompanhado durante três anos, tendo-se efectuado cerca de 19 colheitas de amostras de solo as quais foram posteriormente analisadas laboratorialmente.

3.3.1.6 | Unidades de processamento industrial de tubérculos de batateira, tomate e pimento

O papel das unidades de processamento industrial de tubérculos de batateira, tomate e pimento no ciclo biológico de *R. solanacearum*, resulta do processamento ocasional de frutos ou tubérculos infectados/contaminados. Foram analisadas, no período de 1999 a 2006, 108 amostras de resíduos sólidos (retraço, repiso e refugos) e de efluentes líquidos destas indústrias. É consensual a importância que estes resíduos, caso não sejam tratados, possuem na manutenção e dispersão deste organismo, havendo várias referências ao seu contributo na contaminação e posterior estabelecimento de *R. solanacearum* em cursos de água europeus (Elphinstone *et al.*, 2006). Quantificar esse contributo poderá não constituir, contudo, uma tarefa fácil devido ao nível de outros contaminantes, normalmente elevado, presente nestas matrizes.

3.3.2 | Análise epidemiológica dos dados

Os resultados finais do diagnóstico das amostras provenientes do 'Programa Nacional de Prospecção' de *R. solanacearum*, obtidos entre 1999 e 2006, foram registados numa base de dados Excel e transformados em dados binários para posterior tratamento estatístico. Estes dados referem-se à presença ou ausência de infecção/contaminação por *R. solanacearum* nas matrizes supracitadas e, por isso, o estudo da incidência/prevalência e dos factores de risco associados reflecte apenas a sua análise. Poderão existir, contudo, outros factores com alguma importância na epidemiologia deste organismo em Portugal, como por exemplo, o uso de maquinaria agrícola contaminada (Janse *et al.*, 1998), o papel das manipulações culturais (Fortnum & Kluepfel, 2005), ou ainda a influência do aproveitamento de tubérculos com infecções latentes no ciclo cultural seguinte e que ainda ocorre com alguma frequência em agricultura tradicional de subsistência. No entanto, o papel menos relevante que lhes é atribuído na literatura (Breukers *et al.*, 2006) e a dificuldade em tratar de forma objectiva os dados referentes a estes mesmos factores, levou-nos a centrar este estudo naqueles que, reconhecidamente, contribuem para a manutenção e dispersão da doença, de modo a avaliar

a sua influência, nas condições agrícolas e climáticas prevalentes no país (Portugal Continental).

Foram excluídas da análise todas as amostras para as quais não se possuía a totalidade dos dados, nomeadamente, aquelas para as quais não era possível proceder à rastreabilidade no que diz respeito à identificação e localização. Todas as amostras foram introduzidas uma única vez na análise. Para algumas das matrizes associaram-se outros dados de interesse relevante, como por exemplo os valores de registo das temperaturas das águas superficiais colhidas, ou dados respeitantes à localização geográfica das amostras ao nível do Concelho, aproveitamento hidroagrícola ou região, entre outros.

No que diz respeito à análise da incidência de *R. solanacearum* nas diferentes matrizes, calcularam-se as frequências relativas de amostras positivas que foram depois comparadas utilizando intervalos de confiança múltiplos. De forma a garantir a confiança de 95 % ao efectuar as comparações múltiplas, o nível de confiança (α) foi corrigido de acordo com a equação referida em 2.3.3.

Na análise dos diferentes factores de risco, procedeu-se à construção de tabelas de contingência (2X2 e 3X2) as quais foram analisadas através de testes de χ^2 de hipóteses ou de significância para os factores em estudo (Zar, 1998). Sempre que apropriado, calcularam-se as 'odd ratios' (OR) associadas para um intervalo de confiança (IC) de 95% (Gardner & Altman, 1989).

3.3.3 | Determinação da curva de progressão da doença (Estudo de Caso)

Numa parcela de solo, da região de Muge, onde no ano 2000 tinha sido identificada a presença de mal murcho em tomateiro de ar livre, com um nível de incidência da doença superior a 90%, associada à rega com águas superficiais infestadas provenientes da ribeira de Muge, procedeu-se a um pequeno ensaio visando estudar a sobrevivência de *R. solanacearum* num solo infestado e verificar, ao mesmo tempo, o progresso e dispersão da doença em plantas susceptíveis da mesma espécie. Para tal, no Verão de 2001, após a colheita de amostras de solo para avaliação do nível de infestação, delimitaram-se nessa parcela duas faixas de solo, uma das quais, no ano anterior, tinha albergado a cultura do tomateiro (zona A) e outra onde se tinha efectuado uma cultura não hospedeira (zona B). Implantaram-se 1250 plantas de tomateiro de uma variedade susceptível provenientes de viveiro, contendo 3 a 4 folhas verdadeiras, que foram distribuídas pela zona A (750 plantas) e pela zona B (500 plantas).

Após a implantação, o ensaio foi mantido com a ajuda do agricultor no que diz respeito às técnicas culturais usuais, e a rega foi efectuada com água proveniente de um furo, existente naquela exploração agrícola, cuja qualidade foi previamente analisada com vista a atestar a sua isenção relativamente à presença de *R. solanacearum*.

A observação e contagem das plantas doentes, assim como colheitas de amostras para análise laboratorial, de modo a confirmar se os sintomas observados nas plantas eram devidos à doença, foram iniciadas exactamente um mês após instalação do ensaio. Procedeu-se a observações semanais ou com intervalos inferiores de acordo com a progressão dos sintomas. O início da maturação deu-se dois meses após a instalação do ensaio, que foi levantado três meses e meio depois. Dada a progressão dos sintomas, as observações foram suspensas duas semanas após o início da maturação das plantas.

Paralelamente procedeu-se à observação e colheita de plantas espontâneas e de amostras de solo e de águas superficiais para análise laboratorial.

Procedeu-se ao tratamento estatístico dos dados relativos ao nível de incidência da doença ao longo do tempo nas zonas A e B do ensaio, calculando-se a proporção de plantas doentes, as curvas de progressão da doença e as suas taxas de progresso (número de unidades doentes/ dia).

A observação das curvas de progressão da doença para as duas zonas e o cálculo das AUDPC ('area under disease progress curve') foi efectuado de acordo com Campbell & Madden (1990) e permitiu quantificar de modo objectivo a intensidade da doença nas duas zonas da parcela:

$$\text{AUDPC} = \sum [\{Y_i + Y_{(i+1)}/2\} \times (t_{(i+1)} - t_i)]$$

Y = incidência da doença no tempo t

$t_{(i+1)} - t_i$ = intervalo de dias entre observações consecutivas

Procedeu-se à escolha do modelo estatístico que melhor se ajustava à progressão real da doença, tendo-se explorado os modelos monomolecular, de Gompertz e Logístico através de transformações impostas às variáveis em estudo:

| | | |
|---------------|-------------------------------|---|
| Monomolecular | $\text{Ln}(1/(1-Y_t))$ | |
| Gompertz | $-\text{Ln}(-\text{Ln}(Y_t))$ | Y_t – incidência da doença num determinado período de tempo t |
| Logístico | $\text{Ln}(Y_t/(1-Y_t))$ | |

A validação destes modelos foi efectuada, no que diz respeito à sua precisão através do cálculo do coeficiente de determinação (R^2) entre os valores de Y observados e estimados

pelos modelos, bem como do rigor do seu ajustamento, através do cálculo do coeficiente de correcção dos enviesamentos (C_b) e pela concordância da correlação (r_c) conforme descrevem as equações:

| | | |
|------------------------------|--|--|
| $C_b = [(v+1/v+u^2)/2]^{-1}$ | $v = \sigma_{obs}/\sigma_{pred}$ | σ_{obs} - desvio padrão observado |
| | | σ_{pred} - desvio padrão previsto pelo modelo |
| | $u = (\mu_{obs} - \mu_{pred}) / (\sigma_{obs}\sigma_{pred})^{0,5}$ | μ - incidência média |
| $r_c = rC_b$ | | r - coeficiente de correlação de Pearson |

3.4 | Análise dos dados experimentais

3.4.1 | Incidência de *Ralstonia solanacearum* em diversas matrizes

Os resultados das análises laboratoriais permitiram obter dados sobre a incidência de *R. solanacearum* para as diferentes matrizes (hospedeiros e substratos). O número total de amostras colhidas proveniente do 'Programa Nacional de Prospecção' neste período, os resultados das análises laboratoriais e a frequência relativa de casos positivos encontram-se descritos na Tabela 3.3. Os dados apresentados encontram-se enumerados por ordem decrescente de frequência relativa de casos positivos (p) e, portanto, de incidência de *R. solanacearum*, para os vários hospedeiros e substratos. Na Figura 3.1 apresentam-se os respectivos intervalos de confiança (95%) associados ($\alpha' = 0,00341$).

Tabela 3.3 – Incidência de *Ralstonia solanacearum* em diferentes matrizes, em Portugal, no período de 1999-2006.

| Programas de prospecção | Total | Pos. | Neg. | % pos. | p |
|-------------------------|-------|------|------|--------|------|
| Tomateiro | 109 | 32 | 77 | 29,4 | 0,29 |
| Águas superficiais | 661 | 191 | 470 | 28,9 | 0,29 |
| Solo | 90 | 18 | 72 | 20,0 | 0,20 |
| Plantas espontâneas | 255 | 19 | 236 | 7,5 | 0,07 |
| Indústrias | 108 | 5 | 103 | 4,6 | 0,05 |
| Tubérculos de batateira | 1463 | 25 | 1437 | 1,7 | 0,02 |

A comparação múltipla de intervalos de confiança permitiu verificar que os valores de incidência de *R. solanacearum* em tubérculos de batateira e indústrias de transformação não diferem significativamente entre si mostrando-se relativamente baixos. A incidência da doença em tubérculos de batateira mostrou-se rara ($<0,05$), com valores de 0,014 para a batata-semente nacional e de 0,032 para tubérculos de origem nacional destinados ao consumo.

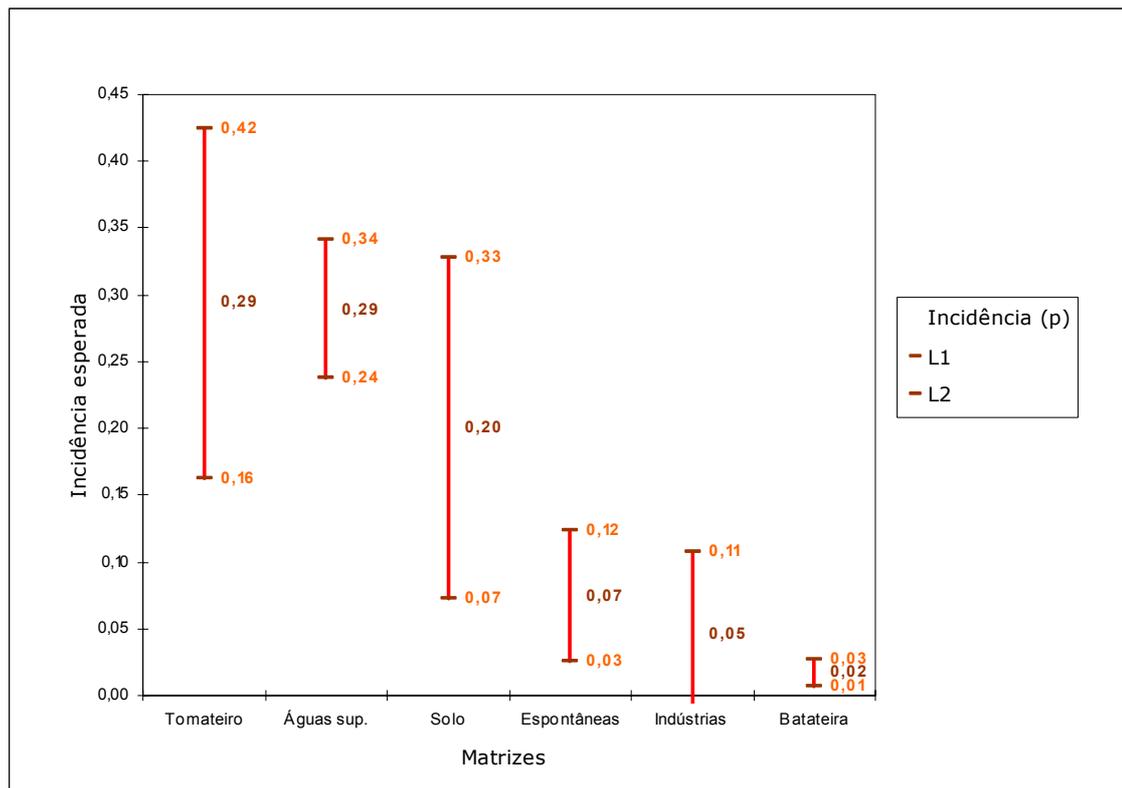


Figura 3.1 – Incidência *Ralstonia solanacearum* em diferentes matrizes e valores dos limites mínimos (L1) e máximos (L2) dos intervalos de confiança (95%) associados ($\alpha'=0,00341$).

Embora os valores de incidência obtidos para aquelas duas matrizes não sejam significativamente diferentes, poderão resultar de causas claramente distintas. Efectivamente, para os tubérculos de batateira os baixos os valores de incidência da doença, que contribuirão de forma pouco notória para a sua transmissão vertical, devem-se sobretudo a um apertado controlo ao nível da produção e comercialização destes materiais vegetais (União Europeia, 2006). Existe a obrigatoriedade de se proceder a ensaios laboratoriais para todos os lotes de batata-semente importados de países terceiros e a necessidade de os lotes de batata-semente e de batata-consumo provenientes de países da União Europeia possuírem passaporte fitossanitário, atestando a sua isenção, relativamente à presença de *R. solanacearum*. Deste modo, e dada a elevada qualidade destes materiais, os casos positivos existentes entre nós poderão resultar unicamente de contaminações por via da utilização de águas superficiais na rega (infecção primária) ou devido ao desrespeito

pelo período de quarentena das parcelas cultivadas (transmissão horizontal). Já no caso das indústrias, a fraca incidência deste organismo nas amostras analisadas poderá resultar da falta de fiabilidade dos ensaios laboratoriais numa matriz com uma microflora autóctone muito rica capaz de inibir o crescimento de *R. solanacearum*. Conforme se relata na Directiva 2006/63/CE (União Europeia, 2006), “a sensibilidade do teste de isolamento é afectada pelas populações de bactérias saprófitas competidoras, normalmente muito superiores nos efluentes de transformação de batata e de esgotos ... Devem considerar-se as limitações em termos de sensibilidade do esquema de ensaio, ao avaliar a fiabilidade de eventuais resultados negativos obtidos”.

Também nas plantas espontâneas a incidência deste organismo é relativamente baixa (0,03 a 0,12) atingindo, no entanto, valores que embora não diferindo significativamente daqueles obtidos para os tubérculos de batateira e indústrias, evidenciam uma maior prevalência da doença. Estes resultados referem-se unicamente à presença de infecções características com sintomas típicos da doença, onde se incluem, em muitos casos, a presença de necroses internas dos feixes vasculares. Embora se trate de uma doença vascular, a realização de isolamentos a partir de tecidos destes feixes, desprezando-se a epiderme ou a massa radicular da planta, poderá introduzir algumas discrepâncias relativamente à incidência real de *R. solanacearum*, por se menosprezar tanto a sua sobrevivência epifítica como aquela que se poderá verificar ao nível da rizosfera destas plantas.

Já nos solos, embora os valores de incidência possam variar entre 0,07 e 0,33, não diferindo significativamente daqueles obtidos para as plantas espontâneas, águas superficiais ou tomateiro, a possibilidade da frequência relativa de casos positivos poder atingir em média 20% indicia que a atenção dada aos solos como reservatório de *R. solanacearum* não deve ser menosprezada. De novo, estes valores poderão ser condicionados quer pela qualidade do método de amostragem quer pela presença de resultados falsos negativos decorrentes da falta de sensibilidade e especificidade dos meios de diagnóstico disponíveis (União Europeia, 2006).

Por último, as matrizes onde a incidência de *R. solanacearum* assume maior preponderância são as águas superficiais (0,24-0,34) e o tomateiro (0,16-0,42), e nos quais, pelos dados obtidos, se espera um maior impacto na prevalência deste organismo e na sua manutenção. A elevada fiabilidade dos resultados obtidos no diagnóstico para estas matrizes permite dizer, com segurança, que serão os factores de risco mais importantes na manutenção e dispersão de *R. solanacearum*, embora o solo deva ser igualmente tomado em consideração.

Relativamente à repartição da incidência da doença em termos geográficos torna-se algo difícil proceder a uma quantificação, dado variar muito em função da matriz. Sabe-se, no entanto, de acordo com os dados referentes à incidência de amostras positivas nas águas superficiais provenientes de diferentes aproveitamentos hidroagrícolas, que *R. solanacearum* se encontra amplamente dispersa e estabelecida nos ecossistemas das principais áreas de produção de solanáceas do país e que a presença de infecções repetidas nos permite

considerar este organismo endémico na generalidade dos aproveitamentos hidroagrícolas monitorizados.

Breukers *et al.* (2006), na tentativa de criar um modelo bio-económico para *R. solanacearum* na cadeia de produção de batata Holandesa, referem a contribuição das várias fontes de inóculo para o número final de lotes de tubérculos infectados num determinado período de tempo em que se pode excluir o efeito de um período inicial de transição (6 anos), ou seja, numa situação de equilíbrio dinâmico. Portugal encontra-se hoje também numa situação semelhante de equilíbrio dinâmico, resultante da reintrodução deste organismo em 1995. No caso Holandês, e à semelhança do que acontece no nosso país, as águas superficiais possuem grande importância nas infecções primárias contribuindo para 60% do número total de lotes de tubérculos infectados. A transmissão vertical, obtida pela utilização de material de propagação contaminado, contribui, naquele país, em cerca de 20% para o número total de lotes positivos. No que diz respeito à importância da designada transmissão horizontal, no caso da Holanda, não é atribuída qualquer importância às potenciais contaminações decorrentes da plantação, escolha e transporte de tubérculos, enquanto o papel do solo contaminado e do armazenamento serão apenas residuais. Outras manipulações culturais, como a gradagem e a colheita, têm uma importância ligeiramente superior, ainda que reduzida, na disseminação de *R. solanacearum* nesses sistemas de produção agrícolas.

Em Portugal, a análise por comparações múltiplas revela também outros factores que potencialmente poderão contribuir para a manutenção e dispersão de *R. solanacearum*, condicionando o número final de lotes de batata-semente e batata-consumo, de origem nacional, infectados. As águas superficiais de rega parecem ser o factor fundamental na origem de infecções primárias. A transmissão vertical parece ter uma importância residual, dado o número de lotes de batata-semente infectados ser diminuto. O grau de certeza relativamente a este contributo dependerá da percentagem de lotes sujeitos a análise laboratorial, contudo, dado o apertado controlo fitossanitário imposto pela legislação, esse valor não deverá nunca ser muito superior. Por outro lado, factores responsáveis pela transmissão horizontal da doença, como a presença e manutenção de espontâneas hospedeiras nos cursos de água e nos campos em quarentena, e o desrespeito pelos períodos de quarentena definidos para as parcelas, revelam também alguma preponderância. O contributo das indústrias, repondo resíduos não tratados nos campos e nas linhas de água, por falta de estações para tratamento dos mesmos, embora de difícil quantificação, parece real nas condições sócio-culturais ainda prevalentes entre nós.

Finalmente, outros factores poderão ser potencialmente responsáveis por uma transmissão horizontal mas, como já referido inicialmente, ficam fora do âmbito deste trabalho, nomeadamente: o contributo das manipulações culturais, a replantação de tubérculos com infecções latentes, a partilha de batata-semente e, por último, as condições de higiene dos campos e dos locais de armazenamento que deveriam ser aspectos a ter em conta, sobretudo na formação dos agricultores, de modo a serem minimizados.

A inexistência de um sistema que permita uma rastreabilidade completa de todos os lotes de tubérculos, desde a sementeira até à comercialização do produto final, contrariamente ao que acontece na Holanda (Janse, 1996; Breukers *et al.*, 2006), não permite tirar conclusões do mesmo tipo para o nosso país. Mesmo noutros países menos desenvolvidos como no Quênia ou no Egipto, onde a exportação para a UE de plantas ornamentais e de batata-consumo, respectivamente, é importante em termos económicos, foi possível tomar medidas neste sentido (Messiha, 2006; Smith *et al.*, 2006).

Os resultados aqui apresentados revelam também a necessidade de os futuros trabalhos de monitorização de *R. solanacearum* serem acompanhados de um esforço suplementar, quer ao nível da colheita de amostras quer de rotina laboratorial, nas matrizes (substratos e hospedeiros) onde ocorrerá um maior risco de incidência deste organismo. Efectivamente, e como se pode constatar pela observação do número de amostras colhidas, o esforço afecto à análise laboratorial de tubérculos de batateira, embora importante por se tratar de material de propagação vegetativa, não produz um 'output' revelador da situação real face à presença, transmissão e dispersão geográfica deste organismo. Por outro lado, são os dados obtidos, por via laboratorial, das matrizes tomateiro e águas superficiais, aqueles que revelam um maior conteúdo informativo no que diz respeito à presença e dispersão geográfica de *R. solanacearum* nas principais áreas de produção de culturas solanáceas, permitindo identificar os locais onde é mais premente actuar, face à necessidade compulsiva de erradicar este organismo de quarentena.

3.4.2 | Explorando o Contributo de Diferentes Factores de Risco. Que Evolução?

3.4.2.1 | Tubérculos de Batateira

De entre as 1463 amostras provenientes de lotes de tubérculos de batateira sujeitos a análise laboratorial, no período de 1999 a 2006, foram identificadas 25 amostras positivas, sendo 20 amostras provenientes de batata-consumo nacional e cinco de batata-semente de origem nacional provenientes da região de Montalegre e propostas à certificação. Detectaram-se ainda 13 amostras de origem nacional suspeitas (seis de lotes destinados ao consumo e sete de batata-semente), a partir das quais não foi possível isolar *R. solanacearum* ou provar a sua patogenicidade.

A incidência da doença nas amostras onde foi confirmada a presença de *R. solanacearum* naquele período mostra-se na Figura 3.2. À excepção do ano de 1999, a doença mostrou ter uma incidência muito reduzida considerando-se como rara (incidência inferior a 5%).

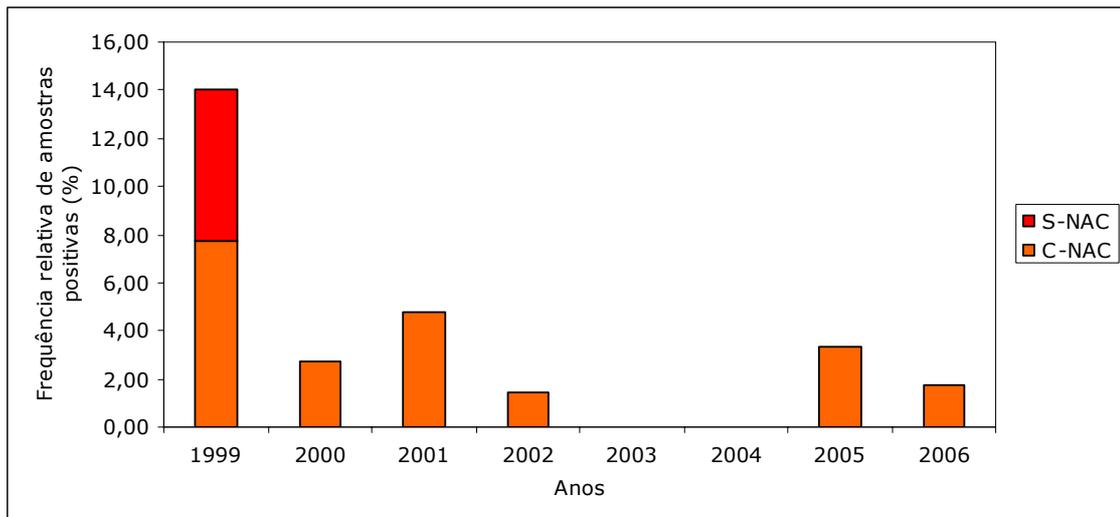


Figura 3.2 - Variação da frequência relativa do número total de amostras de tubérculos de batateira de origem nacional positivas, provenientes de batata-semente proposta à certificação (S-NAC) bem como de batata-consumo nacional (C-NAC), analisadas no período de 1999 a 2006.

Em 2003 e 2004 não se detectaram quaisquer casos de doença do pus em amostras de tubérculos de batateira nacional ou importada. Contudo, em 2005, apesar da doença se mostrar relativamente rara, verificou-se um aumento de incidência em amostras de batata-consumo de origem nacional. No cômputo geral e no que diz respeito à batata-consumo nacional, não existem diferenças significativas entre a situação no biénio 2005-2006 relativamente à situação inicial - biénio 1999-2000 ($\chi^2 = 1,307$; $p=0,2530$), pois apesar de o número de amostras infectadas ser inferior, o número de amostras analisadas também sofreu um decréscimo elevado (55,40%).

No que diz respeito à evolução do número de amostras de batata-semente de origem portuguesa infectadas, este tem vindo a decrescer. Enquanto em 1999 se identificaram cinco lotes infectados, em 2000 esse número foi nulo e posteriormente não se detectou qualquer lote de origem nacional, proposto à certificação, infectado com *R. solanacearum*. Este decréscimo tem paralelismo no declínio do volume de produção de batata-semente da região de Trás-os-Montes (Boticas, Bragança, Chaves e Montalegre) (Tabela 3.4).

É notório o decréscimo do número de amostras de batata-semente de origem nacional provenientes de lotes propostos à certificação na região de Trás-os-Montes. Efectivamente, em 2006 o número de amostras analisadas foi apenas 10% do total de amostras provenientes de lotes propostos à certificação no ano de 1999. A identificação de alguns casos no biénio de 1999-2000, obrigando à implementação do regime de quarentena em algumas parcelas, a detecção de águas superficiais contaminadas e ainda a exigência de condições particularmente restritivas para a produção de batata-semente proposta para certificação, poderão também ter contribuído, em associação com outros factores, para o abandono desta actividade.

Tabela 3.4 – Evolução do número de amostras tubérculos batata-semente propostas à certificação entre 1999 e 2006, por Concelho na região de Trás-os-Montes, e respectivo número de lotes infectados.

| Anos | Boticas | | Bragança | | Chaves | | Montalegre | | Total amostras | Total positivos |
|------|---------|------|----------|------|--------|------|------------|------|----------------|-----------------|
| | Total | Pos. | Total | Pos. | Total | Pos. | Total | Pos. | | |
| 1999 | 9 | 0 | 7 | 0 | 27 | 0 | 37 | 5 | 80 | 5 |
| 2000 | 5 | 0 | 2 | 0 | 46 | 0 | 33 | 0 | 86 | 0 |
| 2001 | 1 | 0 | 2 | 0 | 27 | 0 | 21 | 0 | 51 | 0 |
| 2002 | - | - | 2 | 0 | 15 | 0 | 22 | 0 | 39 | 0 |
| 2003 | - | - | - | - | 23 | 0 | 14 | 0 | 37 | 0 |
| 2004 | - | - | - | - | 20 | 0 | 19 | 0 | 39 | 0 |
| 2005 | - | - | - | - | 5 | 0 | 19 | 0 | 24 | 0 |
| 2006 | - | - | - | - | 4 | 0 | 4 | 0 | 8 | 0 |

A produção de batata-semente entre nós verifica-se em condições climáticas favoráveis à proliferação de sintomas da doença com níveis populacionais que facilitam a obtenção de um diagnóstico fiável. Noutras latitudes, como se verifica na Holanda, muitas vezes esses sintomas não se manifestam pondo em risco a comercialização de material de propagação infectado (Janse, 1996). A existência de infecções latentes em plantas não exibindo sintomas mostra a necessidade de produzir material de propagação vegetativa em condições climáticas favoráveis à expressão de sintomas da doença, uma vez que plantas ou tubérculos produzidos a baixas temperaturas e cultivados em condições mais favoráveis poderão conduzir a prejuízos devastadores (Coutinho, 2005).

No que se refere a tubérculos de batata-consumo, os lotes infectados (20) encontram-se distribuídos pelo Ribatejo-e-Oeste (12), Beira Litoral (4), Beira Interior (2) e Trás-os-Montes (2), com grande preponderância de amostras infectadas na região do Ribatejo-e-Oeste nas áreas de influência dos aproveitamentos hidroagrícolas de Cela (6) e do Sorraia, Ribeiras de Muge e Canha (6).

Enquanto no biénio 1999-2000 se registaram 11 casos confirmados de *R. solanacearum* em amostras de batata-consumo (Tabela 3.5), no biénio 2005-2006 identificaram-se apenas 3 casos. No entanto, tal como observado para batata-semente não existem diferenças significativas entre os biénios comparados.

Nos anos de 2003-2004 não se registaram casos da doença do pus. Embora o número de lotes sujeitos a análise laboratorial neste biénio não tenha decrescido significativamente, a ausência de casos positivos poderá decorrer da influência de alguns condicionalismos, como por exemplo, o menor do número de amostras provenientes da região do Ribatejo-e-Oeste, nomeadamente da área de influência do aproveitamento hidroagrícola de Cela, a qual contribui frequentemente com casos positivos de *R. solanacearum* em tubérculos de batata-consumo nacional. Outros factores a ter em conta poderão ser alguns condicionalismos de natureza climática que convirá ainda esclarecer, nomeadamente o efeito produzido pela existência de valores da temperatura do ar, no período de Primavera-Verão, muito

superiores à temperatura média da normal climatológica de referência 1961-1990, com ondas de calor nos meses de Junho e Agosto de 2003 e de Junho e Julho de 2004. Os valores da precipitação foram também muito inferiores aos da precipitação média para o mesmo período (2004 foi o ano mais seco desde 1931), de acordo com os dados do Instituto de Meteorologia (<http://www.meteo.pt/>).

Tabela 3.5 – Evolução do número de amostras de tubérculos de batata-consumo de origem nacional analisadas entre 1999 e 2006, por região, e respectivo número de casos positivos.

| Anos | EM ^(*) | | TM | | BL | | BI | | RO | | AL | | ALG | | Total amost. | Total pos. |
|------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------|------------|
| | Tot | Pos | Tot | Pos | Tot | Pos | Tot | Pos | Tot | Pos | Tot | Pos | Tot | Pos | | |
| 1999 | 23 | 0 | 2 | 1 | 21 | 0 | 1 | 1 | 32 | 6 | 14 | 0 | 10 | 0 | 103 | 8 |
| 2000 | 18 | 0 | 9 | 1 | 17 | 0 | 11 | 0 | 42 | 2 | 3 | 0 | 10 | 0 | 109 | 3 |
| 2001 | 20 | 0 | 1 | 0 | 19 | 2 | 9 | 1 | 57 | 2 | - | - | - | - | 105 | 5 |
| 2002 | 7 | 0 | 1 | 0 | 21 | 0 | 9 | 0 | 32 | 1 | - | - | - | - | 68 | 1 |
| 2003 | 13 | 0 | 0 | 0 | 24 | 0 | 10 | 0 | 14 | 0 | - | - | - | - | 61 | 0 |
| 2004 | 16 | 0 | 0 | 0 | 14 | 0 | 9 | 0 | 26 | 0 | 1 | 0 | - | - | 66 | 0 |
| 2005 | 19 | 0 | 2 | 0 | 20 | 1 | 7 | 0 | 11 | 1 | 1 | 0 | - | - | 60 | 2 |
| 2006 | - | - | nd | 0 | 4 | 1 | 9 | 0 | nd | 0 | - | - | - | - | 58 | 1 |

* EM – Entre-Douro e Minho, TM – Trás-os-Montes, BL – Beira Litoral, BI – Beira Interior, RO – Ribatejo-e-Oeste, AL – Alentejo, ALG – Algarve.

nd – não determinado

Tendo em conta que, nos últimos anos (a partir do ano 2000), a incidência da doença em tubérculos de batata-semente de origem nacional e importada tem sido nula e que não existem diferenças significativas entre a incidência da doença em amostras de tubérculos destinados ao consumo no biénios de 1999-2000 e de 2005-2006, poderá inferir-se que existem outros factores que poderão condicionar essa manutenção. De entre estes pode enumerar-se a utilização de águas superficiais contaminadas na rega de campos de batateira, o desrespeito pelos períodos de quarentena previstos para as parcelas infestadas com *R. solanacearum*, a manutenção de plantas espontâneas hospedeiras (incluindo 'zorras') em parcelas contaminadas, a partilha de alfaias agrícolas infestadas e o aproveitamento de tubérculos com infecções latentes em sementeiras subsequentes (procedimento muito comum numa agricultura tradicional de subsistência, ainda enraizada no nosso País).

Pradhanang *et al.* (1998) concluíram que, para as condições climáticas prevalecentes no Nepal, a utilização de tubérculos sãos e de parcelas de solo não contaminadas eram indispensáveis ao controlo de *R. solanacearum*. Mesmo quando se procedia à plantação de tubérculos sãos em solos infestados, essa vantagem era nítida, quer no que diz respeito à incidência da doença (sintomas nas plantas), quer na proporção de tubérculos sãos à data da colheita. Inversamente, a vantagem obtida pela sementeira de tubérculos infectados em parcelas de solo isentas deste organismo era nula. Relativamente à utilização de tubérculos contaminados para uma segunda cultura, estes autores verificaram que tinham uma influência muito significativa na incidência da doença ($p < 0,0001$). Do mesmo modo, a

incidência da doença era significativamente aumentada ($p=0,009$) pelo do uso de batata-semente contaminada, quando associada a solos infestados por *R. solanacearum*.

Tendo em conta a inexistência de amostras de batata-semente propostas para certificação, produzidas na Região de Trás-os-Montes, infectadas por *R. solanacearum* desde o ano 2000, caso se pretenda promover de novo esta actividade deveria implementar-se um sistema de qualidade que tivesse por base a prospecção exaustiva da bactéria nas águas superficiais de rega, a monitorização da presença de *S. dulcamara* associada a essas águas, a análise dos solos e das espontâneas presentes nas parcelas afectas e ainda uma análise do risco de reintrodução e dispersão deste organismo na zona referenciada como produtora de batata-semente. Um aspecto fundamental e muitas vezes descurado é a capacidade de efectuar a rastreabilidade de determinado lote ao nível da parcela, procedimento já aplicado mesmo em países em desenvolvimento (Smith *et al.*, 2006), como o Uganda, onde a falta de qualidade da batata-semente produzida induzia enormes prejuízos numa cultura com um potencial económico significativo. Efectivamente, num projecto com a colaboração do Central Science Laboratory (CSL, UK), onde o objectivo era quebrar o ciclo biológico de *R. solanacearum* na fase de produção de propágulos, procedeu-se à criação de uma Associação responsável pela aplicação de boas práticas de produção e de comercialização, incluindo a criação de uma marca associada a um elevado nível de qualidade do material de propagação. Também no Quénia, Wakahiu *et al.* (2006) verificaram a necessidade de mobilizar e formar os agricultores de modo a compreenderem melhor a epidemiologia da doença, desenvolvendo medidas de controlo adicionais que contribuiriam significativamente para a diminuição da incidência de *R. solanacearum*, numa óptica de produção integrada. Por outro lado, a produção de tubérculos de batateira no Egipto, em áreas auditadas e classificadas como isentas de *R. solanacearum*, permitiu diminuir drasticamente o número de casos positivos em lotes destinados à exportação, pela redução de uma transmissão horizontal (Elphinstone *et al.*, 2006).

Apesar da homogeneidade de *R. solanacearum* biovar2/raça 3 a nível genómico parecer ser resultado da baixa pressão selectiva a que se encontra exposta num habitat protegido pela presença contínua de hospedeiros propagados por via vegetativa, este procariota conseguiu estabelecer-se em cursos de água europeus e em plantas espontâneas, como na infestante perene *Solanum dulcamara*. Embora a sua erradicação do ambiente se tenha mostrado até agora algo difícil, a sua erradicação em zonas de produção de batata-semente parece possível (Janse, 1996).

3.4.2.2 | Plantas de batateira, tomateiro e de outras solanáceas cultivadas

Entre 1999 e 2006 foram analisadas 109 amostras de plantas de tomateiro apresentando ou não sintomas característicos da doença do mal murcho. A quase totalidade das plantas doentes analisadas era proveniente de campos regados com águas superficiais contaminadas

por *R. solanacearum*.

Os sintomas apresentados pelas plantas doentes são, no geral, semelhantes aos descritos na literatura, podendo variar em função das cultivares, estado vegetativo e fenológico. No entanto, verifica-se que é menos usual observar a presença de exsudado bacteriano emergindo dos feixes vasculares, possivelmente porque as condições climáticas prevalentes no período de Primavera – Verão, com reduzida humidade relativa, não o permitem.

Na Tabela 3.6 mostra-se a distribuição de casos positivos e negativos em amostras de tomateiro para o período entre 1999 e 2006. Apesar de o número de amostras analisadas no biénio de 2005-2006 ser inferior, não existem diferenças significativas relativamente ao biénio de 1999-2000 ($\chi^2 = 1,437$; $p=0,2306$). A situação parece então manter-se, entre os primeiros anos em que foi detectada a presença de *R. solanacearum* e a presente data, não havendo decréscimo significativo da frequência de plantas ou campos contaminados (Figura 3.3).

Tabela 3.6 – Amostras de tomateiro colhidas entre 1999 e 2006 e distribuição de casos positivos e negativos.

| Ano | Nº amostra | Positivos | Negativos |
|------|------------|-----------|-----------|
| 1999 | 22 | 11 | 11 |
| 2000 | 24 | 1 | 23 |
| 2001 | 17 | 1 | 16 |
| 2002 | 4 | 2 | 2 |
| 2003 | 19 | 7 | 12 |
| 2004 | 9 | 4 | 5 |
| 2005 | 5 | 4 | 1 |
| 2006 | 9 | 2 | 7 |

Um aspecto interessante, que se tem verificado com alguma frequência nos últimos anos, é a detecção de infecções mistas por *R. solanacearum* e por outras bactérias fitopatogénicas como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ou *Pseudomonas corrugata*.

Após a detecção de casos em tomateiro no Verão de 1998, veio a constatar-se existir um elevado número de parcelas infectadas, atingindo uma área considerável no ano de 1999. As parcelas afectadas eram, na maior parte dos casos, contíguas a outras que tinham apresentado plantas infectadas no ano anterior, resultando a contaminação de escurrimentos de águas de drenagem, da utilização das mesmas alfaias agrícolas e, principalmente, da utilização de águas superficiais contaminadas na rega.

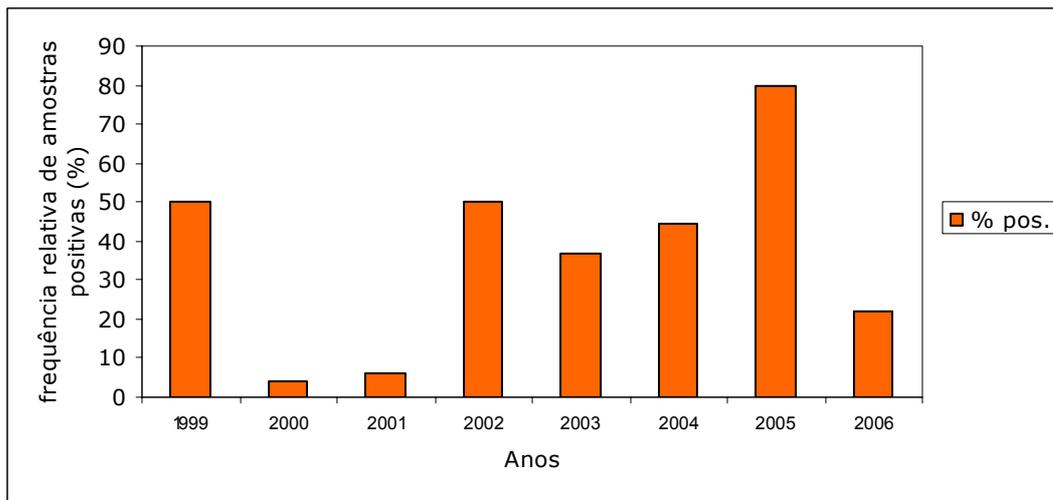


Figura 3.3 - Variação da frequência relativa do número total de amostras de tomateiro positivas no período de 1999 a 2006.

Foram identificados campos infectados nas Bacias do Rio Lis (Leiria e Batalha), Sorraia (Benavente, S. Magos, Mora e Vendas Novas), Ribeira de Muge (Coruche), Ribeira de Canha (Montijo); aproveitamento hidroagrícola de Cela (Nazaré) e Caia (Elvas). Todas as amostras provenientes de campos da região do Entre-Douro e Minho (Barcelos, Viana do Castelo, Vila Verde, Braga e Valongo) se mostraram isentas de *R. solanacearum*.

No que diz respeito ao pimenteiro foram analisadas, neste período, apenas 10 amostras provenientes da região do Alentejo, Beira Litoral, Entre-Douro e Minho e Ribatejo-e-Oeste, não tendo nunca sido possível isolar a bactéria, apesar de alguns exemplares apresentarem sintomas suspeitos da doença como murchidão e necrose dos feixes vasculares.

Relativamente às plantas de batateira foi igualmente analisado um reduzido número de amostras, normalmente apresentando sintomas suspeitos da doença, e provenientes, quer de campos em quarentena, quer de campos existentes em aproveitamentos hidroagrícolas e regados com águas superficiais contaminadas.

3.4.2.3 | Águas superficiais

Na maior parte dos países onde se observaram surtos de pus ou mal murcho em hospedeiros cultivados na década de 90, constatou-se também que estes resultavam da utilização de águas superficiais de rega contaminadas (Caruso *et al.*, 2005). De modo a proteger as suas produções de batata-semente e batata-consumo, grande parte dos países da Europa ocidental iniciaram programas de monitorização de águas de rega (Elphinstone *et al.*, 1998; Janse *et al.*, 1998; McHugh *et al.*, 2006).

Também em Portugal após a detecção, no Verão de 1998, de campos de tomateiro infectados regados com águas do aproveitamento hidroagrícola do Sorraia, se deu início, em

1999, aos ensaios laboratoriais conducentes à detecção e identificação de *R. solanacearum* em águas superficiais de rega.

Os resultados obtidos relativamente à análise de águas superficiais dos diferentes aproveitamentos hidroagrícolas seleccionados, para os anos de 1999 a 2006, apresentam-se de modo sumário na Tabela 3.7.

Durante o Inverno de 1999 todas as amostras colhidas se revelaram negativas para a presença de *R. solanacearum*. No entanto, no final da Primavera, registaram-se os primeiros resultados positivos em águas superficiais provenientes do rio Lis (Concelhos de Leiria e Alcobaça), região onde já em 1995 se tinham observado alguns casos de infecção em campos de batateira. Verificaram-se situações semelhantes para os resultados das análises laboratoriais de águas superficiais provenientes de outras bacias hidrográficas (Cela, Rib. Canha, Sorraia e Tâmega).

O registo da temperatura das águas superficiais, aquando da colheita, a partir do ano 2000, permitiu estimar as frequências relativas de amostras positivas em função da temperatura, conforme se mostra na Figura 3.4, para a totalidade das amostras colhidas entre 2000 e 2006 nos diferentes aproveitamentos para temperaturas compreendidas entre 12 e 29°C.

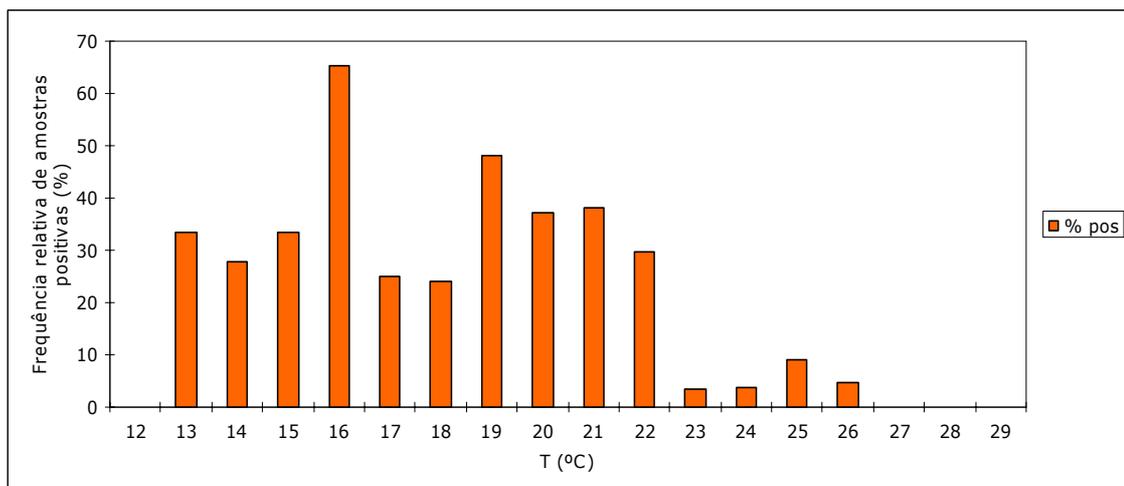


Figura 3.4 – Variação da frequência relativa do número total de amostras positivas em função da temperatura das águas superficiais de rega, para o período de 2000 a 2006.

No entanto, apesar da frequência relativa de amostras positivas variar com a temperatura média das águas, os dados obtidos quando essas temperaturas se situam acima dos 15°C, e portanto com valores superiores ao limiar a partir do qual é possível detectar laboratorialmente a presença da bactéria (Capítulo 2, 2.4.2.1) indicam que, sendo possível a sua detecção a partir do mês de Março, é em Abril que ocorre grande acréscimo de amostras positivas, reduzindo-se depois essa frequência para valores que rondam os 30% e que se mantêm aproximadamente constantes até Novembro (Figura 3.5).

Tabela 3.7 – Aproveitamentos hidroagrícolas monitorizados relativamente à presença de *Ralstonia solanacearum* em amostras águas superficiais de rega, para o período de 1999 a 2006.

| Perímetros de Rega | Resultados | Nº de amostras colhidas por ano | | | | | | | | Total |
|--------------------|--------------|---------------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| | | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | |
| Sorrala | + | 2 | 1 | 0 | 7 | 5 | 5 | 8 | 17 | 45 |
| | - | 47 | 47 | 44 | 40 | 22 | 3 | 19 | 13 | 235 |
| | s | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 11 |
| | % pos | 4,00 | 2,04 | 0,00 | 14,89 | 18,52 | 62,50 | 29,63 | 56,67 | 15,46 |
| Lis | + | 11 | 14 | 8 | 2 | 2 | | 4 | | 41 |
| | - | 11 | 15 | 8 | 3 | 0 | | 1 | | 38 |
| | s | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | | 0 | | 2 |
| | % pos | 50,00 | 45,16 | 50,00 | 40,00 | 100,00 | | 80,00 | | 50,62 |
| Cala | + | 10 | 8 | 12 | 7 | 4 | 5 | | | 46 |
| | - | 10 | 6 | 1 | 0 | 1 | 0 | | | 18 |
| | s | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 3 |
| | % pos | 45,45 | 53,33 | 92,31 | 100,00 | 80,00 | 100,00 | | | 68,66 |
| Tâmega | + | 1 | 8 | 2 | 1 | 1 | | | | 13 |
| | - | 4 | 2 | 4 | 1 | 3 | | | | 14 |
| | s | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | 0 |
| | % pos | 20,00 | 80,00 | 33,33 | 50,00 | 25,00 | | | | 48,15 |
| Idanha | + | 0 | 0 | | | | | | | 0 |
| | - | 2 | 2 | | | | | | | 4 |
| | s | 1 | 0 | | | | | | | 1 |
| | % pos | 0 | 0 | | | | | | | 0 |
| Cala | + | 0 | | | | 9 | 4 | 6 | 3 | 22 |
| | - | 1 | | | | 7 | 5 | 6 | 3 | 22 |
| | s | 0 | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | % pos | 0,00 | | | | 56,25 | 44,44 | 50,00 | 50,00 | 50,00 |
| B. Mondego | + | | | | 3 | | 0 | 0 | | 3 |
| | - | | | | 5 | | 5 | 4 | | 14 |
| | s | | | | 0 | | 0 | 0 | | 0 |
| | % pos | | | | 37,50 | | 0,00 | 0,00 | | 17,65 |
| R/Canha | + | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| | - | 2 | 6 | 4 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 18 |
| | s | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | % pos | 33,33 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 100,00 | 33,33 | 50,00 | 17,39 |
| Rib. Muge | + | | 3 | 4 | 2 | 0 | 0 | 3 | 4 | 16 |
| | - | | 3 | 6 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 15 |
| | s | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | % pos | | 50,00 | 40,00 | 66,67 | 0,00 | 0,00 | 75,00 | 100,00 | 51,61 |
| Sado | + | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 |
| | - | 21 | 15 | 2 | | | | | | 38 |
| | s | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 |
| | % pos | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 |
| Alvalade | + | 0 | | | | | | | | 0 |
| | - | 14 | | | | | | | | 14 |
| | s | 0 | | | | | | | | 0 |
| | % pos | 0 | | | | | | | | 0 |
| Alvor | + | 0 | | | | | | | | 0 |
| | - | 6 | | | | | | | | 6 |
| | s | 0 | | | | | | | | 0 |
| | % pos | 0 | | | | | | | | 0 |
| Arrabulos | + | 0 | | | | | | | | 0 |
| | - | 1 | | | | | | | | 1 |
| | s | 0 | | | | | | | | 0 |
| | % pos | 0 | | | | | | | | 0 |
| Guardiana | + | 0 | | | | | | | | 0 |
| | - | 2 | | | | | | | | 2 |
| | s | 0 | | | | | | | | 0 |
| | % pos | 2 | | | | | | | | 2 |
| Mira | + | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 |
| | - | 7 | 4 | 1 | | | | | | 12 |
| | s | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 |
| | % pos | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 |
| Vigia | + | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 |
| | - | 0 | | | | | | | | 0 |
| | s | 1 | | | | | | | | 1 |
| | % pos | 0 | | | | | | | | 0 |
| S. Magos | + | 0 | | | | | | | | 0 |
| | - | 1 | | | | | | | | 1 |
| | s | 0 | | 0 | 0 | | | | | 0 |
| | % pos | 0 | | 0 | 0 | | | | | 0 |

(*) - + = amostra positiva, - = amostra negativa, s = amostra suspeita.

Esta tendência é confirmada através de um teste de χ^2 mostrando que, apesar de o número total de amostras colhidas para este mês ao longo dos vários anos do estudo não ser dos mais elevados (19), existe uma associação altamente significativa ($\chi^2 = 12,202$; $p=0,0005$), com um número de amostras positivas francamente superior ao esperado para o mês de Abril, contrariamente ao que se verifica para os restantes meses do ano. Constata-se assim também a existência de um risco acrescido de contaminação de campos de culturas solanáceas quando utilizadas águas superficiais de rega neste período (OR=5,43, IC 95%: 1,64-18,01). Este aumento da frequência relativa de pontos com águas superficiais contaminadas poderá estar directamente relacionado com um aumento de pluviosidade ou do nível de saturação dos solos, com um conseqüente aumento dos volumes de águas de lixiviação, e portanto, de um incremento do seu aporte para linhas de água que ficaram por esta via contaminadas. Estas conclusões não são no entanto corroboradas pelos dados referentes aos valores da precipitação para a normal climatológica de referência 1961-1990 (Figura 3.6).

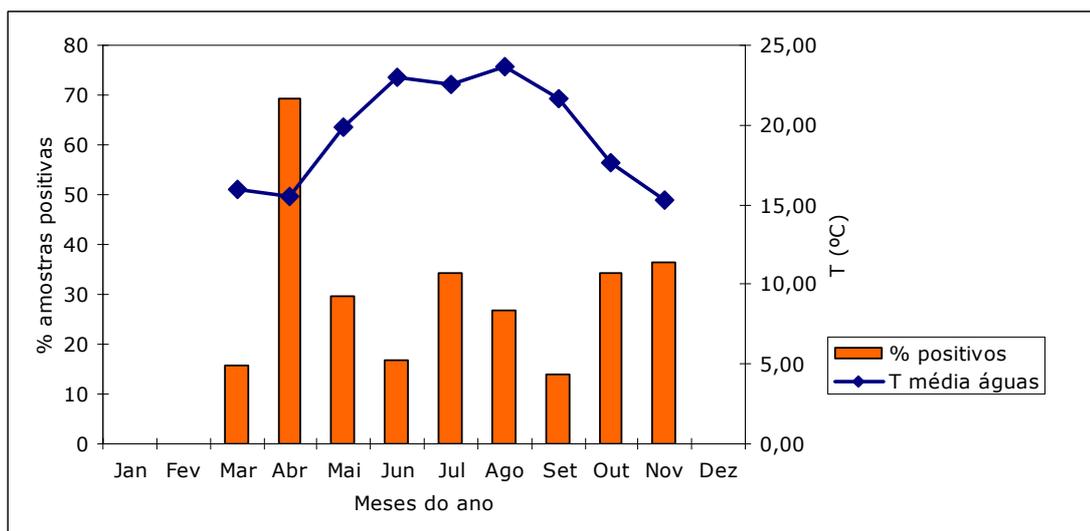


Figura 3.5 – Representação gráfica da temperatura média das águas superficiais e da frequência relativa de amostras positivas ao longo do ano, para o período de 2000 a 2006.

Uma informação também importante é o facto de a orografia regional ser condicionante importante dos níveis de infestação das águas superficiais (Olsson, 1976; Pradhanang, 1999; Van Elsas *et al.*, 2000).

Existirão ainda outros factores, nomeadamente a presença de *S. dulcamara* que pode servir como reservatório para este organismo, acumulando e libertando-o continuamente na água (Elphinstone *et al.*, 1998; Janse *et al.*, 1998). Efectivamente, essa explicação tem servido para justificar o aumento da população de *R. solanacearum* nas águas superficiais nos meses de Primavera, quando as suas temperaturas sobem acima dos 15°C (Wenneker *et al.*, 1999). Por outro lado, van Elsas *et al.* (2001) referem a possibilidade de ocorrer uma reversão do estado inactivo (VNBC) em que as células bacterianas se encontravam em presença das

baixas temperaturas das águas no Inverno, tornando-se activas à medida que essas temperaturas aumentam.

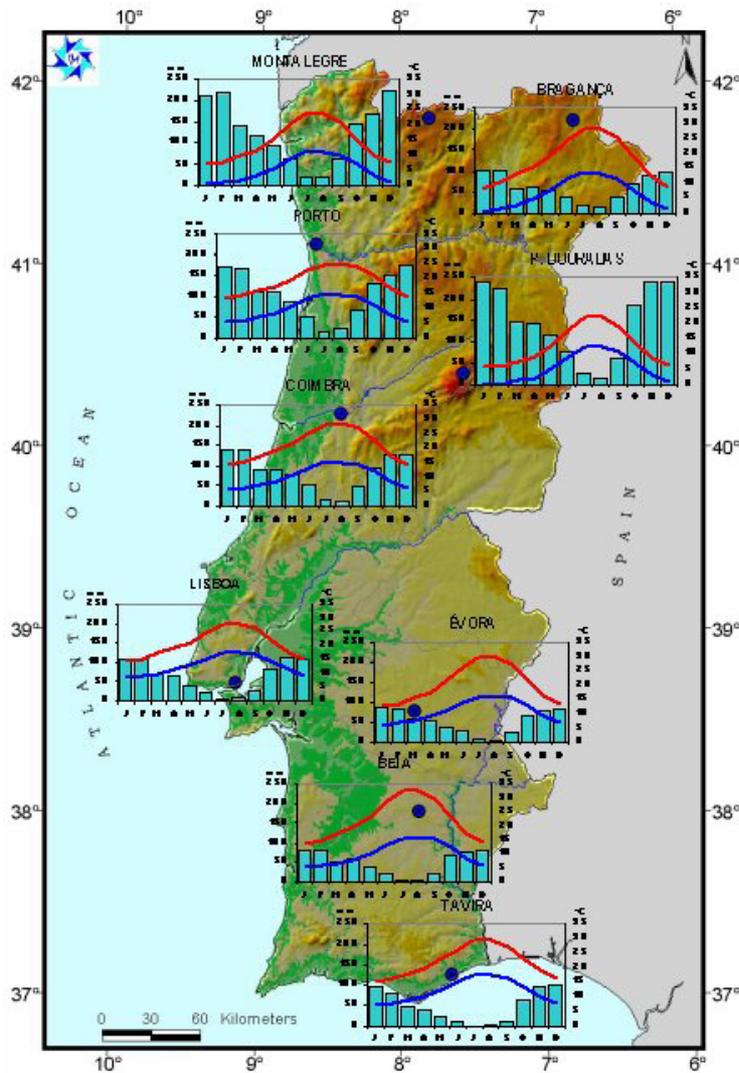


Figura 3.6 – Ciclos médios anuais da temperatura mensal (mínima e máxima) e da precipitação (1961-1990) (Fonte: Instituto de Meteorologia, Perfil Climático do Continente, <http://www.meteo.pt>).

Torna-se assim clara a necessidade de intensificar as análises laboratoriais entre os meses de Abril e Novembro, período em que, estando *R. solanacearum* activa, o risco associado ao uso de águas superficiais parece acrescido. No entanto há ainda que investigar o contributo que as células bacterianas VBNC de *R. solanacearum* poderão ter nos restantes meses do ano, caso mantenham a capacidade de se tornar virulentas, conforme referem van Elsas *et al.* (2005). Neste sentido, terá ainda que ocorrer uma evolução das técnicas de diagnóstico aplicadas à rotina para detecção e identificação de formas VBNC, através da utilização de métodos independentes de cultura, verificando-se a sua validade quer em termos de sensibilidade e de fidedignidade quer em termos legislativos.

Por outro lado, Caruso *et al.* (2005) verificaram que a sobrevivência deste organismo parece ser também afectada pela flora microbiana aquática, nomeadamente pela existência de

bacteriófagos, cuja detecção foi já confirmada laboratorialmente (López & Biosca, 2005). Outros autores referem também a possível acção de toxinas produzidas por cianobactérias, a presença de algas e a acção de protozoários predadores (Wenneker *et al.*, 1999). Estas constatações abriram já caminho para a investigação do controlo biológico de *R. solanacearum* por bacteriófagos em águas de rega (Alvarez *et al.*, 2006).

Não existem grandes referências na bibliografia que permitam confirmar o decréscimo das populações activas de *R. solanacearum* quando as temperaturas destas águas sobem acima dos 22°C. A maior parte dos estudos existentes referem-se a países de climas temperados, onde essas temperaturas normalmente não atingem valores tão elevados. Contudo, Van Elsas *et al.* (2001) verificaram que a sobrevivência deste organismo na água era dependente da sua temperatura, com níveis máximos de sobrevivência aos 12, 20 e 28°C, independentemente da concentração de inóculo ou do estado fisiológico das células bacterianas. Os mesmos autores verificaram ainda que ocorria uma conversão dessas células para o estado VBNC quando as temperaturas baixavam até aos 4°C, mas que o mesmo não acontecia para temperaturas próximas dos 20°C. Por outro lado, as populações de *R. solanacearum* em água decrescem mais rapidamente a 4°C do que para temperaturas próximas dos 18°C, podendo no entanto sobreviver no seu estado activo em ambientes oligotróficos ou mesmo em água ultra-pura por um período de dois anos à temperatura ambiente (Van Elsas *et al.*, 2005), parecendo mostrar comportamentos divergentes em função do habitat.

Para a totalidade dos aproveitamentos hidroagrícolas, o risco associado ao uso de águas superficiais na rega de culturas solanáceas de Primavera-Verão relativamente às de Outono-Inverno parece não variar significativamente (OR=1,07, IC 95%: 0,62-1,85).

Após os três primeiros anos de monitorização deste Programa (1999-2001), foram eleitos os oito aproveitamentos hidroagrícolas associados à cultura de plantas solanáceas que revelaram a existência de amostras positivas em pelo menos um dos anos amostrados, embora as frequências relativas de amostras positivas pudessem apresentar valores muito heterogéneos (entre aproximadamente 2 e 90%), uma vez que o risco associado ao uso agrícola de águas superficiais contaminadas deveria ser totalmente eliminado.

Algumas limitações existentes à data reflectiram-se, posteriormente, na falta de homogeneidade das amostragens, como facilmente se constata na Tabela 3.7 e na Figura 3.7. No entanto, à excepção do aproveitamento hidroagrícola do B. Mondego onde as amostragens dizem respeito aos anos de 2002, 2004 e 2005, observando-se a existência de águas superficiais contaminadas apenas no ano de 2002, os restantes aproveitamentos foram monitorizados durante, pelo menos, quatro anos.

Com o objectivo de verificar a evolução da situação em termos de expectativas face ao controlo e erradicação deste organismo de quarentena, foi efectuado o estudo da presença ou ausência da bactéria nos mesmos pontos de colheita, amostrados em anos sucessivos

(Figura 3.8). Assim, elegeram-se os pontos de colheita onde se procedeu sistematicamente à recolha de amostras para análise laboratorial entre os anos de 1999 e 2006.

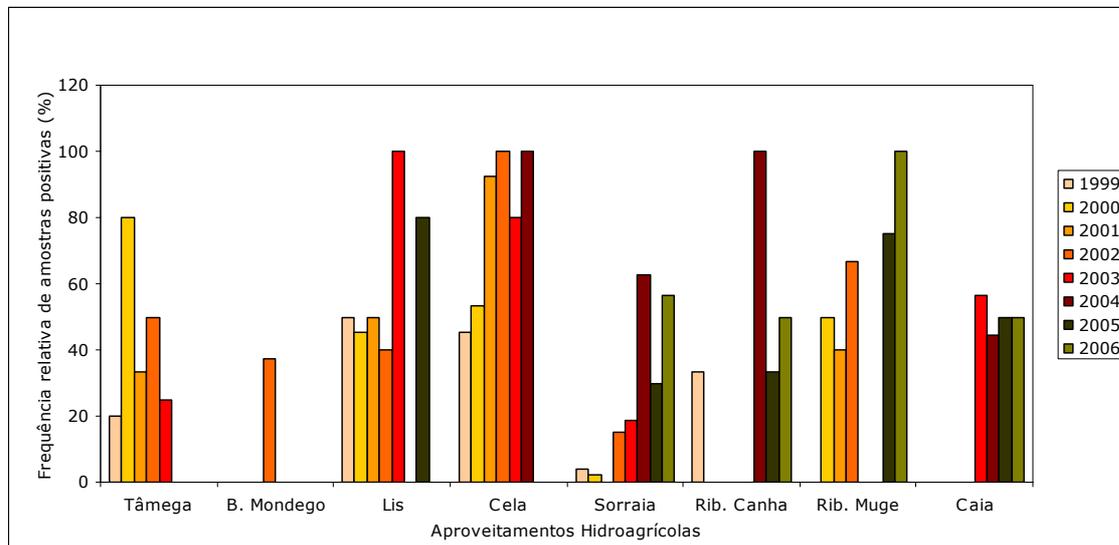


Figura 3.7 – Frequência relativa de amostras positivas quanto à presença de *Ralstonia solanacearum* nos oito aproveitamentos hidroagrícolas monitorizados entre 1999 e 2006.

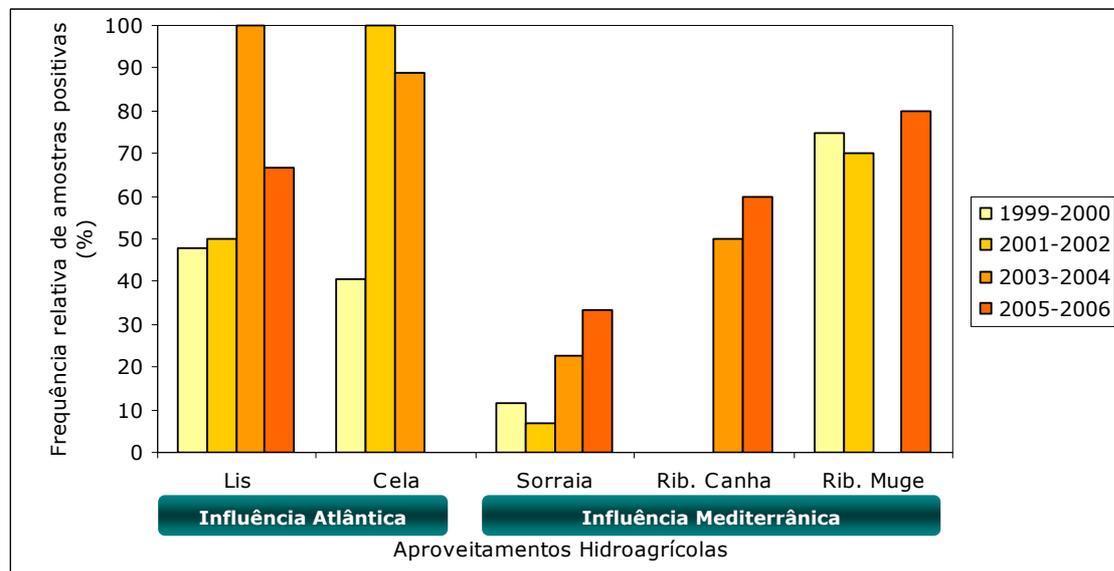


Figura 3.8 – Representação gráfica da evolução da frequência relativa de amostras positivas em cinco aproveitamentos hidroagrícolas monitorizados entre 1999 e 2006, por classes de anos para os mesmos pontos de colheita de águas superficiais.

Observa-se uma associação significativa ($\chi^2 = 6,193$; $p=0,0128$) no que diz respeito à evolução da frequência relativa de amostras positivas nos mesmos pontos de amostragem dos referidos aproveitamentos hidroagrícolas, quando se compara o quadriénio 2003-2006 vs. 1999-2002. Verifica-se assim que a situação, relativamente ao nível de contaminação das

águas superficiais nestes aproveitamentos, se tem vindo a agravar. A única excepção parece ser o perímetro de rega do Tâmega, onde a frequência relativa das amostras positivas decresceu até 2003 (Figura 3.7). No entanto, uma vez que não se procedeu a novas colheitas a partir desse ano, a situação actual poderá ser algo diferente.

De notar que, para a generalidade dos locais de colheita, uma vez detectada a bactéria num determinado ano (normalmente no início da Primavera ou Verão), essa contaminação se mantém geralmente até ao Outono.

Relativamente às áreas geográficas com águas superficiais onde a presença de *R. solanacearum* é maior, verifica-se uma associação altamente significativa ($\chi^2 = 28,664$; $p=0,00000009$) para os aproveitamentos hidroagrícolas da região litoral centro, compreendendo os perímetros de rega do Lis, Baixo Mondego e Cela, de influência Atlântica temperada, comparativamente às áreas regadas das bacias hidrográficas dos rios Sorraia e Caia associadas a condições climáticas marcadamente Mediterrânicas, mais áridas e com maiores amplitudes térmicas. Torna-se então claro que, caso se utilizem águas superficiais de rega, os aproveitamentos hidroagrícolas do Lis, Baixo Mondego e Cela constituirão áreas de maior risco para a cultura de solanáceas, comparativamente às áreas de influência do Sorraia e do Caia (OR=4,38, IC 95%: 2,50-7,68).

Estudos tendo por base os genomas conhecidos de estirpes de *R. solanacearum* adaptadas a climas tropicais e temperados permitiram já concluir sobre a maior virulência de estirpes adaptadas a climas de características temperadas, com um máximo, para temperaturas próximas dos 18°C. Por outro lado, é evidenciada maior virulência a 28°C por uma estirpe adaptada à sobrevivência nas regiões tropicais. A par desta resposta fisiológica, Bliss *et al.* (2006) constataram ainda uma adaptação da regulação da expressão de determinados genes em presença de temperaturas mais baixas e um incremento na produção de ácidos gordos insaturados em detrimento dos saturados. Estes factos poderão constituir um forte indício de que as estirpes de *R. solanacearum* presentes em Portugal, por se encontrarem mais activas para temperaturas mais amenas, poderão encontrar-se particularmente adaptadas a climas de características mais temperadas.

Noutros países da Europa onde ocorreram surtos de pus da batateira, na última década do século 20, verificou-se uma estreita associação entre a presença de águas superficiais de rega contaminadas por *R. solanacearum*, a existência de *S. dulcamara* nas linhas de águas e a sua contaminação por efluentes provenientes de indústrias de transformação e processamento de solanáceas (Janse, 1996; Elphinstone *et al.*, 1998; McHugh *et al.*, 2006).

Em Portugal, parece mais difícil estabelecer a origem da contaminação inicial das águas de rega. Efectivamente, esta poderá ter ocorrido por vias distintas em função da região. Enquanto nas regiões mais a norte a presença de *S. dulcamara* poderá ter um papel mais relevante na sua manutenção e dispersão, nas regiões mais a sul, o contributo de grandes áreas de tomate destinado ao processamento industrial e de indústrias de embalagem e transformação de solanáceas, por vezes desprovidas de estações de tratamento de resíduos, parece ser mais evidente. Apesar daquela planta rípicola se encontrar amplamente dispersa

nos cursos de água dos vários aproveitamentos hidroagrícolas, a sua prevalência não está devidamente estudada. Por outro lado, as evidências laboratoriais e os conhecimentos obtidos por deslocações a determinadas áreas de regadio permitiram-nos constatar o contributo do abandono de resíduos vegetais contaminados e da reposição de resíduos líquidos, por vezes não tratados ou resultantes de sistemas de tratamentos ineficazes, na contaminação das águas superficiais.

Em determinados sistemas agrícolas, os níveis de infestação das águas parecem decrescer de forma evidente após final do ciclo cultural, atingindo níveis populacionais indetectáveis ao fim de um a dois meses (Pradhanang, 1999). Este facto também sugere que a detecção de *R. solanacearum* em águas superficiais contaminadas resulta da sua libertação por lexiviação de águas de drenagem provenientes de campos infestados.

Nos sistemas de produção agrícolas existentes entre nós, onde a monocultura de solanáceas é corrente (cultura de batateira Primavera-Verão e Outono-Inverno ou cultura do tomateiro Primavera-Verão seguida por cultura de batateira Outono-Inverno), o aporte de populações de *R. solanacearum* para as linhas de água a partir das águas de drenagem poderá manter-se quase constante ao longo de todo o ano. Este aspecto é preocupante na medida em que condicionará o seu processo de erradicação.

À semelhança do que se passa noutros países, a legislação da União Europeia proíbe a utilização de águas superficiais contaminadas apenas na rega de culturas solanáceas. As águas contaminadas podem ser, no entanto, utilizadas para rega de outras culturas hortofrutícolas (Van Vaerenbergh *et al.*, 2006). Dada a prevalência de águas superficiais contaminadas (sobretudo nos aproveitamentos hidroagrícolas de influência atlântica), a falta de limpeza da vegetação das valas de rega, e a manutenção de plantas espontâneas hospedeiras muito comuns nos campos de cultivo, poderá dificultar em larga medida a erradicação de *R. solanacearum* nestes ecossistemas.

3.4.2.4 | Hospedeiros Alternativos

Os resultados obtidos nos ensaios laboratoriais permitiram confirmar a presença de *R. solanacearum* em plantas espontâneas, já conhecidas como hospedeiros alternativos da Família *Solanaceae* (*S. dulcamara*, *S. nigrum* e *D. stramonium*), e identificar novos hospedeiros, muito comuns na flora espontânea da zona Mediterrânica, capazes de funcionar como reservatório deste organismo, conforme consta da Tabela 3.8.

De referir que de entre as várias espécies hospedeiras referidas, se inclui a espécie cultivada *Citrullus lanatus* (melancia), com potencial em termos económicos e que poderia funcionar, no período de Primavera – Verão, como cultura alternativa à cultura do tomateiro, podendo ser utilizada em parcelas sujeitas a quarentena. Contudo, numa parcela naturalmente infestada, após um ano em regime de quarentena e onde se procedeu ao cultivo de melancia, verificou-se que esta espécie se encontrava infectada por *R. solanacearum*, tendo-

se recuperado a bactéria a partir de tecido dos feixes vasculares da região do colo de plantas com sintomas típicos da doença.

Tabela 3.8 – Espécies botânicas hospedeiras alternativas de *Ralstonia solanacearum* em Portugal, no período de 1999-2006.

| Espécie | nº plantas | % pos |
|-----------------------------|------------|--------|
| <i>Capsella rubella</i> | 4 | 25,00 |
| <i>Chenopodium album</i> | 4 | 25,00 |
| <i>Citrus lanatus</i> | 4 | 25,00 |
| <i>Cynodon dactylon</i> | 1 | 100,00 |
| <i>Datura stramonium</i> | 18 | 5,56 |
| <i>Polygonum arenastrum</i> | 2 | 50,00 |
| <i>Portulaca oleracea</i> | 18 | 5,56 |
| <i>Senecio vulgaris</i> | 5 | 40,00 |
| <i>Solanum dulcamara</i> | 27 | 14,81 |
| <i>Solanum nigrum</i> | 20 | 45,00 |
| <i>Solanum sublobatum</i> | 4 | 25,00 |
| <i>Urtica urens</i> | 4 | 25,00 |

Tendo em conta os dados da Tabela 3.8, parece evidente a possibilidade de espécies menos conhecidas ou mesmo ainda não identificadas como hospedeiros alternativos, pertencentes a diferentes géneros, poderem albergar a bactéria. Entre estas contam-se: *Capsella rubella*, *Polygonum arenastrum*, *Senecio vulgaris*, *Solanum sublobatum* e *Urtica urens*.

Parece preponderante a importância que *S. nigrum* possui relativamente às outras infestantes ($\chi^2 = 8,127$; $p=0,0044$) ou mesmo em relação a *S. dulcamara* ($\chi^2 = 7,406$; $p=0,0065$) no que diz respeito ao seu contributo para a manutenção de *R. solanacearum*, situação que é agravada pelo facto de se tratar de uma infestante que pode ser bienal. Efectivamente, 45% das plantas analisadas originaram resultados positivos para a presença de *R. solanacearum*, ao contrário de *S. dulcamara* onde apenas 14,81% das plantas se revelaram positivas. Apesar de alguns factores poderem influenciar os resultados das análises laboratoriais, tendo em conta a grande proliferação de *S. nigrum* na flora espontânea de Portugal, deverá ter-se em conta o papel que esta espécie poderá ter na manutenção de *R. solanacearum* nos campos que se encontram em regime de quarentena.

O risco associado à presença de *D. stramonium* e de *P. oleracea* em campos cultivados com plantas solanáceas ou em regime de quarentena parece ser inferior ao risco associado à presença de outras infestantes em geral, de acordo com os valores obtidos para os testes de significância e 'odd-ratios' associadas, conforme consta da Tabela 3.9. Hayward (1994) refere que *P. oleracea* é uma planta hospedeira que se pode considerar mais resistente ou tolerante, embora num dos estudos efectuados (Moffet & Hayward, 1980) esta espécie tenha mostrado sintomas de doença e tenha sido possível isolar *R. solanacearum* a partir das suas

raízes.

No que diz respeito a *S. nigrum* e *S. dulcamara*, a sua presença constitui um contributo inequívoco na manutenção de *R. solanacearum*, destacando-se significativamente o papel de *S. nigrum* (Tabela 3.9).

Tabela 3.9 – Risco associado à presença de algumas espécies botânicas hospedeiras alternativas de *Ralstonia solanacearum*.

| Espécie | χ^2 | p | OR | IC (95%) |
|---------------------------|----------|------------|-------|--------------|
| <i>Datura stramonium</i> | 0,025 | 0,8733 | 0,85 | 0,11 – 6,70 |
| <i>Portulaca oleracea</i> | 0,687 | 0,4070 | 0,90 | 0,11 – 7,11 |
| <i>Solanum dulcamara</i> | 3,428 | 0,0641 | 2,90 | 0,90 – 9,40 |
| <i>Solanum nigrum</i> | 52,638 | 0,00000000 | 20,75 | 7,14 – 60,34 |

No que diz respeito a *D. stramonium*, quando se pretende averiguar se o risco da sua manutenção nas parcelas em quarentena poderá ser algo diferente daquele associado a outros hospedeiros alternativos menos importantes ou mesmo a espécies da flora espontânea não identificadas como hospedeiras, verifica-se contudo que a sua presença não constituirá um risco acrescido para a manutenção de *R. solanacearum* ($\chi^2 = 1,827$; $p=0,1713$, $OR=4,24$, $IC\ 95\%: 0,45 - 39,99$).

O estudo efectuado em plantas de *S. dulcamara* permitiu verificar que o estado vegetativo da planta, a estação do ano e o facto de as raízes da planta se encontrarem ou não submersas são factores que poderão afectar o seu papel como hospedeiro alternativo (Capítulo 2, 2.4.2.1). Este último aspecto foi confirmado em Inglaterra por Elphinstone *et al.* (1998), onde só foi possível isolar *R. solanacearum* a partir de plantas cujas raízes se encontram dentro de água.

Nem todas as plantas de *S. dulcamara* sujeitas a ensaios laboratoriais apresentavam os sintomas característicos de necrose dos feixes vasculares, parecendo a expressão destes sintomas estar particularmente dependente da idade da planta.

Estudos efectuados na Escócia permitiram concluir que baixas populações de *S. dulcamara* junto às margens dos rios limitam a sobrevivência e dispersão de *R. solanacearum* (McHugh *et al.*, 2006). A destruição de plantas desta espécie, diagnosticadas como infectadas por *R. solanacearum*, embora permitisse obter bons resultados relativamente ao seu controlo e erradicação, conduziu, no entanto, a uma perda de diversidade genética desta espécie vegetal (Winfield *et al.*, 2006).

Outro aspecto estudado foi o potencial contributo dado pelas sementes de *S. nigrum* como veículo de transmissão da bactéria. A análise de quatro amostras de sementes (jovens e após maturação), obtidas a partir de plantas infectadas da mesma espécie, não permitiu isolar a bactéria, pelo que não parecem constituir um veículo eficiente de transmissão deste

organismo à semelhança do que acontece com as sementes de tomateiro (Zhang *et al.*, 1993).

Além de *S. dulcamara*, identificada como principal hospedeiro alternativo de *R. solanacearum* noutros países da Europa, deu-se também especial atenção a outras espécies espontâneas ripícolas particularmente comuns em cursos de água de zonas de regadio contaminadas. Assim, atabua, caniço, grama, junção, juncos, jacintos-de-água, silva e raízes de choupo, entre outros, foram estudados laboratorialmente. Nenhuma destas espécies se revelou positiva relativamente à presença deste organismo. No que diz respeito aos jacintos-de-água, dada a sua grande proliferação em certas áreas do aproveitamento hidroagrícola do Sorraia onde se encontravam águas superficiais contaminadas, analisaram-se estas plantas em várias épocas do ano e, dada a sua complexidade morfológica, procedeu-se ao estudo de várias secções da planta. Contudo, não se obtiveram também quaisquer resultados que permitissem atribuir a esta espécie um papel de hospedeiro alternativo.

Embora o nível de incidência de *R. solanacearum* pareça ser relativamente baixo, Wenneker *et al.* (1999) identificaram *Urtica dioica* como hospedeiro alternativo perene ripícola na Holanda. Contudo nas condições prevalentes em Portugal, não foi nunca, por nós, identificado nas linhas de água dos principais aproveitamentos hidroagrícolas. No entanto, outra planta deste género, *Urtica urens*, muito comum no país em campos cultivados, poderá constituir um hospedeiro alternativo, uma vez a bactéria já foi isolada de uma planta apresentando inclusivamente sintomas de doença.

Um aspecto relevante, associado à presença de infestantes hospedeiras, é sem dúvida o caso dos campos em quarentena. Nestes deve-se ter em conta não só a manutenção de plantas espontâneas da família *Solanaceae*, mas também de outras famílias e géneros botânicos, e ainda a presença de plantas cultivadas não solanáceas que possam constituir fontes de inóculo ou de manutenção da bactéria. Ao albergarem níveis populacionais de *R. solanacearum* muito inferiores, e que se traduzem na presença de infecções latentes e não de sintomas explícitos da doença, estas espécies são contribuintes assintomáticos funcionando como reservatórios e condicionando a produtividade de culturas solanáceas mesmo após cumprimento dos períodos de quarentena recomendados (Tusiime *et al.*, 1998).

De referir ainda que, para além de *S. dulcamara*, infestante ripícola com reconhecida importância na manutenção deste organismo nos países do Norte da Europa, por se manter viável por mais de um ano (Elphinstone *et al.*, 1998; Wenneker *et al.*, 1999), o contributo dado por estas espécies vegetais como hospedeiros alternativos na sobrevivência de *R. solanacearum*, quer em solos cultivados quer noutros sujeitos a pousio, dificulta, sem dúvida, a sua erradicação mesmo em situações de quarentena.

Além das espécies referidas, constatou-se que existem outras plantas espontâneas que, por revelarem resultados positivos em alguns ensaios laboratoriais, também se poderão comportar como potenciais hospedeiros: *Amaranthus retroflexus*, *Apium nodiflorum*, *Cyperus rotundus*, *Cyperus longus*, *Digitaria sanguinalis*, *Heliotropium europaeum*, *Lathyrus annus*, *Polygonum persicaria*, *Scanix sp.*, *Tribulus terrestris* e *Typha sp.*.

O controlo de *R. solanacearum* torna-se assim particularmente difícil porque muitas das medidas de carácter cultural e mesmo a utilização de cultivares de batateira e tomateiro menos susceptíveis, aliadas à escolha de locais apropriados para produção de batata-semente e esquemas de rotação de culturas, poderão não ser suficientemente eficientes, se não se tiver em conta a existência de hospedeiros alternativos que a poderão manter por mais de um ano, caso se tratem de espontâneas bienais.

As várias espécies supracitadas, a partir das quais foi possível isolar *R. solanacearum* a partir dos feixes vasculares e verificar a patogenicidade dos isolados em plantas indicadoras de tomateiro, nem sempre revelaram sintomas típicos de doença mesmo quando colhidas em campos onde coabitavam com culturas solanáceas em estado avançado de doença (Tabela 3.10), apresentando-se o solo infestado e sendo continuamente regadas por águas superficiais contaminadas. As infecções sistémicas parecem na realidade não resultar de níveis populacionais muito elevados, podendo por isso não dar origem a sintomas característicos como referem Pradhanag *et al.* (2000). Já a presença de sintomas de murchidão resultam sempre, segundo os mesmos autores, de níveis populacionais elevados na rizosfera dessas mesmas plantas.

Tabela 3.10 – Plantas espontâneas apresentando doença vascular causada por *Ralstonia solanacearum* e presença de sintomas típicos de mal murchido.

| Especie | Familia | Presença de sintomas |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------|
| <i>Capsella rubella</i> | <i>Brassicaceae</i> | Por vezes |
| <i>Chenopodium album</i> | <i>Chenopodiaceae</i> | Nunca |
| <i>Citrulus lanatus</i> | <i>Cucurbitaceae</i> | Por vezes |
| <i>Cynodon dactylon</i> | <i>Gramineae</i> | Nunca |
| <i>Datura stramonium</i> | <i>Solanaceae</i> | Por vezes |
| <i>Polygonum arenastrum</i> | <i>Polygonaceae</i> | Nunca |
| <i>Portulaca oleracea</i> | <i>Portulacaceae</i> | Ausência |
| <i>Senecio vulgaris</i> | <i>Compositae</i> | Por vezes |
| <i>Solanum dulcamara</i> | <i>Solanaceae</i> | Por vezes |
| <i>Solanum nigrum</i> | <i>Solanaceae</i> | Quase sempre |
| <i>Solanum subglabratum</i> | <i>Solanaceae</i> | Por vezes |
| <i>Urtica urens</i> | <i>Urticaceae</i> | Por vezes |

Finalmente, um aspecto que poderá condicionar a classificação de certas espécies espontâneas como hospedeiros alternativos será a sua presença no campo durante o ciclo vegetativo do hospedeiro cultivado e fora deste período, conforme detectaram Pradhanang *et al.* (2000). Embora muitas plantas tenham sido colhidas durante o Inverno, a maior parte das plantas foram analisadas laboratorialmente durante o referido ciclo vegetativo. Uma observação mais profunda das várias espécies presentes ao longo de todo ano e a sua

análise laboratorial permitiriam, certamente, monitorizar melhor o contributo de algumas espécies e detectar novos hospedeiros.

3.4.2.5 | Solo

Ralstonia solanacearum parece entrar no habitat solo de três formas distintas (Van Elsas *et al.*, 2000): através do exsudado bacteriano emergente dos gomos dos tubérculos de batateira, no interior de uma matriz protectora de polissacáridos; via água de rega contaminada ou águas de drenagem de campos contaminados; através da utilização de maquinaria infestada, encontrando-se para os diferentes casos, as células bacterianas em estados fisiológicos muito distintos. De um modo geral é de esperar que na Europa, e em particular em Portugal, os contributos dados pelas três vias existam, embora a importância de cada via possa depender dos sistemas de agricultura em vigor.

O nível de incidência da doença do pus ou mal murcho parece estar directamente relacionado com as concentrações das populações de *R. solanacearum* no solo. O nível de infestação dos solos far-se-á notar sobretudo quando as variedades plantadas ou semeadas, em se tratando de viveiros de tomateiro, forem menos susceptíveis (moderadamente resistentes) e podem-se expressar através do número de dias necessários para atingir um nível de incidência da doença de 50% (Michel *et al.*, 1996).

Verifica-se grande dificuldade na recuperação da bactéria a partir de solos, a qual aumenta após final do ciclo cultural do hospedeiro. Em 1999, a colheita de amostras de solos, provenientes de parcelas contaminadas no ano de 1995, revelou a incapacidade de recuperar *R. solanacearum* a partir de solos contaminados há cerca de quatro anos (Tabela 3.11).

Tabela 3.11 – Parcelas de diferentes regiões infectadas com *Ralstonia solanacearum* no ano de 1995 para as quais se procedeu à análise de amostras de solo no ano de 1999, e respectivo resultado da análise laboratorial.

| Região | Número de parcelas | Resultado da análise laboratorial |
|------------------|--------------------|-----------------------------------|
| Ribatejo-e-Oeste | 8 | - |
| Beira Litoral | 13 | - |
| Trás-os-Montes | 6 | - |

Por outro lado, observa-se que, em certos casos, a doença se concentra em manchas e não prolifera por toda a parcela devido a determinados factores como a orografia do terreno ou o seu pH.

A bactéria sobrevive no solo entre culturas de plantas susceptíveis, bem como nos resíduos dessas culturas, incluindo tubérculos com infecções latentes que permanecem abandonados no terreno (Graham & Loyd, 1978).

Os resultados de um ensaio preliminar, instalado na estação de quarentena da DGPC em Oeiras, permitiram averiguar a capacidade de sobrevivência de *R. solanacearum* em solos com diferentes características e na presença de plantas de tomateiro, em condições climáticas próximas das condições ótimas à infecção, e verificar a interacção entre o tipo de textura do solo e algumas das suas características físico-químicas, nomeadamente entre o pH e o teor de cálcio disponível (ppm).

Dos três solos estudados, apresentando diferentes características físico-químicas (Tabela 3.12), foi possível obter plantas com sintomas característicos de mal murcho em apenas dois (10 TRO e 12 TRO).

Tabela 3.12 – Relação entre as características físico-químicas dos solos utilizados e a presença de sintomas da doença do mal murcho causada por *Ralstonia solanacearum*.

| Solo | Textura | Ca (ppm) | pH | Sintomas |
|--------|-----------|----------|-----|----------|
| 10 TRO | Grosseira | 1222 | 6,7 | Presença |
| 11 TRO | Grosseira | 330 | 4,6 | Ausência |
| 12 TRO | Fina | 1260 | 5,1 | Presença |

Enquanto no solo 12 TRO (proveniente da região de Benavente), de textura fina (argiloso) e pH ácido, começaram a surgir sintomas de mal murcho poucas semanas após início do ensaio, no solo 10 TRO (originário da Nazaré), de textura grosseira e pH próximo do neutro, as plantas só mostraram sintomas visíveis de murchidão após 14 semanas.

As plantas do solo 12 TRO começaram a morrer cerca de um mês após a plantação tendo, três meses após implantação do ensaio, ocorrido mais de 60% de mortes relativamente ao número total de plantas instaladas. O número de mortes aumentou ainda quando as plantas começaram a produzir frutos, como resultado da maior necessidade de translocação de seiva, obviamente afectada pela obstrução dos feixes vasculares provocada pela bactéria.

Por outro lado, o controlo das condições ambientais, com temperaturas próximas das existentes em pleno campo nos meses de Verão, ou seja, temperaturas elevadas, de um modo geral superiores a 25°C, mostrou-se também favorável à progressão da doença.

No caso do solo 10 TRO, embora o pH pareça ser mais favorável à proliferação de *R. solanacearum*, a sua textura mais grosseira é, segundo a literatura da especialidade, menos favorável à sobrevivência deste organismo.

O solo 11 TRO (Montijo), onde não se verificaram quaisquer mortes, é particularmente ácido, possui textura grosseira e um teor em cálcio muito baixo. Todos estes factores parecem ser desfavoráveis à sobrevivência da bactéria e, associados, poderão ser importantes no controlo da doença. Na verdade, apesar deste solo ter sido irrigado com água contaminada por *R. solanacearum* durante o Verão de 99, surgiram apenas pequenos focos da doença no campo que não atingiram outros locais da parcela afectada.

Assim, numa primeira análise, poderá concluir-se que as estirpes de *R. solanacearum* que infestam estes solos são particularmente favorecidas por solos de textura fina e com elevado teor de cálcio. Além destes, outros factores poderão também condicionar a manifestação da doença, tais como a riqueza em flora antagonista.

Existem referências muito díspares relativamente ao período de sobrevivência deste organismo no solo, podendo variar entre oito meses e quatro anos. No entanto, é certo que em Portugal *R. solanacearum* possui a capacidade de sobreviver no solo, por períodos de um ano, podendo as "zorras" e as plantas espontâneas desempenhar um papel fundamental nesta sobrevivência. Esta conclusão foi obtida por resultados retirados por monitorização de algumas parcelas infestadas ao longo de vários anos. Diferentes factores parecem condicionar essa sobrevivência, nomeadamente pH, humidade, temperatura, textura, estrutura e profundidade do solo, e fauna e flora autóctones por mecanismos de predação, antagonismo e competição. A persistência deste organismo no solo pode também ser condicionada pelos sistemas agrícolas utilizados e pelas estratégias adaptativas que *R. solanacearum* consegue desenvolver em condições potencialmente adversas.

A persistência de *R. solanacearum* é particularmente afectada nas camadas superiores do solo onde a sua população decresce progressivamente. A detecção de formas cultiváveis é prevacente em associação com material vegetal ('zorras', plantas espontâneas e resíduos das culturas). Por outro lado, não pode ser descartado o contributo das camadas mais profundas do solo onde este organismo poderá sobreviver associado às partículas de solo, desde que haja humidade suficiente, como se verificou em solos tratados com glifosato, que permanecem sem plantas espontâneas, por um período mais ou menos prolongado. Em solos descobertos, *R. solanacearum* é preferencialmente afectada pela comunidade microbiana do solo, parecendo defender-se, com maior sucesso, em solos de textura mais fina, escudando-se mais facilmente à predação dos protozoários (Van Elsas *et al.*, 2000).

No que se refere ao factor humidade, uma variação moderada nestas características parece não afectar de forma evidente a população residente de *R. solanacearum*, enquanto uma situação de secura extrema faz decrescer drasticamente a viabilidade populacional, devido possivelmente a um grande aumento da tensão da matriz e redução da película aquosa necessária à sobrevivência das células (Van Elsas *et al.*, 2001). Pelo contrário, elevadas pluviosidades poderão ser também condicionantes da sua dispersão no próprio campo, promovendo essa dispersão sobretudo quando a incidência da doença é reduzida (transmissão horizontal). Uma rápida desidratação do solo levaria a um perda irreversível da sua capacidade de crescimento em meio de cultura. A evolução para o estado VBNC foi

constatada pelo decréscimo do número de células isoladas em meio de cultura, relativamente aos valores encontrados por métodos de detecção directa como IF e FISH (Timmis-Wilson *et al.*, 2001).

A temperatura do solo parece também condicionar em grande medida a sobrevivência da bactéria neste habitat. Van Elsas *et al.* (2001) observaram um decréscimo da população viável deste organismo à medida que a temperatura decrescia (temperaturas próximas dos 4°C), ao mesmo tempo que ocorria um aumento das suas populações VBNC. Temperaturas inferiores a zero °C (-1,5°C), promotoras da formação de cristais de gelo, favorecem ainda mais o decréscimo da população, provavelmente pelos danos causados ao nível das membranas das células bacterianas.

A interacção entre a humidade e a temperatura dos solos condiciona a dinâmica e a sobrevivência das populações de *R. solanacearum* e é independente do tipo de solo (Prasanna *et al.*, 2006). A sua sobrevivência é muito favorecida para valores de humidade do solo próximos da capacidade de campo, independentemente do seu tipo, para um período até um ano. A sobrevivência deste organismo parece também não ser afectada neste período para valores de temperatura entre os 30 e os 35°C, decrescendo para valores de temperatura acima dos 45°C. Por outro lado, valores de temperatura do solo próximos dos 20°C não prolongam a viabilidade de *R. solanacearum*.

Os valores extremos de temperatura e de desidratação por períodos prolongados a que estão sujeitas as estirpes de *R. solanacearum* durante os meses de verão, sobretudo nas regiões do Alentejo, parecem muito desfavoráveis à manutenção deste organismo. Granada & Sequeira (1983) e Hayward (1991) referem a sua persistência em associação com plantas infectadas ou contaminadas, bem como na rizosfera de infestantes hospedeiras ou em níveis mais profundos do solo. Inversamente, a textura dos solos, muito deles argilosos, poderá permitir a sua manutenção em camadas mais profundas, onde as amplitudes térmicas são inferiores, dada a grande capacidade que estes solos têm de armazenar e reter água.

3.4.2.6 | Unidades de processamento industrial de tubérculos de batateira, tomate e pimento

A análise dos resultados obtidos no diagnóstico destas amostras mostra a impossibilidade de constatar a fiabilidade obtida através dos diferentes métodos utilizados (Capítulo 2, 2.4.2.2). Na verdade, existe o risco de alguns dos resultados obtidos poderem corresponder a falsos negativos e de existir o risco efectivo de contaminação de águas e de solos pelos resíduos provenientes destas instalações. Este mesmo problema é também comum a outros países da Europa, uma vez que não existem outros métodos mais adequados à análise laboratorial deste tipo de resíduos. O projecto comunitário SMT-4-CT97-2179 deu alguma atenção a este tipo de substratos, no entanto, os resultados alcançados não vieram melhorar significativamente a qualidade do diagnóstico.

Obtiveram-se assim alguns resultados positivos, confirmando-se o seu contributo para a manutenção da bactéria. Das 108 amostras constituídas por resíduos sólidos e líquidos de unidades industriais de transformação de tubérculos de batateira, tomate e pimento, detectou-se e identificou-se a presença de *R. solanacearum* em cinco amostras, quatro de resíduos líquidos e uma de resíduos sólidos.

Aqueles resíduos eram destinados a tratamento em ETAR ou escoados com destino às águas fluviais ou a valas de rega. De salientar também que certas unidades industriais ainda não possuem qualquer ETAR, o que pode agravar a contaminação de campos de cultura e de cursos de água. Por outro lado, uma das amostras era mesmo constituída pelo resíduo sólido já resultante do tratamento da ETAR dessa unidade de transformação, e que se destinava a ser escoado para uma vala de rega, pondo assim em causa o contributo dado pelas ETAR relativamente à sua eficiência na eliminação de *R. solanacearum*. Esta ineficiência das estações de tratamento de resíduos tem também sido constatada noutros países. No que diz respeito ao exemplo Holandês, em 1996 constatou-se que em alguns casos este organismo era detectado em águas superficiais colhidas nas proximidades destas estações, levantando a suspeita de que poderia escapar ao processo de tratamento. Verificou-se também que as águas superficiais contaminadas por esta via infectaram posteriormente campos de produção de batata-semente (Janse *et al.*, 1998; McHugh *et al.*, 2006).

No caso dos resíduos sólidos há ainda a considerar, em certos casos, o seu transporte para campos de cultivo, onde funcionarão como fertilizantes.

Apesar de ser reduzido o número de amostras onde se identificou a presença de *R. solanacearum*, uma vez que os métodos de diagnóstico disponíveis não permitem obter resultados analíticos satisfatórios, não poderá excluir-se o papel destas indústrias de transformação que poderão possuir uma importância mais relevante como repositório deste organismo no ambiente.

3.4.3 | Análise da curva de progressão da doença em tomateiro (Estudo de Caso)

No que diz respeito à progressão da doença do mal murcho num campo de tomateiro de ar livre de uma área de regadio com solo naturalmente infestado, resultante da presença de hospedeiros cultivados e de reaga com águas superficiais contaminadas em anos anteriores, os resultados de um pequeno ensaio efectuado na região de Muge, em 2001, revelaram alguns dados de interesse.

A situação relatada é em tudo semelhante ao que se tem vindo a passar em muitos perímetros de rega, onde se procede à produção de tomate para indústria em condições climáticas idênticas.

Os resultados obtidos poderão não ser totalmente conclusivos por não ter sido possível efectuar leituras sobre a incidência da doença exactamente até final do ciclo vegetativo da

cultura, quando se procedeu ao efectivo levantamento do ensaio. No entanto, a recolha de dados efectuada até duas semanas após o início da maturação foi de tal modo informativa que se decidiu proceder à sua apresentação neste capítulo, por revelar dados de natureza epidemiológica que nos parecem importantes.

Assim, as 11 observações efectuadas entre o trigésimo dia após implantação do ensaio (observação das primeiras plantas com sintomas) e o septuagésimo primeiro dia (plena maturação dos frutos) mostraram que os níveis de incidência da doença atingiam já os 71% para a zona A (cultura de tomateiro no ano anterior) e os 59% para a zona B (cultura não hospedeira no ano anterior). Seria de esperar que estes níveis de incidência tendessem agora a crescer mais moderadamente, uma vez que tinham já sido ultrapassadas as fases de frutificação e de maturação das plantas, e que são normalmente as mais críticas no que diz respeito à proliferação da doença. De referir também que, na área correspondente à zona A do ensaio, se haviam verificado níveis de incidência da doença na ordem dos 90% na cultura de tomateiro aí instalada no ano anterior.

A análise comparativa das zonas A e B permitiu verificar que na zona B os primeiros sintomas começaram a surgir cerca de 5 dias após os primeiros casos de doença da zona A, e que no início da fase de maturação a mortalidade das plantas era inferior em 11% para a zona B. Já em plena maturação, fase em que se procede à colheita dos frutos para transformação industrial e data da última amostragem efectuada, a diferença de mortalidade entre as duas zonas era de 12%, revelando já um indício de fraca progressão da doença e portanto de alguma estabilidade do processo epidemiológico.

A utilização de modelos integrais explicativos da relação entre intensidade da doença e/ou perdas de produção mostra-se particularmente adequado à explicação da progressão ou epidemiologia da doença em determinadas condições. Embora, segundo Campbell & Madden (1990), os modelos de ponto crítico e de pontos múltiplos possam ser fidedignos para muitos pato-sistemas por existir uma elevada autocorrelação entre a intensidade da doença e o tempo, os modelos integrais mostram-se mais robustos por reunirem os valores de intensidade da doença ao longo do tempo, ou seja, durante o processo epidémico (Madden & Nutter, 1995). Essa integração é conseguida pelo cálculo da área sob a curva de progressão da doença ('area under disease progress curve' - AUDPC).

As curvas de progressão da doença para ambos os casos encontram-se representadas na Figura 3.9.

Verifica-se assim uma redução de 20% na área sob a curva de progressão da doença quando se compara a zona B com a zona A. Esta diferença deve-se ao facto de as duas zonas se encontrarem em situações distintas no que diz respeito ao nível de infestação do solo. Enquanto a zona A tinha albergado a cultura de tomateiro, a qual tinha sido irrigada com águas superficiais infestadas no Verão do ano 2000, a zona B tinha albergado uma cultura não hospedeira mas igualmente sujeita a rega com águas superficiais contaminadas. Assim, o efeito depressivo na incidência da doença na zona B do ensaio realizado em 2001 deveu-se essencialmente à ausência do hospedeiro tomateiro. Por outro lado, o nível de incidência da

doença na zona B explica-se pela sobrevivência de *R. solanacearum* veiculada pela água de rega em 2000 e mantida no solo na rizosfera de hospedeiros alternativos, nomeadamente de plantas espontâneas identificadas nessa parcela como *Solanum nigrum*, *S. sublobatum*, *Datura stramonium*, *Portulaca oleracea*, *Senecio vulgaris* e *Polygonum arenastrum*.

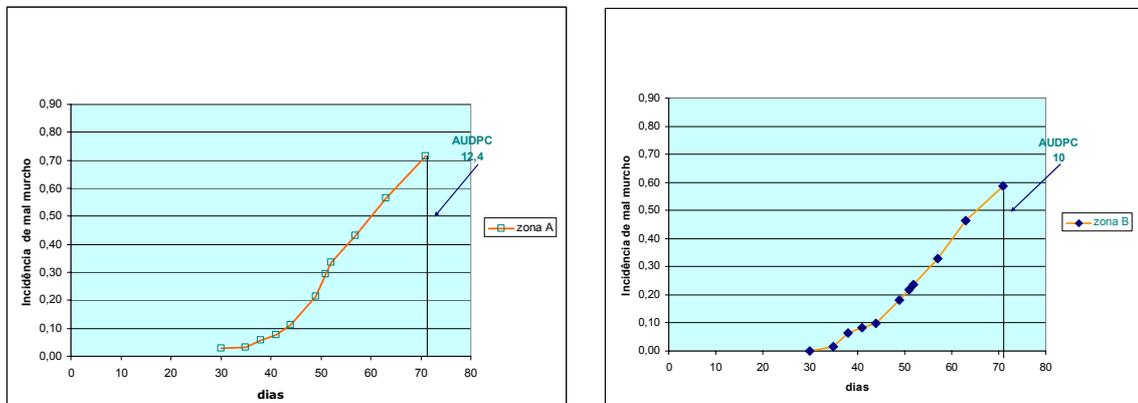


Figura 3.9 – Curvas de progressão de mal murcho do tomateiro num campo destinado à produção de tomate para transformação industrial. Áreas sob a curva de progresso da doença (AUDPC) em duas situações distintas (zona A e zona B).

Este efeito depressivo de 20% na incidência da doença devido a um ano de ausência de hospedeiros cultivados parece pôr em causa o período de quarentena de quatro anos preconizado pela legislação em vigor. Efectivamente, na ausência de outros factores que promovam o decréscimo dos níveis de inóculo do solo, como por exemplo a remoção de plantas espontâneas frequentemente hospedeiras de *R. solanacearum*, esse período de quatro anos parece não ser suficiente. Acresce-se ainda a necessidade de um intervalo de segurança, que iria prolongar ainda mais esse período de quarentena. Outro factor que não convém esquecer é a possibilidade de se proceder à utilização de águas superficiais contaminadas na rega de culturas não hospedeiras, situação que se verifica em alguns aproveitamentos hidroagrícolas e que é em tudo semelhante à situação da zona B do ensaio. Esta análise lança novas preocupações relativamente à eficácia das medidas de erradicação a tomar.

Os resultados aqui obtidos para esta parcela revelam também a necessidade de se proceder a um estudo mais aprofundado, disperso por parcelas constituídas por diferentes tipos de solos e sujeitas a diferentes condicionalismos climáticos. Apesar de, à partida, infecções naturais causadas por uma transmissão horizontal deste tipo virem a ter origem em estirpes de *R. solanacearum*, os resultados a obter poderão ser claramente distintos. Estudos efectuados por Silveira *et al.* (1998) numa região do estado brasileiro de Pernambuco mostraram níveis de incidência e curvas de progressão da doença muito distintos.

No que diz respeito à validação do ajustamento de alguns modelos matemáticos relativamente ao modo de progressão da doença numa cultura de tomateiro de ar livre, a transformação dos dados relativos à proporção de plantas doentes (apresentando sintomas visíveis de mal murcho e confirmadas por diagnóstico laboratorial) comparativamente aos

dados não transformados e a verificação da sua validação no que diz respeito a critérios de precisão (R^2) e do rigor do ajustamento (C_b) encontram-se na Tabela 3.13.

Tabela 3.13 – Avaliação do ajustamento de três modelos para descrever a progressão da doença do mal murcho e para estimar a taxa de progresso da doença (r) num campo de tomateiro ao ar livre na região de Muge.

| Zona | Modelo | R^2 | C_b | r_c | R (Und./dia) |
|------|---------------|--------|---------|----------|--------------|
| A | Monomolecular | 0,9697 | 0,87942 | 0,866001 | 0,0300 |
| | Gompertz | 0,9930 | 0,54864 | 0,546729 | 0,0640 |
| | Logístico | 0,9348 | 0,27269 | 0,263647 | 0,1196 |
| B | Monomolecular | 0,9842 | 0,9336 | 0,926182 | 0,0214 |
| | Gompertz | 0,9693 | 0,52421 | 0,516099 | 0,0544 |
| | Logístico | 0,8625 | 0,2412 | 0,224001 | 0,1130 |

Os valores do coeficiente de determinação (R^2), que mede a precisão de determinado modelo, bem como os valores do coeficiente de correcção dos enviesamentos (C_b) e da correlação da concordância (r_c) mostram que o modelo que melhor se ajusta à progressão da doença em pleno campo tanto para a zona A, onde se parte de um nível de infestação mais alto, como para a zona B, é o modelo monomolecular. Este modelo foi também o que se ajustou melhor para a progressão da doença do mal murcho do tomateiro em algumas regiões do Estado de Pernambuco, no Brasil, conforme descrevem Silveira *et al.* (1998), embora para outros locais, onde a doença apresentava níveis de incidência muito diferentes, os modelos de Gompertz e Logístico apresentassem melhores valores dos coeficientes de determinação.

Para o modelo monomolecular, e no que diz respeito à taxa de progressão da doença, esta parece estar dependente do nível inicial de infestação do solo uma vez que para a zona A essa taxa foi de 0,03 e para a zona B foi de 0,0214 plantas/dia.

Bergamin Filho & Amorim (2002) postularam que no caso das doenças em que não era possível detectar a data exacta da infecção, uma vez que a expressão dos sintomas nas plantas seria apenas dependente do seu estado fenológico, a doença pode manter-se num estado latente por um período maior ou menor de tempo. Tal como acontece neste caso, a progressão deverá seguir um crescimento do tipo monomolecular, independentemente de se tratarem de doenças monocíclicas ou policíclicas, por estes aspectos possuírem pouca relevância na sua dinâmica temporal. Neste caso, trata-se efectivamente de uma infecção monocíclica decorrente da presença de inóculo no solo e cuja taxa de progressão dependia apenas do nível de incidência da doença, decrescendo à medida que esta se aproxima dos valores máximos ou da capacidade de suporte do ecossistema. A irrelevância da determinação da data de infecção tinha já sido também constatada por Campbell & Madden (1990) e por Madden & Nutter (1995) que se referiam à fidedignidade deste modelo para descrever a progressão de doenças monocíclicas.

A aplicação destes modelos permite quantificar de forma mais objectiva os prejuízos causados por determinada doença e estabelecer programas de controlo e erradicação eficazes (Bergamin Filho & Amorim, 1996). Por outro lado, e neste caso em particular, tendo em conta que a data em que ocorre a infecção ou contaminação passa despercebida, que a progressão da doença após detecção dos primeiros sintomas é rápida, e que os prejuízos à data da colheita, e em anos posteriores, como consequência do nível de intensidade da doença (70 a 90%) e da imposição de um período de quarentena mais ou menos alargado, podem ser elevadíssimos, os dados agora obtidos, embora preliminares, podem ser usados para sensibilizar os agricultores e minorar os prejuízos decorrentes de uma utilização indevida e sucessiva de campos infestados e de águas superficiais contaminadas.

3.5 | Discussão Global

Janse (1996) descreve pormenorizadamente, à luz dos conhecimentos existentes nessa época, a epidemiologia da doença do pus ou mal murcho nos países da Europa Ocidental, comparando os surtos de *R. solanacearum* aos da cólera, por terem uma origem algo semelhante no que se refere aos seus agentes causais e meios de disseminação. Nos últimos anos houve alguma evolução dos conhecimentos referentes à biologia deste organismo, introduzindo-se a noção de células VBNC, identificando-se novas espécies hospedeiras cultivadas e espontâneas, e detectando-se possíveis veículos de disseminação.

No que se refere à epidemiologia da doença do pus ou mal murcho em Portugal esta poderá ser, de certo modo, condicionada pelas características edafo-climáticas prevalentes e pelos sistemas de produção agrícolas existentes. Aquele autor particulariza as condições em que a cultura do tomateiro pode ser contaminada e que são muito comuns no Sul da Europa, ao contrário do que se verifica nos países ocidentais do Norte da Europa.

Deste modo podem-se retirar algumas conclusões relativamente às especificidades da sobrevivência e disseminação de *R. solanacearum* em Portugal e que resultam da análise dos dados e estudos anteriormente descritos.

Assim, os factores ou alvos que mais parecem contribuir para a manutenção e disseminação de *R. solanacearum* são aqueles onde a sua incidência mais se faz notar, nomeadamente, a cultura do tomateiro, as águas superficiais contaminadas das áreas de regadio, o solo, os hospedeiros alternativos, os efluentes das indústrias de transformação, e por último, com menor importância, a cultura da batateira.

R. solanacearum está estabelecida nos cursos de água dos principais aproveitamentos hidroagrícolas em Portugal encontrando-se, portanto, amplamente dispersa em termos geográficos e com níveis de incidência que se têm vindo a agravar. Nestes ecossistemas é possível recuperar este organismo a partir de águas superficiais entre os meses de Março e Novembro, sendo prevalente no mês de Abril em relação aos restantes meses do ano, e

daí decorrendo um risco acrescido de utilização destas águas em áreas de regadio de culturas solanáceas. Estes factos parecem encontrar-se relacionados com as temperaturas das águas, sendo maior a prevalência de *R. solanacearum* quando as temperaturas se apresentam mais amenas (15-20°C). Acima dos 22°C o risco de utilizar águas superficiais parece decrescer. O facto de a temperatura destas águas se situar acima dos 13°C durante a maior parte do ano, e deste organismo se manter presente e activo, para a generalidade das áreas contaminadas, entre a Primavera e o Outono, traduz-se na inexistência de diferenças significativas no que diz respeito ao risco de contaminação de culturas solanáceas de Primavera-Verão vs. Outono-Inverno.

A presença, nestas áreas, de *S. dulcamara*, planta rípicola espontânea e hospedeira de *R. solanacearum*, contribui para a sua manutenção e dispersão embora o seu contributo pareça ser menos importante do que aquele que lhe é atribuído noutros países da Europa ocidental.

As influências climáticas Atlânticas próprias das regiões do litoral Centro e Norte, de clima mais ameno, favorecem a manutenção e dispersão de *R. solanacearum* nas bacias hidrográficas. Por outro lado, as características climáticas de influência Mediterrânica nas áreas irrigadas mais a Sul, com maiores amplitudes térmicas, parecem condicionar de forma perceptível este veículo de transmissão tornando-o menos eficiente.

Enquanto noutros países do Norte da Europa se verificou existir uma estrita relação entre a contaminação das águas superficiais e efluentes não tratados provenientes das indústrias de processamento de solanáceas, em Portugal poderão existir, quanto a nós, razões distintas dependendo da região. Para a região mais a Norte a lexiviação a partir de solo infestado e a presença de *S. dulcamara* parecem ser mais relevantes, enquanto que nas áreas mais a Sul a presença de grande parte das indústrias de transformação poderá ser um contributo mais preponderante.

Também em Portugal, a existência de sistemas de produção agrícolas baseados na monocultura de solanáceas (batateira e tomateiro) permitirá um aporte e uma manutenção mais prolongada de populações de *R. solanacearum* nas águas superficiais por lexiviação a partir daquelas culturas, se infectadas. Por outro lado, e dada a sua elevada prevalência nestas águas, a falta de limpeza da vegetação existente nos sistemas de valas de rega tem contribuído para a manutenção deste organismo na ausência de hospedeiros cultivados.

A contaminação das culturas solanáceas batateira e tomateiro tem ocorrido sobretudo pelo uso de águas infestadas na sua irrigação, mas a contribuição das duas espécies para a manutenção e dispersão de *R. solanacearum* é muito diferente. Efectivamente a doença mostra ser rara, quer em tubérculos de batateira destinados ao consumo, quer em lotes propostos para certificação de batata-semente, onde tem apresentado uma incidência nula nos últimos anos.

No que diz respeito à contaminação de campos de batateira para produção de tubérculos destinados ao consumo é notória a sua prevalência em áreas de regadio com águas

superficiais invariavelmente infestadas. Já no caso do tomateiro, a doença mostra-se mais frequente e pode atingir níveis de incidência de 90% em campos de produção de tomate para transformação industrial. A progressão da doença nesta situação parece depender sobretudo do nível de infestação do solo, progredindo quase linearmente até à fase de maturação dos frutos, altura em que a taxa de progresso começa a decrescer, por ser afectada pelo nível de incidência que a doença atingiu e pela capacidade de sustentação do ecossistema.

Um aspecto da maior importância refere-se ao facto de nas condições climáticas prevalentes em Portugal, e ao contrário do que se passa noutros países da Europa, ocorrerem condições favoráveis à expressão dos sintomas da doença nos hospedeiros cultivados, que se tornam visíveis em estados fenológicos dos hospedeiros mais avançados. Existem também algumas 'nuances', sobretudo no que diz respeito à menor produção de exsudado bacteriano para a maior parte dos hospedeiros, em virtude de a humidade relativa do ar, por ser inferior, vir a condicionar essa produção.

A ausência de hospedeiros cultivados por períodos mais ou menos longos produz um efeito depressivo na progressão da incidência da doença, atrasando o aparecimento dos primeiros sintomas e reduzindo os níveis de incidência da doença, que em situações particulares poderá ser maior ou menor, com implicações na manutenção, dispersão e erradicação de *R. solanacearum*.

As plantas espontâneas têm também um papel fundamental na manutenção deste organismo entre nós, tanto aquelas já identificadas como hospedeiros alternativos como outras ainda não descritas noutros países, e cujo contributo como reservatórios de *R. solanacearum* parece ser distinto e dependente da sua predominância nas nossas condições climáticas.

Efectivamente, *S. nigrum* parece possuir uma importância acrescida na sobrevivência deste organismo relativamente a *S. dulcamara*, mais importante nos países do norte da Europa, e a sua presença constituirá por isso um risco acrescido para a sua manutenção. Deve salientar-se também o papel primordial que as 'zorras' parecem desempenhar na sobrevivência de *R. solanacearum*. Outras espécies espontâneas que poderão albergar *R. solanacearum* são *Capsella rubeolla*, *Chenopodium album*, *Cynodum dactylon*, *Datura stramonium*, *Polygonum arenastrum*, *Portulaca oleracea*, *Senecio vulgaris*, *S. sublobatum* e *Urtica urens*. Também a espécie cultivada *Citrullus lanatus* (melancia) pode constituir um hospedeiro alternativo na manutenção deste agente fitopatogénico. Nem sempre estas plantas apresentam sintomas da doença, comportando-se como hospedeiros assintomáticos, por comportarem baixos níveis populacionais, que dão origem a infecções latentes e sobrevivem até ao próximo ciclo cultural do hospedeiro cultivado.

A bactéria sobrevive no solo por períodos de um ano nas condições climáticas prevalentes em Portugal, mas poderão existir dúvidas relativamente à duração desse período, pelo elevado contraste das características edafoclimáticas existentes no litoral Norte ou no interior do Alentejo. Solos com textura fina e um teor de cálcio mais elevado parecem favorecer a progressão da doença, mas existem outros factores como a orografia, o pH e as amplitudes

térmicas, muito distintos nestas áreas, e que serão também condicionantes a considerar. A reduzida progressão da doença parece ser explicada, em alguns casos, pelo pH particularmente ácido dos solos de certas áreas em que este fenómeno se observa.

No solo inicia-se e encerra-se o ciclo epidémiológico de *R. solanacearum* em Portugal, com a contaminação inicial dos solos por tubérculos infectados e/ou águas superficiais contaminadas, pela sua manutenção em hospedeiros cultivados e alternativos ou na rizosfera de plantas não hospedeiras, comportando-se como um reservatório e, finalmente, pelo seu contributo com veículo de dispersão deste organismo através do seu próprio esvaziamento como consequência do processo de lixiviação ou do fluxo lateral de águas de drenagem.

A colheita de frutos e tubérculos com infecções latentes e destinados ao processamento industrial parece ser também responsável, no nosso país, de forma mais ou menos notória para a contaminação de águas e de campos, através do seu contributo como veículo de *R. solanacearum* em efluentes líquidos e sólidos não sujeitos a qualquer tratamento prévio a ou tratamentos pouco eficientes. Embora algumas unidades industriais possuam estações de tratamentos de resíduos mais sofisticadas, existem outras, de cariz mais artesanal, onde este risco potencial continua a subsistir.

3.6 | Referências Bibliográficas

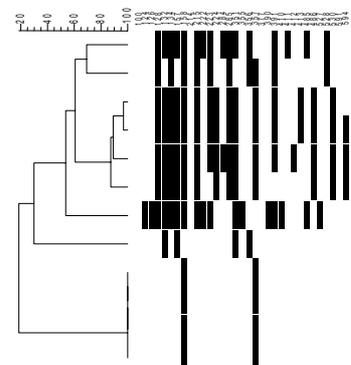
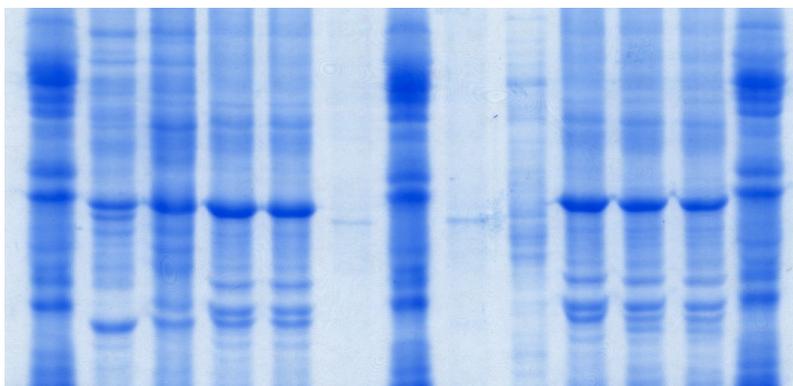
- Alvarez B, Biosca EG & López MM. 2006. River water biota affecting *Ralstonia solanacearum* survival: characterization of specific bacteriophages and its potential use for biocontrol in irrigation water. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Bergamin Filho A & Amorim L. 1996. *Doenças de Plantas Tropicais: Epidemiologia e Controle económico*. Editora Agronômica Ceres Ltda, São Paulo, 289p.
- Bergamin Filho A & Amorim L. 2002. Doenças com período de incubação variável em função da fenologia do hospedeiro. *Fitopatologia Brasileira*. **27**:561-565.
- Bliss K, Mansfield JW, Elphinstone J & Thwaites R. 2006. Adaptation of *Ralstonia solanacearum* to temperate conditions. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Breukers A, Kettenis DL, Mourits M, van der Werf W & Oude Lansink A. 2006. Individual-based models in the analysis of disease transmission in plant production chains: an application to potato brown rot. *Agricultural Systems* **90**:112-131.
- Campbell CL & Madden LV. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. Wiley, New York. 532 pp..
- Caruso P, Palomo JL, Bertolini E, Álvarez B, López MM & Biosca EG. 2005. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a spanish river: recovery of stressed cells at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:140-148.
- Coutinho TA. 2005. Introduction and Prospectus on the Survival of *R. solanacearum*. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- DGPC. 1998. Plano de Luta Contra *Ralstonia solanacearum*. Direcção-Geral de Protecção das Culturas, Lisboa, Portugal. DGPC-DSF, PPA(DSF) 5/98, 91pp.
- Elphinstone JG, Parkinson NM, Tomlinson DL, Bew J & Stanford H. 2006. Ecology and management of the *Ralstonia solanacearum* phylotype II, sequevar 1 strain, pandemic on potato. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Elphinstone JG, Stanford HM & Stead DE. 1998. Survival and transmission of *Ralstonia solanacearum* in aquatic plants of *Solanum dulcamara* and associated surface water in England. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **28**:93-94.
- Fortnum BA & Kluepfel D. 2005. Mechanization Has Contributed to the Spread of Bacterial Wilt on Flue-Cured Tobacco. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- Gardner MJ & Altman DG. 1989. *Statistics with confidence*. British Medical Journal Publications. London, United Kingdom. p. 103-105.
- Graham J & Loyd AB. 1978. Survival of of potato strain (race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in deeper soil layers. *Australian Journal of Agricultural Research*. **30**:489-496.
- Granada GA & Sequeira L. 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere and plant roots. *Canadian Journal of Microbiology*. **29**:433-440.
- Hayward AC. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*. **27**:265-277.
- Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*. **29**:65-87.
- Hayward AC. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. p.9-24. In: Hayward AC and Hartman GL (eds). *Bacterial wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CABI, UK-AVRDC, Taiwan. 259 pp..
- Huang Q. 2006. Identification of ornamental plant species susceptible to *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Janse JD, Araluppan FAX, Schans J, Wenneker M & Westerhuis W. 1998. In: Prior P, Allen C Elphinstone J (eds). *Bacterial wilt disease. Molecular and Ecological Aspects*. Springer-Verlag. Heidelberg, Germany. P. 146-152.

- Janse JD, van den Beld, Elphinstone J, Simpkins S, Tijou-Tam-Sin LNA & van Varenbergh J. 2005. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* Biovar2, Race 3 in *Pelargonium zonale* Cuttings from Kenya. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum* Species Complex. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 510 pp..
- Janse JD. 1996. Potato brown rot in Western Europe – history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **26**:679-695.
- Kelman A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. A literature review and bibliography. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin* **99**:1-194.
- Kelman A. 1998. One hundred years of research on bacterial wilt, In: Prior P, Allen C Elphinstone J (eds). *Bacterial wilt disease. Molecular and Ecological Aspects*. Springer-Verlag. Heidelberg, Germany. p.1-5.
- López MM & Biosca EG. 2005. Potato bacterial wilt management: new prospects for an old problem. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum* Species Complex. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 510 pp..
- Madden LV & Nutter FW. 1995. Modeling crop losses at the field scale. *Canadian Journal of Plant Pathology* **17**:124-137.
- McHugh RC, van de Graaf P, Danial J, & Saddler GS. 2006. *Ralstonia solanacearum*: the risk to the Scottish seed potato industry. In: The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Messiha NAS. 2006. *Bacterial Wilt of Potato (Ralstonia solanacearum race 3, biovar 2): disease Management, Pathogen survival and Possible Eradication*. PhD Thesis Wageningen University, The Netherlands. 151 pp..
- Michel VV, Tzeng CC & Wang JF. 1996. Relationship between *Pseudomonas solanacearum* Population in Soil and Bacterial Wilt Progress in Tomato. *Aciar – Bacterial Wilt Newsletter*. **13**:6-7.
- Moffet ML & Hayward AC. 1980. The role of weed species in the survival of *Pseudomonas solanacearum* in tomato cropping land. *Australasian Plant Pathology*. **9**:6-8.
- Olsson K. 1976. Experience of brown rot caused by *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in
- Pittman HA. 1933. Bacterial wilt of tomatoes and other Solanaceous crops. *Western Australian Department of Agriculture Journal*. **10**:373-374.
- Pradhanang PM, Elphinstone JG & Fox RTV. 1998. Relative importance of latent tuber infection and soil infestation by *R. solanacearum* on the incidence of bacterial wilt of potato. p 403-409. In: Prior P, Allen C and Elphinstone J (eds) *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*. Guadaloupe, France. 447 pp..
- Pradhanang PM, Elphinstone JG & Fox RTV. 2000. Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. *Plant Pathology*. **49**:403-413.
- Pradhanang PM. 1999. Optimization of sampling method for accurate detection of *Ralstonia solanacearum* in naturally infected soil. *Bacterial Wilt Newsletter* 16:2-5.
- Prasanna MK, Kumar A, Khan ANA, Chandrashekara KN & Vani A. 2006. Studies on the ecology of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of tomato. In: The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- República Portuguesa. 1999. Decreto-Lei n.º 494/99, de 18 de Novembro, que aprova as medidas de controlo fitossanitário a adoptar, no território nacional, em relação à bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*.
- Seal SE, Jackson LA, Young JPW & Daniels MJ. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii*, and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* **139**:1587-1594.
- Sequeira L. 1994. Epilogue: life with a "mutable and treacherous tribe" In: Hayward AC and Hartman GL (eds). *Bacterial wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CABI, UK-AVRDC, Taiwan. p. 235-249.
- Silveira EB, Michereff SJ & Mariano RLR. 1998. Epidemiology of tomato bacterial wilt in Agreste Region of Pernambuco State, Brazil, in 1996/1997. In: Prior P, Allen C and Elphinstone J (eds) *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*. Guadaloupe, France. 447 pp..
- Smith J, Akoa G & Namisi S. 2006. Implementing quality systems for potato seed with farmers in Uganda: the experience of the Kapchorwa Seed Potato Producers' Association. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.

- Timmis-Wilson TM, Bryant T & Barley MJ. 2001. Strain characterization and 16-23S probe development for differentiating geographically dispersed isolates of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Environmental Microbiology*. **3**:785-797.
- Tusiime G, Adipala E, Ópio F & Bhagsari AS. 1998. Weeds as latent Hosts of *Ralstonia solanacearum* in Highland Uganda: Implications to Development of an Integrated Control Package for Bacterial Wilt. In: Prior P, Allen C and Elphinstone J (eds) *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*. Guadaloupe, France. p. 413-419.
- União Europeia. 1998. Directiva 98/57/CE do Conselho de 20 de Julho de 1998 relativa ao controlo de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. *Jornal Oficial da União Europeia* L 235 de 21/08/1998, 1 – 39.
- União Europeia. 2000. Directiva 2000/29/EC do Conselho de 8 de Maio de 2000 relativa às medidas de protecção contra a introdução na Comunidade de organismos prejudiciais aos vegetais e produtos vegetais e contra a sua propagação no interior da Comunidade. *Jornal Oficial da União Europeia* L 169 de 10/07/2000, 112pp..
- União Europeia. 2006. Directiva 2006/63/CE da Comissão de 14 de Julho de 2006 que altera os anexos II a VII da Directiva 98/57/CE do Conselho relativa ao controlo de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. *Jornal Oficial da União Europeia* L 206 de 27/07/2006, 36-106.
- Van Elsas JD; Kastelein P, van Bekkum P, van der Wolf JM, de Vries PM & van Overbeek LS. 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and in microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology* **90**:1358-1366.
- Van Elsas JD, Kastelein P, de Vries PM & van Overbeek LS. 2001. Effects of ecological factors on the survival physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Canadian Journal of Microbiology*. **47**:1-13.
- Van Elsas JD, van Overbeek LS & Trigalet A. 2005. The Viable but Non-culturable State in *Ralstonia solanacearum*: Is There a Realistic Threat to Our Strategic Concepts? In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 510 pp..
- Van Vaerenbergh J, De Paepe B, Hoedekie A & Tahzima R. 2006. Persistence and infectivity of *Ralstonia solanacearum* R3bv2 in weeds and crop rotations on a potato farm using contaminated river water In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Wakahiu MW, Gildemacher P, Kinyua ZM, Kabira JN, Kimenju AW & Mutitu EW. 2006. Status of potato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in Kenya, farmers' knowledge and control practices. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Wallace GB. 1934. Report of the mycologist for 1934. Tanganyika Dept. Agr. Ann. Rpt. For 1934. p. 90-93.
- Wenneker M, Verdel MSW, Groenveld, RMW, Kempenaar C, van Beuningen AR & Janse JD. 1999. *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: first report from stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology*. **105**:307-315.
- Winfield MO, van der Graaf P, Reid A, Saddler GS & Bryan GJ. 2006. Genetic diversity in *Solanum dulcamara* populations along Scottish rivers. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium*. Programme and Abstracts Book. York, UK.
- Zar JH. 1998. Biostatistical analysis. 3rd Edition Prentice-Hall International Editions. London, United Kingdom. 662 pp..
- Zhang YX, Hua JY & He LY. 1993. Effect of groundnut seeds on transmission of *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsletter*. **9**:9-10.

Caracterização fenética e filogenética de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos em Portugal

| | |
|-------|---|
| 4.1 | Revisitando a diversidade conhecida de <i>Ralstonia solanacearum</i> |
| 4.2 | Objectivos |
| 4.3 | Métodos experimentais e de análise de dados |
| 4.3.1 | Os Isolados |
| 4.3.2 | Estudo do perfil bioquímico para determinação do biovar |
| 4.3.3 | Estudo dos perfis electroforéticos das proteínas celulares totais |
| 4.3.4 | Estudo da diversidade genómica por BOX, ERIC e MSP-PCR |
| 4.3.5 | Estudo da diversidade genómica por FAFLP |
| 4.3.6 | Enquadramento filogenético dos isolados Portugueses |
| 4.4 | Resultados e Discussão |
| 4.4.1 | Diferenciação nutricional dos isolados |
| 4.4.2 | Análise dos perfis electroforéticos das proteínas celulares totais |
| 4.4.3 | Análise dos perfis de 'fingerprinting' obtidos por rep-PCR e MSP-PCR |
| 4.4.4 | Análise de fragmentos obtidos por FAFLP |
| 4.4.5 | Análise Fenética Global |
| 4.4.6 | Análise Filogenética de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> em Portugal |
| 4.5 | Referências bibliográficas |



4.1 | Revisitando a diversidade conhecida de *Ralstonia solanacearum*

Os organismos fitopatogénicos, incluindo *Ralstonia solanacearum*, regulados pela legislação da União Europeia, e que através dela adquiriram o estatuto de organismos de quarentena, necessitam de meios que permitam proceder à sua identificação e caracterização a nível específico e infraespecífico com elevada fidedignidade, e deste modo estabelecer em tempo útil medidas de controlo e erradicação adequadas.

A complexidade de *R. solanacearum* que é suportada pela sua sofisticação e diversidade em termos genómicos, traduz-se na sua ampla dispersão geográfica, gama de matrizes que afecta, e capacidade adaptativa a ambientes extremos.

Esta mesma complexidade genómica tem vindo a ser observada em vários estudos que permitiram a alteração da classificação taxonómica deste organismo ao nível do género e espécie e também uma caracterização da diversidade genómica a nível infra-específico.

Cerca de um quarto de século atrás, Palleroni & Duderoff (1971), ilustres co-autores do 'Bergey's Manual for Determinative Bacteriology', após o estudo de 169 caracteres fenotípicos e de hibridações inter e infra-específicas de DNA, para um conjunto de estirpes de *Pseudomonas solanacearum* (Smith 1896) Smith 1914, pertencentes aos quatro biótipos ou biovares estabelecidos por Hayward (1964), concluíram tratar-se de uma espécie moderadamente homogénea, mas apenas remotamente relacionada com outras espécies do mesmo género. Estes autores verificaram ainda a existência de algumas discrepâncias na utilização de certas fontes carbonadas, bem como algumas dificuldades nos estudos de hibridação. Surgem assim as primeiras evidências sobre a frágil classificação taxonómica deste organismo nocivo dentro do género *Pseudomonas*.

Após proposta e aceitação da criação de *Burkholderia* gen. nov. (Yabuuchi *et al.*, 1993), no qual a espécie tipo seria *Burkholderia cepacia*, processou-se à transferência de sete espécies do Grupo de homologia II de *Pseudomonas* spp., entre as quais se encontrava *P. solanacearum*.

Em 1996, Hayward refere que *P. solanacearum* mostra elevada variabilidade nas sequências do gene de 16S rRNA pelo que poderá necessitar de uma revisão taxonómica. Efectivamente, já em 1995 Yabuuchi e colaboradores tinham publicado um artigo no periódico "Microbiology and Immunology" propondo a transferências de algumas espécies dos géneros *Burkholderia* e *Alkaligenes* para o novo género *Ralstonia*, para onde este organismo foi transferido em 1996 (VP) (IJSEM, 1996), e onde se mantém desde então.

Uma vez esclarecido e aceite, sem qualquer dúvida, o estabelecimento do género *Ralstonia* e a integração entre as 15 espécies que o compõem de *R. solanacearum*, torna imperioso clarificar a classificação desta espécie para os "taxa" inferiores.

Esta espécie revela uma grande diversidade no que diz respeito à gama de hospedeiros que possui, agressividade, plasticidade na adaptação a condições climáticas muito distintas, bem

como nas características dos diversos habitats e ecossistemas agrícolas onde reside (Hayward, 1991). Gillings & Fahy (1994) referem mesmo que vários estudos baseados em abordagens distintas, realizados por diversos autores, apontam consistentemente para o facto de *R. solanacearum* ser composta por um conjunto de estirpes muito distintas.

Este conhecimento é já antigo e levou Buddenhagen *et al.* (1962) a criarem um sistema de classificação baseado na escala de hospedeiros (raças). No entanto, o sistema de raças definido para *R. solanacearum* é muito diferente do sistema de raças implementado para outras bactérias fitopatogénicas como *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ou *Pseudomonas glycinea* pv. *glycinea*, para as quais a caracterização em raças se faz pela capacidade diferenciada de causar doença entre cultivares de uma mesma espécie hospedeira (Alvarez, 2005). No caso de *R. solanacearum*, estes grupos são estabelecidos para um conjunto de hospedeiros pertencentes a espécies vegetais distintas.

Janse reorganiza aquele esquema classificativo especialmente para as raças 1, 2 e 3, através da presença e tipo de sintomas em hospedeiros indicadores como o tomateiro/beringela, plantas de tabaco da variedade 'White Burley' e *Musa acuminata* (EPPO, 2004) (Tabela 4.1). Propõe, no entanto, a substituição da determinação de raça por uma caracterização através da análise de ácidos gordos (FAME). Este autor propõe ainda a substituição do termo raça e a adopção da designação de patovar (Janse, 1991). Por outro lado, Horita & Tsuchiya (2001) fazem o estudo das raças utilizando uma gama de plantas indicadoras muito distinta.

Tabela 4.1 – Ensaios conduzidos para determinação de algumas raças de *Ralstonia solanacearum* (Fonte: Janse, 1991).

| Raça | 1 | 2 | 3 |
|---|---------------------|--------------------|-----------|
| Hospedeiro: | Tipo de sintomas | | |
| Tomateiro/beringela | Murchidão | Ausência | Murchidão |
| Tabaco cv. "White Burley" (Inoc. caule) | Murchidão | Ausência | Ausência |
| Tabaco cv. "White Burley" (Hipersens. folhas) | Necrose e murchidão | Hipersensibilidade | Clorose |
| <i>Musa acuminata</i> | Ausência | Murchidão | Ausência |

Hayward (1964) propôs uma abordagem diferente para a classificação infraespecífica, com a criação de quatro biótipos ou biovars, baseada na aptidão que os isolados de *R. solanacearum* têm para utilizar e/ou oxidar três álcoois derivados de monossacáridos (manitol, sorbitol e dulcitol), e três dissacáridos (maltose, lactose e celobiose). Ensaios adicionais permitem ainda diferenciar o biovar 2, nos subfenótipos 2A (Grupos RFLP 26 ou 27 de Cook *et al.* (1989)) e 2T ou N2 (Grupos RFLP 29, 30, 31, 32 e 33 de Cook *et al.* (1989)), que se distinguem pela utilização diferenciada de trealose, inositol e D-ribose (Hayward *et al.*, 1990; Janse, 1991 e Hayward, 1994b). Para diferenciação destes sub-fenótipos pode ainda proceder-se à determinação da intensidade da actividade pectinolítica e da capacidade

de redução dos nitratos a nitritos, embora estes ensaios por si só não sejam suficientes para a discriminação dos três subfenótipos, e em conjunto não possuam qualquer valor informativo aditivo relativamente aos ensaios supra referidos (Tabelas 4.2 e 4.3).

Tabela 4.2- Ensaios bioquímicos para determinação dos biovars de *Ralstonia solanacearum* (Fonte: Hayward, 1994b).

| Utilização de: | Biovar | | | | |
|----------------|--------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Maltose | - | + | + | - | + |
| Lactose | - | + | + | - | + |
| Celobiose | - | + | + | - | + |
| Manitol | - | - | + | + | + |
| Sorbitol | - | - | + | + | - |
| Dulcitol | - | - | + | + | - |

Tabela 4.3 – Ensaios bioquímicos para diferenciação de subfenótipos do biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* (Fonte: Hayward, 1994b).

| Subfenótipos | 2A | 2A | 2T(N2) |
|--------------------|----|----|---------|
| Grupo RFLP | 26 | 27 | 29 a 33 |
| Utilização de: | | | |
| Trealose | - | + | + |
| Inositol | - | + | + |
| D-ribose | - | - | + |
| Act. pectínolítica | - | - | + |

Esta caracterização clássica de *R. solanacearum*, tendo por base o conhecimento da sua capacidade de causar doença em diferentes hospedeiros, e a aptidão dos vários fenótipos para utilizar diferentes fontes de carbono, mostra, no entanto, enormes incongruências com falta de concordância no relacionamento entre raças e biovars. Embora, em termos práticos, a determinação do biovar possua alguma utilidade para caracterização bioquímica de estirpes e conhecimento sobre a sua versatilidade nutricional e epidemiológica (Hayward, 1994), a determinação de uma possível escala de hospedeiros bem definida perde o sentido, na medida em que o número de espécies vegetais pertencentes a diferentes géneros e famílias botânicas tem sofrido uma grande evolução continua à escala mundial. Continuamente surgem registos sobre a emergência de novas combinações biovar-hospedeiro (Prior & Fegan, 2005b; Janse *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2006). Efectivamente, dando o exemplo da raça 3, surgem frequentemente referências a novos hospedeiros pertencentes a famílias que não *Solanaceae*. Por outro lado, esta caracterização mostrou-se ainda mais errática após a utilização de técnicas biomoleculares aplicadas ao estudo daqueles grupos (biovars/raças), dando origem a grupos genómicos mais ou menos heterogéneos, e portanto, pouco coerentes à luz daqueles critérios.

Tal como para outros organismos fitopatogénicos, a caracterização infra-específica de *R. solanacearum*, utilizando ensaios de patogenicidade em diferentes hospedeiros, tem criado problemas. Deste modo, têm surgido variadas tentativas para classificar patovares e estirpes utilizando outras características do organismo, como características serológicas e quimiotaxonómicas, nomeadamente a constituição em ácidos gordos ou a determinação de perfis proteicos, entre outras.

Existem já vários estudos sobre a caracterização da constituição proteica de *R. solanacearum* e sua utilização como método de tipificação para discriminação de estirpes desta espécie. Estes estudos são baseados, quer na caracterização de proteínas membranares (Dristig & Dianese, 1990; Dianese & Dristig, 1994), quer de proteínas celulares totais (Li & Hayward, 1994; Stephani & Mazzucchi, 1997).

Relativamente aos estudos sobre proteínas membranares, aqueles autores escolheram apenas sete bandas de referência num total de 29, pelo que parte do universo de caracteres não foi considerada na análise. No entanto, foi possível efectuar a discriminação por perfis electroforéticos dos isolados dos biovars 1, 2 e 3 estudados por diferenças em três destas bandas. Contudo, quando eleitas outras bandas secundárias, considerando um total de 27 proteínas, embora a distinção entre biovars se tivesse mantido, gerou-se alguma entropia, pois isolados de um mesmo hospedeiro e de biovars distintos mostraram-se mais próximos que os isolados do mesmo biovar obtidos a partir de hospedeiros diferentes (Dristig & Dianese, 1990).

As potencialidades discriminantes dos perfis de proteínas celulares totais permitiram mesmo a Li & Hayward (1994) correlacionar os diferentes perfis proteicos de *R. solanacearum* com alguns biovars e duas divisões filogenéticas criadas por Cook *et al.* (1989).

A classificação taxonómica infra-específica de *R. solanacearum* tem também sofrido alterações marcantes como resultado da aplicação de métodos biomoleculares com elevada capacidade discriminante. Efectivamente esta estratégia tendo vindo a ser utilizada para clarificar certos problemas de classificação, originados por métodos clássicos baseados, na maior parte dos casos, em características fenotípicas e/ou de patogenicidade (Louws *et al.*, 1994).

Os primeiros estudos de caracterização da diversidade infra-específica de estirpes de *R. solanacearum*, utilizando métodos biomoleculares, foram efectuados por Cook *et al.* (1989, 1991), e visaram diferenciar e esclarecer a evolução filogenética deste complexo com base na análise de RFLP, revelando a presença de 23 grupos RFLP enquadrados em dois 'clusters' com características filogenéticas distintas (Figura 4.1).

Li *et al.* (1993), pela sequenciação da totalidade do gene de 16S rRNA de oito espécies de *Pseudomonas* pertencentes ao grupo II de homologia de rRNA, membros da subclasse β de Proteobacteria, sugeriram que *Pseudomonas solanacearum* e outras deveriam ser separadas das autênticas *Pseudomonas*. *Pseudomonas pickettii* mostrava o maior grau de homologia com *P. solanacearum*. Sugeriram ainda a criação de um género distinto para *Pseudomonas*

solanacearum, *P. pickettii* e *Alcaligenes eutrophus*. Através deste trabalho identificaram ainda dois 'clusters', um associando os biovares 1 e 2, e o outro contendo os biovares 3 e 4, confirmando por outra via os resultados obtidos por Cook *et al.* (1989).

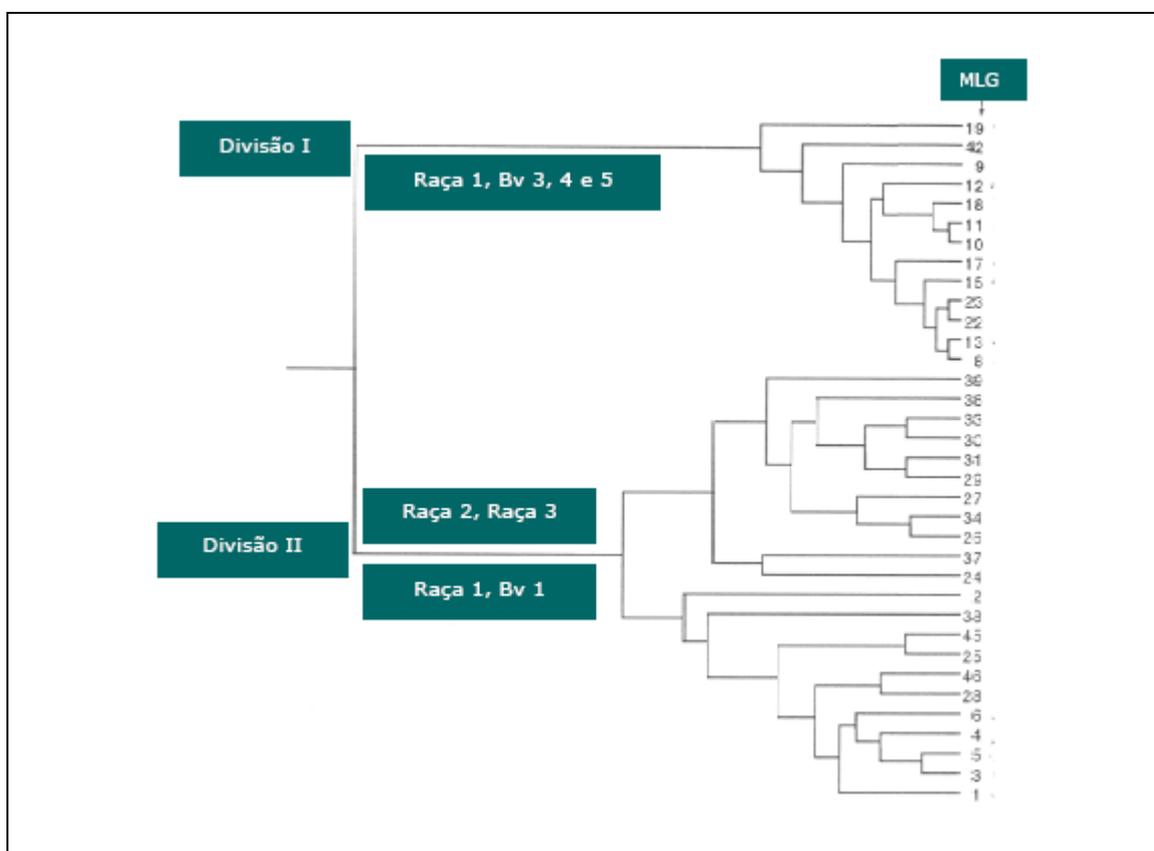


Figura 4.1 – Caracterização infra-específica de *Ralstonia solanacearum*. Relação entre o esquema classificativo em divisões criado por Cook e as características fenotípicas raça e biovar (Fonte: Cook & Sequeira, 1994).

Posteriormente, Gillings & Fahy (1994) efectuaram um estudo integrativo aplicando métodos de 'fingerprinting' a uma colecção mais ampla de isolados e esclarecendo também a localização do biovar 5 dentro das duas divisões (*sensu* Cook). Estes autores concluíram igualmente que estes biovares podem ser constituídos por grupos RFLP, e que por sua vez estes grupos poderão ainda sofrer novas divisões através de 'fingerprinting' genómico, evidenciando a existência de linhas clonais.

Outros organismos aparentemente relacionados com *R. solanacearum* mas fenotipicamente distintos, alguns com identidade algo indefinida como é o caso da BDB [*Pseudomonas celebensis*], foram também incluídos em estudos que visavam esclarecer a sua proximidade filogenética nomeadamente: *P. syzigii* (agente causal da doença do craveiro na Índia na ilha de Sumatra); BDB – 'Blood Disease Bacterium' (agente da 'Blood Disease' da bananeira que afecta certas *Musa* spp. na Indonésia); estirpes de *R. solanacearum* responsáveis pela doença 'Moko' que afecta as bananeiras (frutos de sobremesa) na America Latina e Golfo das Caraíbas; estirpes de *R. solanacearum* responsáveis pela 'Bugtok Disease' da bananeira

(frutos para cozinhar) nas Filipinas (Eden-Green, 1994; Thwaites *et al.*, 1999).

A sequenciação do gene de 16S rRNA permitiu a Taghavi *et al.* (1996) esclarecer que *P. syzigii*, BDB e os isolados de *R. solanacearum* obtidos na Indonésia faziam parte de um 'sub-cluster' da divisão 2 (*sensu* Cook), encontrando-se pois estreitamente relacionados, e integrando o complexo de espécies de *R. solanacearum*. Esta nova sub-divisão da divisão 2, embora com reduzida robustez (valores de 'bootstrap' reduzidos), integrava todos os isolados oriundos da Indonésia, que pareciam encontrar-se num processo evolutivo taquitético. Por outro lado, Fegan *et al.* (1998) esclareceram, por sequenciação dos genes da poligalacturonase e da endoglucanase, a identidade entre estirpes causadoras das doenças Moko e Bugtok, e a sua dissemelhança relativamente a BDB. Thwaites *et al.* (1999), através de RAPD e rep-PCR, propõem para BDB a criação de uma nova espécie ou subespécie dentro do complexo de espécies de *R. solanacearum*.

A caracterização de estirpes de *R. solanacearum* raça3/biovar2, obtidas no Quénia, por BOX- e ERIC-PCR (Smith *et al.*, 1995), permitiu averiguar a homogeneidade dos isolados ali obtidos e a maior variabilidade entre isolados desta raça e biovar com origem no Continente Sul Americano. Estes dados corroboram a teoria de que esta raça co-evoluiu com *Solanum* spp. e que só recentemente foi disseminada a partir da zona oriental da América do Sul, pelos navegadores Portugueses e Espanhóis, através de tubérculos com infecções latentes, sendo portanto a variabilidade superior junto do seu centro de origem (Smith *et al.*, 1995). A utilização de análise de macrorestrição (PFGE) permitiu também a estes autores um maior nível de discriminação entre estirpes. Frey *et al.* (1996) chegaram a conclusões semelhantes relativamente à utilização de PFGE, num estudo sobre a diversidade dos isolados de *R. solanacearum* obtidos das Caraíbas.

Estes dados parecem relevantes para o estudo das populações portuguesas de *R. solanacearum*, uma vez que a situação geográfica periférica do nosso país, e as relações comerciais que iniciou em tempos remotos com os continentes Americano e Africano, são muito ricas e particulares.

As estirpes de *R. solanacearum* que causam a doença do pus em batateira na Europa Ocidental parecem formar um grupo homogéneo, pertencendo ao biovar 2, subfenótipo A, grupo RFLP 26. Contudo, os resultados obtidos por AFLP e PFGE mostraram pequenas variações das estirpes estudadas a nível genómico, embora sem correlação com o hospedeiro ou origem geográfica (Van Der Wolf *et al.*, 1998). Estes estudos não permitiram, no entanto, averiguar se esta variabilidade poderá decorrer de uma adaptação a diferentes nichos ecológicos, uma vez que não foram introduzidos no estudo isolados de origem ambiental.

Relativamente às estirpes Africanas de *R. solanacearum*, o estudo por PCR-RFLP de fragmentos amplificados da região do gene *hrp*, de uma colecção de dispersão mundial composta por 120 estirpes, permitiu a Poussier *et al.* (1999) confirmarem a existência das divisões "Americanum" e "Asiaticum" (*sensu* Cook). No entanto, estirpes do biovar 1 provenientes das ilhas Reunião, Madagáscar, Zimbabué e Angola pareciam formar um

'cluster' distinto dentro da divisão "Asiaticum", com um maior nível de homologia com estirpes asiáticas dos biovares 3 e 4, tendo possivelmente sofrido um percurso evolutivo distinto das estirpes de biovar 1 Americanas. Contudo, as estirpes Africanas obtidas de países mais a Norte, nomeadamente Quênia e Burquina-Faso, agrupavam com estirpes do biovar 1, divisão "Americanum". Estes autores verificaram igualmente que existia um elevado nível de polimorfismo associado ao gene regulador *hrpB*, permitindo relacionar diversidade e patogenicidade para muitas das estirpes estudadas.

Em estudos posteriores utilizando PCR-RFLP, AFLP e sequenciação do gene de 16S rRNA, Poussier *et al.* (2000a) verificaram a existência de novos grupos ou 'clusters' inesperados dentro das divisões preconizadas por Cook *et al.* (1989), pois além da confirmação dos dados anteriormente obtidos para estirpes Africanas, que incluíram numa subdivisão 2c, mostraram a existência de duas populações distintas do biovar 1, que poderão ter o seu próprio centro de diversidade genética. Verificaram igualmente que as estirpes Japonesas do biovar 1 se mostravam atípicas, e mais próximas das estirpes dos biovares 3 e 4 da divisão "Asiaticum", o mesmo acontecendo para uma estirpe Japonesa do biovar 2T.

Com a amplificação parcial e sequenciação dos genes *hrpB* e da endoglucanase, Poussier *et al.* (2000b) reclassificaram o subcluster 2c como divisão 3, a qual integrava todas as estirpes Africanas dos biovares 1 e 2T, confirmadas como sendo claramente distintas de outras pertencentes às divisões 1 e 2, e que parecem ter sofrido um processo evolutivo autónomo.

O conhecimento sobre a predominância de estirpes dos biovares 3, 4 e 5 nos países asiáticos é já antigo (categoria infra-específica var. *asiaticum*) (Kelman, 1953). Um estudo sobre a diversidade fenotípica e genética das estirpes Japonesas de *R. solanacearum*, efectuado por Horita & Tsuchiya (2001), revela também a incapacidade de enquadrar estas estirpes dentro das divisões preconizadas por Cook *et al.* (1989) e a incongruência dos resultados obtidos para os biovares e raças asiáticos, relativamente às suas definições clássicas.

Além dos estudos sobre a diversidade dos isolados de *R. solanacearum* que temos vindo a referir, outros existem ainda que têm utilizado outras estratégias como o estudo de sequências de inserção (IS) (Lee *et al.*, 2001), FAME, FISH, RFLP-ribotipagem, ARDRA (Timmis-Wilson, *et al.*, 2001) e a utilização de RAPD (Grover *et al.*, 2006), entre outros.

Apesar da proliferação de estudos efectuados, por equipas mais ou menos extensas a nível mundial, não tem sido possível justificar algumas características taxonómicas resultantes da complexidade fenotípica e genética de *R. solanacearum*.

O uso de sequências de rRNA para proceder à classificação e identificação de organismos tem sido uma poderosa ferramenta para determinação de relações filogenéticas e evolutivas entre microrganismos (Woose, 1987; Clarridge III, 2004). No entanto, a análise comparativa de sequências do 16S rRNA revela a existência de reduzida informação filogenética para organismos muito próximos, devido à sua elevada similaridade. Taghavi *et al.* (1996) e Fegan *et al.* (1998) procederam à análise filogenética das sequências do gene 16S de rRNA, de estirpes de *R. solanacearum* e de outros organismos, verificando a elevada similaridade

das sequências deste gene, superior a 99,1%.

A classificação genérica e específica de *P. syzygii* é esclarecida por Vaneechoutte *et al.* (2004) através da sequenciação total do gene 16S rRNA e comparação com as sequências deste gene obtidas para outras espécies que compunham o género *Ralstonia*. A existência de duas sublinhagens com dissimilaridade superior a 4% (bootstrap 100%), diferenças a nível fenotípico, e novos dados sobre a hibridação DNA-DNA, sugeriram a criação de *Wautersia* gen. nov., integrando os isolados tipo das espécies pertencentes à linhagem de *R. eutropha* por um lado, e outros dentro da linhagem de *R. pickettii*, como *R. solanacearum* e *Ralstonia syzygii* (Roberts *et al.* 1990), comb. nov..

A região não transcrita entre os genes 16 e 23S encontra-se sujeita a uma pressão selectiva menor e parece por isso produzir informação filogenética relevante (Leblond-Bouger *et al.*, 1996). Assim, Poussier *et al.* (2000a) referem a necessidade de criar um sistema classificativo baseado no polimorfismo associado a outras regiões do genoma, nomeadamente a genes codificando para funções ligadas à patogenicidade.

Fegan & Prior (2005) esclarecem a designação deste organismo como abarcando 'um complexo de espécies', justificando a terminologia criada pela primeira vez por Buddenhagen (1962). A utilização deste epíteto parece pois correcta na medida em que outros organismos relacionados, como BDB (Blood Disease Bacterium) e *Ralstonia syzygii*, pela análise da sequência do gene de 16S rRNA, se integram na abrangência de diversidade de *R. solanacearum*. Corroboram também esta evidência os resultados obtidos nos níveis de homologia da hibridação DNA-DNA de estirpes de *R. solanacearum* que revelaram possuir similaridades inferiores a 70%, valor que normalmente é definido para espécie. Concluem também que, dada a elevada similaridade entre estes indivíduos, o esclarecimento sobre suas relações filogenéticas só será possível pelo estudo das sequências de outros genes.

A acumulação de estudos sobre características fenotípicas e genotípicas de *R. solanacearum* tem vindo a mostrar uma inadequação crescente do sistema de classificação que tem vindo a ser utilizado (Alvarez, 2005). O surgimento de um novo sistema classificativo hierárquico de base genómica para os níveis taxonómicos de espécie, sub-espécie, grupos infra sub-específicos e clones foi por isso proposto por Fegan & Prior (2005). Neste sistema classificativo hierárquico encontram-se o nível específico – complexo de espécies *R. solanacearum*, nível sub-específico – filotipo (I, II, III e IV), grupo infra-sub-específico – sequevar (1 a 23), e finalmente, o nível clone que corresponderá às linhas clonais (Figura 4.2).

Filotipo define-se como um grupo monofilético de estirpes determinado por análise filogenética de dados de sequenciação, nestes casos das sequências da região ITS, do gene *hrpB* e do gene da endoglucanase. O filotipo I (divisão 1) inclui todas as estirpes dos biovares 3, 4 e 5 com origem primária na Ásia. O filotipo II (divisão 2), inclui estirpes dos biovares 1, 2A e 2T isoladas no Continente Americano. O filotipo III inclui as estirpes Africanas e de ilhas próximas, pertencendo aos biovares 1 e 2T. Finalmente, o filotipo IV possui estirpes isoladas da Indonésia dos biovares 1, 2A e 2T, algumas estirpes da Austrália

e do Japão e ainda estirpes de *R. syzygii* e BDB. O sequevar corresponde a um grupo de estirpes possuindo regiões sequenciadas altamente conservadas.

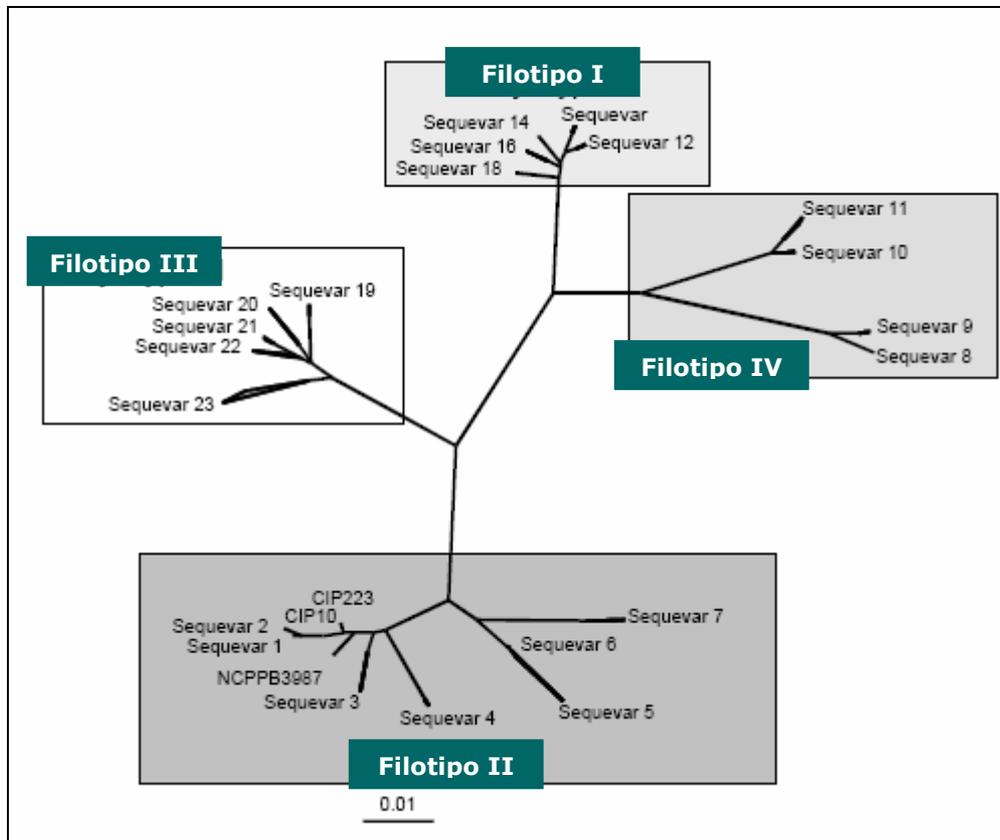


Figura 4.2 - Árvore representativa das relações filogenéticas entre sequevars e filotipos, obtida a partir da sequenciação parcial do gene da endoglucanase. A barra representa a modificação de um nucleótido numa sequência de 100 (Fonte: Fegan & Prior, 2005).

Prior & Fegan (2005b) referem ainda a formação de dois 'clusters' robustos dentro do filotipo II, definidos como tendo um largo espectro de hospedeiros ou um pequeno número de hospedeiros, de acrónimos bhr ('broad host range') e nhr ('narrow host range'), respectivamente. O 'cluster' bhr contém estirpes da raça 1/biovar 1, divide-se em dois ramos e inclui estirpes dos sequevar 5 e 6 e 7, entre outras. O 'cluster' nhr inclui estirpes do biovar 1 patogénicas para *Musa* sp. (sequevar 3 e 4), e estirpes do biovar 2 adaptadas a baixas temperaturas e patogénicas para batateira (raça 3, Grupos RFLP 26, 27 e 34). Estes autores concluem ainda que todos os filotipos contêm estirpes patogénicas para tomateiro, mostrando que desta diversidade genética poderá advir a dificuldade em proceder a um melhoramento genético eficaz contra a doença do mal murcho neste hospedeiro.

Este esquema classificativo é altamente discriminante, flexível, aditivo e baseia-se numa variabilidade genética que se acumula de forma relativamente lenta mostrando, segundo aqueles autores, uma perspectiva epidemiológica global. Confirma-se assim a correspondência relativamente ao esquema de divisões de Cook e explicam-se as falhas e cisões encontradas, com a formação de sub-'clusters' por diversos autores, ao mesmo tempo

que se ganha uma perspectiva evolutiva das relações dentro deste complexo de espécies. Por outro lado, torna mais previsível a separação entre estirpes de acordo com as suas propriedades epidemiológicas e ecológicas. Apesar deste sistema classificativo resultar de inúmera informação obtida por estudos de outros autores, Fegan & Prior têm quanto a nós o mérito de integrar toda essa informação, por vezes algo contraditória.

A nova classificação filogenética, aliada ao conhecimento das sequências dos genes *egl*, *hrpB* e *mutS* e das regiões ITS, tem vindo a permitir conhecer a diversidade deste complexo de espécies de forma mais alargada, e esclarecer as relações filogenéticas e epidemiológicas de estirpes associadas às doenças da bananeira, incluindo a origem e forma de introdução de doença 'Moko' no Continente Australiano (Fegan, 2005; Prior & Fegan, 2005a; Fegan & Prior, 2006), bem como a emergência de novas estirpes pertencentes ao filotipo II sequevar 4 mas de largo espectro de hospedeiros na Martinica (Wicker *et al.*, 2005).

O conhecimento sobre as sequências de vários genes permitiu também o estudo da diversidade através de MLST ('Multilocus Sequence Typing'), até agora mais utilizada em microbiologia clínica, com potenciais implicações no estudo dos aspectos epidemiológicos da doença (Danial *et al.*, 2006). Outros estudos sobre a variabilidade genómica de *R. solanacearum* têm-se baseado na detecção de VNTR ('variable number tandem repeats') (Parkinson *et al.*, 2006) e de SSR ('single sequence repeats') (Chandrashekara *et al.*, 2006).

Os estudos mais recentes sobre variabilidade genómica de *R. solanacearum* partem também dos conhecimentos obtidos pela informação contida na sequência completa do genoma da estirpe GMI 1000 (raça 1, biovar 3, filotipo I) (Salanoubat *et al.*, 2002; Genin & Boucher, 2002; Genin & Boucher, 2004; Boucher *et al.*, 2006), abrindo a possibilidade de identificar o conjunto de genes adquiridos ou perdidos no processo evolutivo e que estão associados à patogenicidade em determinados hospedeiros, bem como a adaptação a determinados nichos ecológicos.

A sequenciação total do genoma da estirpe GMI 1000 e de outras permitiu já a construção de um 'microarray' pangenómico, e o estudo de uma colecção de estirpes de distribuição mundial integrando a biodiversidade conhecida de *R. solanacearum*, a partir do qual foi possível corroborar as conclusões obtidas pelo sistema de classificação em filotipos, e identificar 2.690 genes funcionais e mais de 2.300 genes de virulência (Guidot *et al.*, 2007). A localização destes genes permitiu verificar que *R. solanacearum* se trata de um organismo ancestral, encontrando-se os genes de virulência localizados em ilhas genómicas possivelmente adquiridas por transferência génica lateral.

Castillo & Greenberg (2007), partindo de informação sobre a composição do genoma bi-partido (cromossoma principal e megaplasmídeo) de *R. solanacearum*, utilizaram MLST para estudar cinco genes funcionais e três genes acessórios. Estes autores basearam-se também no pressuposto de que o processo evolutivo de uma população dependerá sobretudo dos genes funcionais, menos sujeitos a uma transferência horizontal de informação, e de que o genoma acessório que inclui genes de virulência, resistência a antibióticos e elementos móveis, poderá estar sujeito a taxas evolutivas distintas. Por último, e tendo também em

conta que a distância geográfica impede o fluxo genético e conduz à divergência entre organismos de uma população, concluíram que *R. solanacearum* possui elevada diversidade, sendo constituída por quatro linhagens que evoluíram separadamente em função da distância geográfica, que possui uma elevada clonalidade para os genes funcionais de cada filotipo, à excepção do filotipo III, e elevado nível de recombinação para os genes *egl* e *hrpB* nos filotipos III e IV. Concluíram igualmente que, enquanto os genes funcionais se encontravam num processo evolutivo de purificação, os genes de virulência se encontrarão em processo de diversificação.

Aqueles autores concluíram também que, inversamente ao verificado para os filotipos III e IV, os filotipos I e II são constituídos por complexos clonais, tendo alcançado uma dispersão mundial. Este facto poderá resultar em parte de uma adaptação a climas temperados do biovar 2/raça 3, que proporcionou o recrudescimento da doença em muitos países da Europa, e ameaça a produção e circulação de batata-semente e batata-consumo, com elevadas perdas económicas em países como a Holanda (Williamson *et al.*, 2002). Bliss *et al.* (2006) confirmaram essa teoria, na medida em que verificaram alterações da expressão genómica em estirpes adaptadas a estas condições climáticas, inversamente ao verificado em estirpes originárias de regiões tropicais.

4.2 | Objectivos

Apesar de existirem já variados estudos sobre a diversidade genómica de *R. solanacearum*; a existência da doença do pus ou mal murcho em Portugal já no início do século XX, e sua posterior erradicação oficial; a sua reintrodução em Portugal na última década daquele século; as especulações sobre a co-responsabilidade dos navegadores portugueses na introdução da doença no continente Europeu; as condições geográficas e climáticas muito próprias do extremo sudoeste da Europa; a importância da cultura de plantas solanáceas numa agricultura ainda tipicamente familiar; a existência de hospedeiros alternativos distintos dos existentes no norte da Europa; e, por último mas não menos importante, a necessidade de delinear estratégias de erradicação da doença, denotou a necessidade de efectuar a caracterização da diversidade fenotípica e genómica dos isolados portugueses desta espécie bacteriana, de modo a averiguar a possível existência de diferentes biovars e/ou populações.

Por outro lado, os estudos referidos ao longo da introdução deste capítulo focalizaram a sua atenção na caracterização de colecções de estirpes de *R. solanacearum* obtidas a partir de hospedeiros cultivados, reflectindo assim a diversidade em populações muito específicas e esquecendo a riqueza em termos fenotípicos e genómicos associada a estirpes de origem ambiental, bem como de outras isoladas a partir de hospedeiros alternativos. Consequentemente, estas estirpes, adaptadas a condicionalismos distintos, decorrentes das especificidades desses habitats, conjuntamente com outras obtidas a partir dos hospedeiros

tradicionais, ao serem integradas num mesmo estudo, evidenciarão melhor a totalidade da riqueza fenética de *R. solanacearum* em Portugal.

Neste trabalho pretendeu-se assim averiguar a riqueza da diversidade inerente às estirpes portuguesas de *R. solanacearum*, procedentes de diversas origens ou matrizes, incluindo isolados obtidos a partir de amostras ambientais, de modo a averiguar a existência de uma selecção adaptativa, resultante da activação do arsenal genético constitutivo deste organismo, evidenciando (ou não) a existência de uma estratégia de sobrevivência em condições menos favoráveis.

Estes isolados foram sujeitos ao estudo da caracterização da sua diversidade, segundo uma abordagem polifásica, efectuando-se uma caracterização mais fina por via quimiotaxonómica e molecular. Por outro lado, pretendeu-se ainda verificar a capacidade destes métodos, escolhidos para discriminar a nível infra-específico (intrabiovar) um conjunto de estirpes que se mostrou muito homogéneo, com recurso a técnicas de identificação utilizadas em rotina, mas baseadas em princípios funcionais distintos, tentando igualmente perceber a sua aplicabilidade à rotina laboratorial.

O estudo de um número elevado de isolados, provenientes de origens geográficas e matrizes distintas, teve também como objectivo tentar esclarecer a existência de diferentes populações de *R. solanacearum* em Portugal e a sua possível origem, bem como inferir acerca da sua versatilidade no que diz respeito à escala de hospedeiros e riscos para os sistemas de produção agrícolas em Portugal.

4.3 | Métodos experimentais e de análise de dados

De acordo com a sua capacidade de tipificação e poder discriminante foram escolhidos como métodos, para caracterização infra-específica ao nível do fenótipo, a determinação do biovar (de acordo com a capacidade das estirpes para utilizarem diferentes substratos carbonados), e os perfis de 'fingerprinting' obtidos por electroforese das proteínas celulares totais em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

No que diz respeito à caracterização da diversidade genotípica utilizou-se PCR com 'primers' dirigidos para sequências repetidas do DNA genómico (rep-PCR), nomeadamente a sequência consenso do DNA de enterobactérias (ERIC-2) e a unidade BOX de 154bp. Procedeu-se igualmente à realização de MSP-PCR com o 'primer' csM13, obtido a partir da sequência do gene da proteína III da cápside do fago M13. Finalmente recorreu-se ao uso da técnica AFLP, suportada por sequenciador para análise dos fragmentos amplificados.

Os resultados obtidos por via da caracterização fenotípica e genotípica dos isolados portugueses de *R. solanacearum* permitiram a inclusão de um grupo de isolados, representativo em número e qualidade da totalidade da diversidade fenética conhecida, num estudo filogenético efectuado com base na sequenciação parcial do gene da endoglucanase

(*egl*), de modo a proceder à identificação dos filotipos e sequevares em que se integram os isolados portugueses de *R. solanacearum*.

4.3.1 | Os Isolados

A análise laboratorial continuada de amostras de espécies vegetais e substratos diversos conduziu à obtenção, entre 1995 e 2006, de uma colecção rondando os 369 isolados, já identificados como *R. solanacearum* e integrados na Colecção Portuguesa de Bactérias Fitopatogénicas (CPBF). A partir destes procedeu-se à selecção de uma amostra aleatória representativa para posterior caracterização infra-específica ao nível do fenótipo e do genótipo.

Os isolados que integram estes estudos foram, na sua maior parte, obtidos pelo autor deste trabalho. Por ser conveniente num estudo sobre caracterização da diversidade, adicionaram-se ainda outros isolados obtidos em Portugal, provenientes de outros hospedeiros e origens geográficas e gentilmente cedidos, pelo que não sendo possível fazer referência ao obtentor na Tabela 4.4, se procede à sua descrição em Anexo.

Este processo obedeceu a determinados critérios de inclusão de isolados:

- isolados de todas as regiões prospectadas;
- isolados obtidos em anos consecutivos para o mesmo local de amostragem;
- isolados obtidos a partir de todos os substratos e hospedeiros presentes na colecção;

Os isolados com origem no mesmo local de amostragem, obtidos em anos sucessivos e provenientes de águas superficiais e solos, foram tratados como indivíduos distintos.

Dessa colecção foram seleccionados 94 isolados, obtidos entre 1995 e 2000, bem como estirpes dos diferentes biovares de *R. solanacearum* e ainda alguns organismos relacionados genómica ou serologicamente com este organismo (*B. cepacia*, CFBP 2227-, *R. pickettii*, CFBP 2459; *Ralstonia* sp., PD 2778 e *Ochrobactrum anthropii*, IPO S306), originários de colecções de referência internacionais (Tabela 4.4).

Posteriormente foram ainda introduzidos neste estudo dois isolados de *R. solanacearum* obtidos recentemente a partir de tubérculos e plantas de batateira, provenientes do aproveitamento hidro-agrícola do Baixo Mondego. Estes isolados foram previamente identificados e caracterizados de acordo com os procedimentos inerentes à rotina laboratorial (Capítulo 2). Posteriormente procedeu-se ainda à determinação do biovar e à sequenciação do gene de 16S rRNA, de modo a confirmar a sua classificação específica e infra-específica.

Os isolados utilizados nestes estudos encontravam-se conservados em criotubos a -80°C.

Tabela 4.4 – Coleção de isolados de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (1995) obtidos em Portugal e de isolados de outras origens geográficas, bem como de organismos relacionados utilizados nos estudos de diversidade fenotípica e genómica.

| ID-original | Género/Espécie | Biovar | Matriz | País | Local | Concelho | Ano |
|-------------|-------------------------------|--------|--------------------------------|----------|------------------|------------|------|
| CPBF 473 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Montijo | Montijo | 1997 |
| CPBF 568 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | P. Varzim | P. Varzim | 1995 |
| CPBF 646 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | na | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | V. Frades | Nazaré | 1998 |
| CPBF 648 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | na | Água superficial | Portugal | Mora | Mora | 1998 |
| CPBF 674 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 1 | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | M. Campo | Coimbra | 2007 |
| CPBF 712 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | V. Frades | Nazaré | 1999 |
| CPBF 713 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum nigrum</i> | Portugal | V. Frades | Nazaré | 1999 |
| CPBF 714 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum nigrum</i> | Portugal | Mora | Mora | 1999 |
| CPBF 715 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | V. Frades | Nazaré | 1999 |
| CPBF 716 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | V. Frades | Nazaré | 1999 |
| CPBF 724 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Couço | Coruche | 1999 |
| CPBF 742 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | S. Grandes | Montijo | 1999 |
| CPBF 747 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cadafaz | C. Beira | 1999 |
| CPBF 750 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | M. Quinta | Benavente | 1999 |
| CPBF 752 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | H. Montinho | Montijo | 1999 |
| CPBF 757 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Furadouro | Mora | 1999 |
| CPBF 758 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | M. Quinta | Benavente | 1999 |
| CPBF 759 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | H. Montinho | Montijo | 1999 |
| CPBF 761 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | A. Gameiro | Mora | 1999 |
| CPBF 762 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | Barosa | Pombal | 1999 |
| CPBF 763 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | Caranguejeira | Leiria | 1999 |
| CPBF 767 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | M. Quinta | Benavente | 1999 |
| CPBF 770 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | H. Pavões | Coruche | 1999 |
| CPBF 772 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | F. Salvaterra | S. Magos | 1999 |
| CPBF 774 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | H. Espadaneira | Canha | 1999 |
| CPBF 776 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | C. Bragança | V. Novas | 1999 |
| CPBF 779 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | M. Quinta | Benavente | 1999 |
| CPBF 780 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Rib. Canha | Canha | 1999 |
| CPBF 782 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | R. Caranguejeira | Leiria | 1999 |
| CPBF 784 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Montreal | Leiria | 1999 |
| CPBF 785 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | Barosa | Pombal | 1999 |
| CPBF 787 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | R. Areia | Nazaré | 1999 |
| CPBF 788 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Chaves | Chaves | 1999 |
| CPBF 789 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | Á. Belas | Coruche | 1999 |
| CPBF 793 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Resíduo Industrial | Portugal | Mora | Mora | 1999 |
| CPBF 803 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | H. Espadaneira | Canha | 1999 |
| CPBF 805 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Rib. Canha | Canha | 1999 |
| CPBF 829 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Montalegre | Montalegre | 1999 |
| CPBF 831 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Montalegre | Montalegre | 1999 |
| CPBF 832 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | na | <i>Datura stramonium</i> | Portugal | H. Espadaneira | Montijo | 1999 |
| CPBF 833 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Portulaca oleracea</i> | Portugal | H. Espadaneira | Montijo | 1999 |
| CPBF 834 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Montalegre | Montalegre | 1999 |
| CPBF 835 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Montalegre | Montalegre | 1999 |
| CPBF 836 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Montalegre | Montalegre | 1999 |
| CPBF 837 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 838 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 839 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 840 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 845 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 846 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | H. Espadaneira | Montijo | 1999 |
| CPBF 847 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | na | Solo | Portugal | H. Espadaneira | Montijo | 1999 |
| CPBF 848 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | H. Espadaneira | Montijo | 1999 |
| CPBF 849 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 |

na – biovar não atribuído

Tabela 4.4 – Coleção de isolados de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (1995) obtidos em Portugal e de isolados de outras origens geográficas, bem como de organismos relacionados utilizados nos estudos de diversidade fenotípica e genómica (cont.).

| ID-original | Género/Espécie | Biovar | Matriz | País | Local | Concelho | Ano |
|-------------|-------------------------------|--------|--------------------------------|-----------|-------------------|-----------|------|
| CPBF 850 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 851 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Bragança | Bragança | 1999 |
| CPBF 856 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | R. Caranguejeira | Leiria | 2000 |
| CPBF 861 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Furadouro | Mora | 2000 |
| CPBF 869 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | A. Tâmega | Chaves | 2000 |
| CPBF 870 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Rio Areia | Nazaré | 2000 |
| CPBF 872 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Tâmega 2 | Chaves | 2000 |
| CPBF 873 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Veiga | Chaves | 2000 |
| CPBF 874 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum nigrum</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 875 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 877 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Senecio vulgaris</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 878 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Urtica urens</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 880 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 2000 |
| CPBF 881 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 882 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | M. Quinta | Benavente | 2000 |
| CPBF 883 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | A. Tâmega | Chaves | 2000 |
| CPBF 884 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Tâmega 2 | Chaves | 2000 |
| CPBF 885 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Azabuxo | Leiria | 2000 |
| CPBF 886 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | P. Gândara | Leiria | 2000 |
| CPBF 887 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Pousos | Leiria | 2000 |
| CPBF 894 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Azabuxo | Leiria | 2000 |
| CPBF 895 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Rib. Carnquejeira | Leiria | 2000 |
| CPBF 897 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Montreal | Leiria | 2000 |
| CPBF 899 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | P. Gândara | Leiria | 2000 |
| CPBF 900 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Pousos | Leiria | 2000 |
| CPBF 903 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Campinos | Leiria | 2000 |
| CPBF 904 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Campinos | Leiria | 2000 |
| CPBF 908 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | R. Areia | Nazaré | 2000 |
| CPBF 909 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Rib. Caldelas | Leiria | 2000 |
| PBBF 913 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | na | Água superficial | Portugal | Azabuxo | Leiria | 2000 |
| CPBF 914 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 915 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Polygonum areanstrum</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 916 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum nigrum</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 917 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Resíduo industrial | Portugal | Palmela | Palmela | 2000 |
| CPBF 918' | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum dulcamara</i> | Portugal | P. Montante | Alcobaça | 2000 |
| CPBF 920 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum nigrum</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 921 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Póvoa | Alcobaça | 2000 |
| CPBF 922 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | P. Montante | Alcobaça | 2000 |
| CPBF 923 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | na | Água superficial | Portugal | C. Areia | Alcobaça | 2000 |
| CPBF 925 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | R. Alcoa | Alcobaça | 2000 |
| CPBF 929 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | R. Areia | Nazaré | 2000 |
| CPBF 933 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | V. Frades | Nazaré | 2000 |
| CPBF 1192 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 1 | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | S. Martinho | Coimbra | 2007 |
| PD 1941 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | | | 1960 |
| NCPPB 325 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 1 | <i>Lycopersicon esculentum</i> | EUA | - | -- | 1953 |
| NCPPB 3989 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2T | <i>Solanum tuberosum</i> | Brasil | | -- | -- |
| NCPPB 3996 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 3 | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Peru | | -- | -- |
| NCPPB 4005 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 4 | <i>Zingiber officinale</i> | Filipinas | | -- | -- |
| R 288 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 5 | <i>Morus sp.</i> | China | | -- | -- |
| NCPPB 4028 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Colômbia | | -- | -- |
| CSI Pr 3610 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | | | | | |
| NCPPB 4160 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Espanha | | | 1996 |
| CFBP 2227 | <i>Burkholderia cepacia</i> | -- | <i>Allium cepa</i> | EUA | | | 1950 |
| NCPPB 2505 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Suécia | | | 1972 |

na – biovar não atribuído

Tabela 4.4 – Coleção de isolados de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (1995) obtidos em Portugal e de isolados de outras origens geográficas, bem como de organismos relacionados utilizados nos estudos de diversidade fenotípica e genómica (cont.).

| | | | | |
|-----------|-------------------------------|----|--------------------------|---------|
| CFBP 2459 | <i>Ralstonia pickettii</i> | -- | | |
| IPO S306 | <i>Ochrobactrum anthropii</i> | -- | | Holanda |
| PD 2778 | <i>Ralstonia sp.</i> | -- | | |
| PD 2762 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Holanda |

na – biovar não atribuído

Alguns dos isolados não foram utilizados em todos os métodos de ‘fingerprinting’ devido a crescimento insuficiente ou a contaminação. Essa situação verificou-se contudo apenas para um número muito restrito de casos. Em Anexo referem-se os isolados utilizados nos diferentes estudos.

4.3.2 | Estudo do perfil bioquímico para determinação do biovar

A caracterização do biótipo ou biovar de 102 isolados foi efectuada através da sua aptidão para utilizar e/ou oxidar três álcoois derivados de monossacáridos (manitol, sorbitol e dulcitol) e três dissacáridos (maltose, lactose e celobiose) (Hayward, 1964, 1994b). Foram também realizados ensaios adicionais para diferenciar o biovar 2, nos subfenótipos 2A (Grupos RFLP 26 ou 27 de Cook *et al.* (1989)) e 2T ou N2 (Grupos RFLP 29 a 33 de Cook *et al.* (1989)), que se distinguem pela utilização diferenciada de trealose, inositol e D-ribose (Hayward *et al.*, 1990; Janse, 1991 e Hayward, 1994b).

Nessa determinação utilizou-se o meio basal de Hayward (1964) e o procedimento operativo descrito na Directiva da Comissão - 2006/63/CE (União Europeia, 2006). A disposição dos substratos em placas do tipo ELISA mostra-se na Figura 4.3.

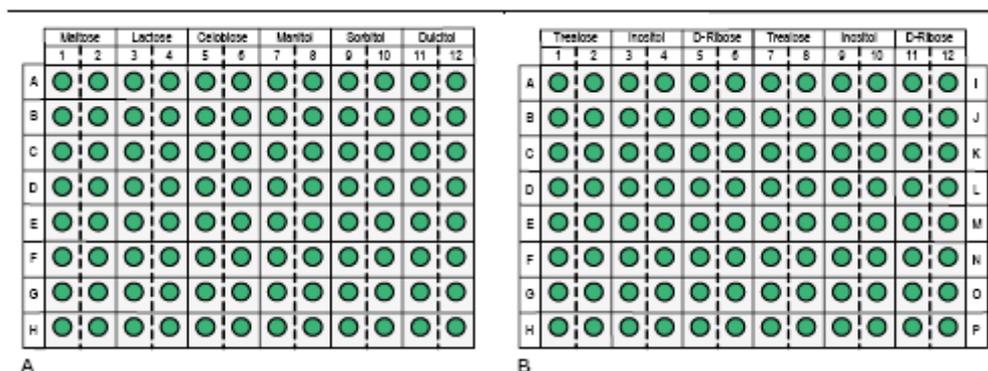


Figura 4.3 - Caracterização dos biovars e subfenótipos do biovar 2 de *Ralstonia solanacearum*. Distribuição dos substratos carbonados e respectivas réplicas para determinação do biovar (A) e dos subfenótipos 2A e 2T(N2) (B).

Não se procedeu à determinação da actividade pectínolítica e da capacidade de redução dos nitratos a nitritos (Janse, 1991) para os isolados do biovar 2 em estudo, uma vez que esta característica não acrescenta qualquer dado discriminante para os isolados previamente identificados como pertencendo ao subfenótipo 2A de *R. solanacearum*.

4.3.3 | Estudo dos perfis electroforéticos das proteínas celulares totais

Procedeu-se ao estudo das proteínas celulares totais de 74 isolados portugueses de *R. solanacearum* e da colecção de estirpes deste complexo ou de organismos relacionados provenientes de colecções estrangeiras. As estirpes estudadas encontram-se descritas na Tabela 4.4. A descrição crítica presente na introdução deste capítulo relativamente ao estudo de proteínas membranares vs. totais, levou-nos a escolher esta última via por nos parecer que traduziria mais fidedignamente a constituição e funcionamento da célula bacteriana.

Considerando que a constituição proteica de um organismo é o reflexo da sua expressão genómica, os vários autores preconizam o estudo dos perfis proteicos como uma forma directa de obter uma identificação muito fiável desse organismo atribuindo-lhe, desde que utilizando condições padronizadas, um elevado poder discriminativo e identificativo (Costas, 1990 *cit in* Tenreiro, 1995). Corroboram ainda estas afirmações outros dados em que parece ocorrer uma boa correlação, para uma identificação ao nível da espécie, entre a análise das proteínas celulares totais e ensaios de hibridação de RNA e DNA (Dianese *et. al.*, 1989; Chambel, 2001).

A técnica de SDS-PAGE parece ainda ter a vantagem de detectar proteínas constitutivas que são menos afectadas pelas condições de crescimento do que enzimas indutíveis normalmente associadas à fracção solúvel (Dianese & Dristig, 1994).

Os perfis de proteínas celulares totais permitiram a Li & Hayward (1994) correlacionar os perfis proteicos, os biovares, as duas divisões de Cook *et al.* (1989) obtidas por RFLP, e os resultados da sequenciação do gene 16S rRNA. Estes autores estudaram estirpes pertencentes a diferentes géneros, entre os quais 16 estirpes de *R. solanacearum*, obtendo perfis proteicos similares para estirpes de determinada espécie de *Pseudomonas* e portanto uma identificação perfeita, enquanto que, para *R. solanacearum*, observaram diferenças a nível infra-específico altamente correlacionadas com o biovar (1 e 2, 3, 4). Não foi contudo possível discriminar entre os biovares 1 e 2, que formaram um único 'cluster' com 91% de similaridade, medida avaliada por 'simple matching'. Estes resultados evidenciaram também a maior proximidade de *R. solanacearum* com *R. pickettii* do que com outras "*Pseudomonas* spp."

4.3.3.1 | Preparação dos extractos proteicos totais

Os 89 isolados bacterianos foram ressuscitados em meio gelosado de SPA (Lelliott & Stead,

1987) durante 48 h a 28°C. Este meio permite um desenvolvimento adequado da bactéria possibilitando a obtenção de colónias de diâmetro aceitável neste período. As proteínas celulares totais (citoplasmáticas e membranares) foram extraídas após lise celular enzimática e solubilizadas de acordo com o método descrito por Pot *et al.* (1994), na presença do agente desnaturante SDS e de mercaptoetanol, responsável pela destruição da sua conformação nativa. A concentração dos extractos proteicos foi depois quantificada (método de Lowry modificado por Peterson (1979)).

4.3.3.2 | Electroforese em sistema descontínuo

Aproximadamente 60 µg de extracto proteico foram então adicionados ao tampão de amostra contendo SDS e azul de bromofenol. A separação electroforética das proteínas solubilizadas foi feita, em condições desnaturantes, num sistema de tipo descontínuo constituído por um gel de concentração e outro de separação ou resolução contendo concentrações distintas de SDS e poliacrilamida (Laemmli, 1970).

Utilizaram-se cerca de 10% de réplicas dos isolados em estudo, escolhidos de forma aleatória, para verificar a reprodutibilidade do método e que foram sujeitos a electroforese em géis independentes do isolado original.

Como referência de massas moleculares foram utilizadas 40 µg de extracto proteico de *Psychrobacter immobilis* (LMG 125) que possui um variado espectro de proteínas com massas moleculares muito distintas.

Os géis foram sujeitos a electroforese vertical, com uma corrente constante de 300 mA e uma voltagem máxima de 500 V durante um período de 4 horas, efectuando-se controlos periódicos das condições de corrida com intervalos de aproximadamente 20 minutos. Posteriormente os géis foram fixados, corados com azul brilhante de Comassie e descorados. A utilização deste corante permite obter uma maior reprodutibilidade ao contrário da coloração com nitrato de prata que parece no entanto aumentar a sensibilidade (Tenreiro, 1995).

4.3.3.3 | Análise numérica dos perfis electroforéticos de proteínas celulares totais

Após secagem, os géis foram digitalizados com a resolução considerada mais conveniente e os seus perfis densitométricos analisados com o software Bionumerics versão 4.61 (Applied Maths, Sint-Martens-Laten, Belgium), utilizando o coeficiente de correlação linear de Pearson (r). Procedeu-se à aglomeração hierárquica utilizando a distância aritmética média não ponderada (UPGMA). As variabilidades intra e intergel foram também estimadas de modo a avaliar a reprodutibilidade do método.

A fim de poder efectuar a comparação dos perfis electroforéticos (densitométricos) dos vários géis padronizou-se o mais possível as condições de crescimento das células

bacterianas, a preparação e quantificação dos extractos proteicos, as condições de electroforese, de coloração e secagem dos géis e, finalmente, a definição da digitalização. Também o processamento dos géis, no que diz respeito à sua normalização e análise, pode afectar dramaticamente a qualidade dos resultados da análise e condicionar até o dendrograma final, pelo que se deu particular atenção a este processo.

A utilização de perfis densitométricos tem em conta as diferenças quantitativas existentes entre as estirpes em estudo e por isso parece conduzir a uma análise mais reprodutível e discriminante (Costas, 1990; Tenreiro, 1995, Vauterin *et al.*, 1993). No entanto, a presença de proteínas dominantes em muitos perfis pode mascarar a presença de outras bandas discriminantes menos importantes em termos quantitativos e condicionar o posicionamento de estirpes distintas dentro de um mesmo 'cluster', pelo que a inspecção visual dos perfis é indispensável para detectar possíveis anomalias (Tenreiro, 1995).

A estimativa do nível a que o dendrograma construído reflecte os dados originais foi calculado através do coeficiente de correlação cofenética (ρ), utilizando-se como limiar de confiança o valor de 0,8, de acordo com Jones & Sackin (1980).

4.3.4 | Estudo da Diversidade Genómica por BOX, ERIC e MSP-PCR

O tamanho e organização de um determinado genoma parece ser o resultado do seu estado evolutivo e a dispersão e distribuição de determinado tipo de sequências será o reflexo dessa evolução.

São variados os métodos biomoleculares que permitem a tipificação de microrganismos e o estudo da sua diversidade. A utilização de 'primers' dirigidos a sequências mais ou menos universais repetidas ao longo do genoma parece permitir discriminar diferentes estirpes de uma determinada espécie ou de organismos ainda mais próximos (níveis infra-específicos), por exemplo patovar, permitindo inferir acerca da sua classificação (Louws *et al.*, 1994) e/ou origem clonal (Fegan & Prior, 2005).

Integram-se neste grupo o rep-PCR considerado como um dos métodos de 'fingerprinting' baseados na amplificação de DNA que se tem mostrado muito fidedigno, reprodutível, rápido e com um elevado potencial discriminante ao nível da estirpe (Versalovic *et al.*, 1994; Louws *et al.*, 1994). De entre as famílias de sequências repetidas, a sequência ERIC (sequência consenso inetergénica de enterobacterias) de 124 a 127 pb e o elemento BOX de 154 pb (composto pelas sub-unidades A, B e C), parecem possuir localizações distintas ao longo do genoma e estar presentes em ambas as orientações, permitindo por PCR a amplificação de regiões do genoma entre estes elementos (Bruijn *et al.*, 1996).

A utilização de 'primers' dirigidos para aquelas sequências, no estudo dos genomas de alguns patovares de espécies fitopatogénicas de *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, permitiu verificar sua utilidade para diferenciar a nível intra-patovar isolados provenientes de diversas origens

geográficas ou obtidos em épocas distintas (Louws *et al.*, 1994), e abriram portas para a sua aplicação a outros organismos nomeadamente ao estudo da diversidade genómica de *R. solanacearum*.

Alguns métodos de 'fingerprinting' como a ribotipagem e PCR-RFLP do 'spacer' 16S-23S do rDNA de *R. solanacearum* e de outras espécies relacionadas como *Ralstonia gilardii*, *Ralstonia paucula*, *R. eutropha*, e *R. pickettii* não permitiram obter diferenças significativas nos perfis produzidos para estes organismos (Moissenet *et al.*, 2001).

Os perfis de 'fingerprinting' obtidos por rep-PCR permitiram verificar a presença de duas categorias de grupos: I - aqueles que possuíam perfis de 'fingerprinting' muito próximos ou perfis únicos mas partilhando múltiplas bandas com mobilidade semelhante (herança evolutiva comum); II - aqueles que podiam ser divididos em grupos com perfis de 'fingerprinting' distintos (diferentes linhagens ou linhas evolutivas). Por outro lado, os resultados obtidos utilizando diferentes 'primers' dirigidos para sequências repetidas do genoma eram concordantes entre si para estirpes possuindo perfis similares. Na presença de perfis com polimorfismos, os diferentes 'primers' geravam informação distinta específica para cada estirpe. Os mesmos autores concluíram ainda que em determinados casos os perfis gerados por BOX- e ERIC- pareciam ser mais discriminantes relativamente aos criados por REP-PCR. A utilização conjunta dos diversos 'primers' permitiu no entanto uma monitorização genómica mais ampla e tirar conclusões mais fundamentadas relativamente à diversidade infra-específica.

Outra abordagem de 'fingerprinting' genómico diz respeito à 'Microsatellite-Primed PCR' (MSP-PCR) que faz igualmente uso da informação contida no elevado número de cópias de sequências nucleotídicas designadas micro e mini-satélites dispersas nos genomas eucarióticos e procarióticos. Neste caso são usados oligonucleótidos complementares às sequências de microsatélites ou minisatélites (sequências com pequenos motivos, de 2 a 4 nucleótidos, repetidas em tandem) de distribuição ubíqua no genoma eucariota. Se forem encontradas sequências repetidas em tandem invertidas localizadas a uma distância amplificável por PCR, a região entre essas sequências será amplificada (Martin *et al.*, 1998).

Este método, para além de possuir uma elevada reprodutibilidade resultante da elevada restritividade de condições em que ocorre a amplificação, parece também possuir a capacidade de detectar variabilidade a nível inter e intra-específico, permitindo identificar linhagens ou clones. Aqueles autores detectaram polimorfismos associados com a origem geográfica de isolados ectomicorrízicos.

O 'primer' minisatélite (csM13) corresponde a uma sequência existente em elevado número de cópias nos genomas e de distribuição universal, possuindo potencialidades como marcador molecular quando utilizado em estudos de 'fingerprinting' genómico (Ryskov *et al.*, 1988). No entanto, a maior parte dos estudos utilizando MSP-PCR tem sido dirigido para organismos eucariotas (Meyer *et al.* 2001, Gadanho *et al.*, 2003).

A introdução destes métodos de 'fingerprinting' num estudo polifásico desta natureza,

utilizando condições menos padronizadas, visou verificar o seu potencial para caracterização de estirpes suspeitas ao nível do biovar, e independentemente da sua origem (matriz), uma vez que esta estratégia tem vindo a ser utilizada na caracterização de colecções de estirpes europeias e mundiais de *R. solanacearum*. Pretendeu-se por isso utilizar 'primers' que têm sido amplamente explorados na diferenciação destas estirpes a nível infra-específico (BOX, ERIC) em condições próximas da rotina laboratorial, verificando a sua versatilidade para caracterização rápida e fidedigna de isolados suspeitos, e ao mesmo tempo averiguar o seu potencial discriminante a nível epidemiológico.

Utilizou-se igualmente a 'microsatellite primed PCR' (MSP-PCR), de modo a aferir o seu potencial discriminante em condições semelhantes às aplicadas para rep-PCR. A aplicação da MSP-PCR a estudos de 'fingerprinting' genómico de procariontes tem sido exígua. Trata-se no entanto de um método biomolecular facilmente aplicável à rotina laboratorial, mais simplificado e menos moroso, mostrando a vantagem de antecipar os resultados do diagnóstico em algumas horas.

4.3.4.1 | Extracção do DNA genómico

Os isolados bacterianos cresceram durante 48 h a 28°C em agar de sacarose e peptona (SPA) (Lelliott & Stead, 1987). Efectuaram-se suspensões aquosas em água destilada esterilizada e a sua O.D. foi ajustada a 0.1 a 600 nm (correspondendo a 10^8 cfu.ml⁻¹). As células bacterianas foram depois lisadas durante 6 minutos a 95°C, e os tubos transferidos para gelo e guardados a -20°C para futura utilização.

Recorreu-se ao uso de lisados bacterianos evitando extracções de DNA uma vez que se pretendia aplicar a técnica a um elevado número de estirpes. Por outro lado, Louws *et al.* (1994) e Bruijn *et al.* (1996), em estudos utilizando esta estratégia não observaram diferenças nos perfis de 'fingerprinting'. Por se pretender aplicar esta técnica em rotina para confirmação da identidade das estirpes ao nível do biovar num futuro próximo, este procedimento seria igualmente menos oneroso em termos de custos e de tempo.

4.3.4.2 | 'Primers' e condições de reacção e de amplificação

Os isolados de *R. solanacearum* e de outros organismos relacionados foram analisados através do estudo de sequências repetidas do genoma por PCR, utilizando o 'primer' BOXA1R que corresponde à sequência da sub-unidade BOX A do elemento BOX de 154 pb, e pela sequência consenso intergénica repetida de enterobactérias ERIC com 124 a 127 pb, de acordo com Louws *et al.* (1994). A análise das sequências REP ("repetitive extragenic palindromic") foi igualmente utilizada, no entanto o seu uso foi abandonado uma vez que os perfis obtidos não pareciam gerar informação de interesse.

O estudo dos minisatélites (MSP-PCR) foi efectuado utilizando como 'primer' a sequência csM13 (5' - GAG GGT GGC GGT TCT - 3'). Foram igualmente utilizados outros 'primers'

sintéticos dirigidos a microsátélites, com motivos variados, mas os resultados obtidos evidenciaram dificuldades no seu emparelhamento, resultando daí perfis de 'fingerprinting' pouco diferenciados, pelo que a sua aplicação foi abandonada, à semelhança dos resultados obtidos por outros autores (Weising *et al.*, 1995).

Os 'primers' foram sintetizados por Genosys (Sigma-Genosys Ltd., Pampiford, Cambridge, U.K.) e a amplificação foi efectuada num termociclador PTC 100 MJ Research thermalcycler (Ecogen, S.L., Barcelona, Espanha).

As misturas de reacção e condições de amplificação utilizando o 'primer' BOXA1R e o 'primer' ERIC 2 foram respeitadas as condições preconizadas por Louws *et al.* (1994).

Em MSP-PCR utilizaram-se utilizando reacções de 25 µl contendo tampão de reacção 1X (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl), 3mM MgCl₂, 200µM dNTPs, 0,8µM de 'primer' csM13 e 2,5U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, S. A. Barcelona, Espanha). O DNA foi amplificado num termociclador PTC 100 MJ Research utilizando as seguintes condições de amplificação: um ciclo inicial de 5 min a 94 °C e 40 ciclos com desnaturação do DNA durante 1 min a 94 °C, emparelhamento do 'primer' 1 min a 55 °C e extensão de 2 min a 72 °C. A extensão final foi de 6 min a 72 °C.

Um volume de 8 µl dos produtos de amplificação foi utilizado na electroforese em gel de agarose a 2% (1X) TAE e sujeito a uma corrente de 5 V/cm durante 8 h para rep-PCR e 2 h para MSP-PCR.

Os géis foram corados com uma solução de brometo de etídeo (0.5 µg.mL⁻¹) e fotografados com uma câmara fotográfica digital Kodak DC-290 utilizando o software 1D LE 3.6 (Kodak Scientific Imaging Systems, Edinburgh, Scotland) para aquisição da imagem.

A reprodutibilidade dos diferentes métodos foi verificada através do cálculo da média dos índices de similaridade para 10% das estirpes e respectivas réplicas, as quais foram utilizadas em experiências independentes.

4.3.4.3 | Análise numérica dos perfis de rep-PCR e MSP-PCR

As imagens adquiridas foram tratadas com o software Bionumerics, versão 4.61 (Applied Maths, Sint-Martens-Laten, Belgium).

A escolha do processo de análise numérica dos isolados foi efectuada por análise hierárquica comparativa (HCA), uma vez que a colecção em estudo, apesar de ser constituída por estirpes semelhantes a nível específico, possuía também organismos claramente distintos, incluindo estirpes com grande diversidade geográfica e oriundas de matrizes muito distintas, incluindo algumas de origem ambiental, conforme preconiza Bridge (1998). A escolha desta abordagem poderá ser discutível, pois segundo este autor um método de análise ordenador (como por exemplo a análise de componentes principais – PCA) poderia ser mais adequado à comparação de estirpes a um nível intra-específico. Contudo a PCA parece possuir também limitações pelo facto de conseguir explicar apenas parte da variância obtida. A escolha de

uma abordagem polifásica utilizando conhecimentos baseados em características distintas do complexo de estirpes em estudo, e o agrupamento por similaridade da totalidade das características estudadas permite também ultrapassar as dúvidas que possam surgir quanto à escolha efectuada.

Os perfis de 'fingerprinting' obtidos foram caracterizados quanto à sua similaridade utilizando os perfis densitométricos, obtidos após normalização das imagens, e tendo em conta a complexidade dos perfis gerados pelos diferentes 'primers' utilizados. Foi igualmente considerado o número, posição, tamanho e áreas daqueles picos. Os valores densitométricos foram então utilizados para o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson, o qual parece ser mais robusto e objectivo por utilizar a totalidade do perfil, e deste modo menos sensível a diferenças criadas pelo 'background' (Rademaker & de Bruijn, 1997). A associação entre estirpes foi obtida por aglomeração hierárquica com UPGMA. A robustez do dendrograma obtido foi definida, com já anteriormente referido, pelo coeficiente de correlação cofenética (ρ).

A fim de se averiguar o poder discriminante dos diferentes métodos de 'fingerprinting' utilizados foram ainda calculados os índices de diversidade de Simpson (D) e de Shannon-Weiner (H' e J'), de acordo com as seguintes fórmulas:

| | | |
|---|---|---|
| $D_s = \sum_{i=1}^s \frac{(n_i (n_i - 1))}{(N(N-1))}$ | $H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$ | $H_{\max} = \ln S$ |
| <p>S - nº total de tipos</p> <p>n_i - número de indivíduos de determinado tipo</p> | <p>N - número total de indivíduos</p> <p>ln - logaritmo de base natural</p> | <p>$J' = H'/H_{\max}$</p> <p>p_i - proporção de indivíduos determinado tipo</p> |

4.3.5 | Estudo da diversidade genómica por FAFLP ('Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism')

O método AFLP ('Amplified Fragment Length Polymorphism'), que se baseia na amplificação selectiva de fragmentos genómicos obtidos por corte com enzimas de restrição, parece possuir elevadas potencialidades como instrumento de tipificação de estirpes bacterianas a nível infraespecífico, sendo unânime a opinião de muitos autores a este respeito (Vos *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 1996; Coenye *et al.*, 1999; 2000; Bossier *et al.*, 2000; Poussier *et al.*, 2000a; Desai *et al.*, 2001; Avrova *et al.*, 2002 e Roumagnac *et al.*, 2004). Efectivamente, Janssen *et al.* (1996) concluíram, após análise dos dados obtidos por AFLP, comparativamente a outros previamente obtidos por métodos estabelecidos como de referência para estudos taxonómicos - análise de ácidos gordos e hibridações de DNA -, a aplicabilidade deste método e a sua superioridade em termos de capacidade discriminante

para estirpes muito relacionadas, incluindo a nível infraespecífico, revelando ainda potencialidades em estudos epidemiológicos e evolutivos.

Embora mais sofisticado que outros métodos de 'fingerprinting', pois envolve mais alguns passos, segundo Vos *et al.* (1995) possui elevada robustez e fiabilidade pois o emparelhamento dos 'primers' ocorre em condições de elevada restritividade, e alia as qualidades de RFLP ao poder de PCR.

Numa primeira etapa, o DNA genómico total é digerido por duas enzimas de restrição que reconhecem sequências nucleotídicas distintas. A escolha destas enzimas vai depender da % de G+C do genoma em estudo, pois daí dependerá o número de fragmentos de restrição produzidos. Regra geral, para um genoma rico em G+C (p. e. *Ralstonia* sp.), caso se usem enzimas que reconhecem sequências ricas nestas bases (p. e. *Apa* I), será de prever um maior número de cortes e como resultado final um maior número de fragmentos amplificados.

A este aspecto alia-se também a frequência de corte das enzimas (inversamente proporcional ao número de bases reconhecidas). Um decréscimo no número de bandas parece não afectar grandemente a análise numérica, mas afecta significativamente os níveis de corte de certos 'clusters' que, nalguns casos, parece ter decrescido significativamente (Jassen *et al.*, 1996). Finalmente um maior número de bandas poderá permitir uma maior discriminação entre organismos muito relacionados

Aos fragmentos gerados ligam-se então adaptadores específicos para as sequências de corte. Posteriormente processa-se a amplificação utilizando 'primers' que reconhecem as sequências de restrição e dos respectivos adaptadores, e que poderão possuir ainda zero a três nucleótidos selectivos na sua extremidade 3'. A concepção dos adaptadores faz com que após a sua ligação ao local de restrição essa ligação não possa ser destruída, o que permite a presença das enzimas de restrição durante todo o processo impedindo a ligação entre fragmentos. Por outro lado, as duas enzimas normalmente usadas em conjunto possuem sequências de corte muito distintas impedindo também que os respectivos adaptadores se liguem entre si. O emparelhamento dos 'primers' decorre em condições de elevada restritividade, impedindo anomalias de ligação e tornando todo o processo muito fiável.

O número de fragmentos visualizados depende normalmente do poder de resolução do sistema de detecção gerando-se entre 50 a 100 fragmentos de restrição amplificados em géis desnaturantes de poliacrilamida. Este elevado número de fragmentos permite detectar polimorfismos entre estirpes muito próximas.

Outros sistemas ou variantes, como aqueles em que um dos 'primers' é marcado com um fluorocromo, e os fragmentos resolvidos por um sistemas de sequenciação automáticos, poderão permitir a detecção de um maior número de fragmentos, e aumentar ainda o poder discriminante deste método. Efectivamente, neste caso podem-se distinguir os fragmentos amplificados com diferenças de cerca de um par de bases (Ansorget *et al.*, 1992; Desai *et al.*, 2001; Landers *et al.*, 1993 e Roumagnac *et al.*, 2004). Este aspecto permitiu já a

definição de clonalidade em estudos do foro epidemiológico de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium tuberculosis*.

4.3.5.1 | Obtenção do DNA genómico

O DNA total de cerca de 100 isolados de *R. solanacearum* e de outros organismos relacionados, previamente apresentados na Tabela 4.4, foi extraído e purificado com recurso ao protocolo para pequenas quantidades de células e tecidos do 'Easy-DNA Kit' (Invitrogen, Paisley, UK).

A confirmação da qualidade do DNA extraído foi confirmada por electroforese em gel de agarose a 1% em (1X) TAE. Procedeu-se então à sua quantificação através da leitura da OD a 260 nm e a posteriores diluições de modo a tornar a sua concentração adequada para restrição e amplificação.

4.3.5.2 | Escolha das enzimas de restrição e dos adaptadores

A digestão do DNA genómico foi efectuada com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *MseI*, que possuem locais de reconhecimento com 6 e 4bp respectivamente, de acordo com o protocolo do "AFLP Analysis System for Microorganisms" (Invitrogen, Paisley, UK). Após digestão procedeu-se à inactivação enzimática pelo calor.

Os fragmentos de restrição obtidos a partir do DNA genómico foram então ligados a adaptadores específicos para estas enzimas (*EcoRI/MseI*), à temperatura ambiente, de acordo com as condições também referidas naquele Kit.

4.3.5.3 | Escolha dos 'primers' e condições de amplificação

Tratando-se de células procarióticas com genoma menos complexo foi suprimido o passo de amplificação pré-selectiva. A escolha dos 'primers' para a amplificação teve em conta a experiência passada e também as directivas do Kit. Efectivamente foi seleccionado o 'primer' *MseI* com o nucleótido selectivo C e o 'primer' *EcoRI* sem qualquer nucleótido selectivo mas marcado com o fluorocromo D3. A amplificação foi efectuada num termociclador Biometra (Goettingen, Germany), de acordo com as condições referidas no Kit.

4.3.5.4 | Separação dos fragmentos por electroforese capilar

Os fragmentos do DNA amplificado foram analisados num sequenciador automático CEQ 2000-XL (Beckman Coulter, EUA). Três microlitros do produto da amplificação selectiva foram adicionados a 30 µl de formamida desionizada e a 500 µl de DNA Size Standard – 600 (Beckman Coulter, EUA), que foi utilizado como marcador molecular interno em todas as reacções.

As amostras foram sujeitas a separação por electroforese capilar após desnaturação do DNA a 90°C durante 30 segundos. A electroforese decorreu durante 60 minutos (6 kV).

4.3.5.5 | Análise numérica dos perfis de caracteres obtidos por FAFLP

Os perfis de 'fingerprinting' foram analisados no Módulo para análise de fragmentos do CEQTM 8000 Genetic Analysis Systems (Beckman Coulter, EUA). Estes perfis foram sobrepostos e calculado o nível a partir do qual os picos densitométricos seriam considerados. A presença ou ausência de fragmentos foi registada numa matriz de dados binários, os dados exportados posteriormente para o software BioNumerics versão 4.61 (Applied Maths, Sint-Martens-Laten, Belgium) e convertidos numa matriz de similaridades, utilizando o coeficiente de Dice e agrupados por UPGMA. A robustez dos resultados obtidos foi verificada utilizando o coeficiente de Sneath & Johnson (1972), e os valores de 'bootstrap' calculados utilizando o mesmo software. Assim, a probabilidade média do erro (p), e consequentemente, a reprodutibilidade foram avaliadas utilizando as equações:

$$S_i^2 = n/(2t) \quad S^2 = 1/N.(S_A^2 + S_B^2 + \dots + S_N^2) \quad p = \frac{1}{2}(1 - \sqrt{1 - 4S^2})$$

| | | |
|---|----------------------------|--------------------------|
| S_i^2 – variância individual de um carácter | n – nº de discordâncias | S^2 – variância global |
| t – nº de duplicados | N – nº total de caracteres | |

4.3.6 | Enquadramento filogenético dos isolados Portugueses de *Ralstonia solanacearum*

Procedeu-se à amplificação de uma sequência de 750 pb, do gene da endoglucanase (*egl*), de 15 estirpes portuguesas de *R. solanacearum* escolhidas como representantes da diversidade das estirpes portuguesas de *R. solanacearum*, de acordo com os resultados da análise fenética global descritos neste capítulo (4.4.5). Introduziram-se igualmente dois isolados obtidos em 2007, identificados de acordo com métodos de rastreio e de confirmação, e caracterizados quanto ao biovar e à sequência do gene de 16S rRNA.

O DNA foi extraído de acordo com o procedimento referido em 4.3.5.1. As sequências dos 'primers' utilizados na amplificação, as concentrações dos reagentes e as condições de amplificação foram semelhantes às referidas por Fegan & Prior (2006), à excepção do volume da mistura de amplificação onde foram usados apenas 50 µl.

Confirmou-se o tamanho dos produtos amplificados por electroforese em gel de agarose a 1% com uma corrente de 5V.cm⁻¹ durante uma hora. Após visualização e documentação das referidas bandas, os produtos de amplificação foram purificados com recurso ao JETQUICK PCR Purification Spin Kit (GENOMED, Löhne, Alemanha).

Procedeu-se à sequenciação dos produtos purificados no Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos do ICAT, num sequenciador automático CEQ 2000-XL (Beckman Coulter, EUA). Os 'primers' Endo-F, Endo-R e Endo 837r foram igualmente utilizados nas reacções de sequenciação.

As sequências obtidas, em ambos os sentidos, foram corrigidas utilizando o software Chromas Lite Versão 2.1 (www.technelysium.com.au). A sobreposição das sequências obtidas, no sentido directo e inverso, permitiu obter a sequência completa que foi depois comparada por BLAST nucleotídico no site do 'National Center for Biotechnology Information' (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov), a fim de confirmar o seu nível de similaridade com as sequências presentes no 'Genebank'.

As 132 sequências existentes no 'Genebank', para gene da endoglucanase de *R. solanacearum*, foram utilizadas para análise filogenética comparativa com as sequências obtidas e corrigidas dos isolados portugueses.

O conjunto de todas as sequências foi editado no software BioEdit Versão 7.0.5.3 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html), e o seu alinhamento completo efectuado no software Clustal X Versão 1.83 (www.igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo).

As sequências foram então usadas na construção de uma árvore filogenética seguindo uma perspectiva bayesiana, utilizando o software Mr. Bayes Versão 3.0B4 (www.mrbayes.csit.fsu.edu). As árvores obtidas foram visualizadas no software Tree View (Win32) (www.taxonomy.zoology.gla.ac.uk).

4.4 | Resultados e Discussão

4.4.1 | Diferenciação nutricional dos isolados

Os resultados obtidos na caracterização nutricional de 96 isolados Portugueses de *R. solanacearum* evidenciaram uma prevalência do biovar 2 (91,7%). Constituíram clara excepção os isolados CPBF 674 e CPBF 1192, que mostraram pertencer ao biovar 1.

Os isolados NCPPB 325, NCPPB 3996, NCPPB 4005 e R 292, com origem em colecções estrangeiras e pertencentes aos biovares 1, 3, 4 e 5, respectivamente, utilizaram os diferentes substratos de forma variável conforme descrito (Hayward, 1994b).

No entanto, de entre os restantes isolados Portugueses estudados para estas características, 14 revelaram resultados atípicos apresentando-se mais próximos das características apresentadas pelos biovares 3 e 5. Contudo, foram identificados alguns problemas associados com possíveis contaminações ocorridas durante o processo de inoculação das

placas, leitura dos resultados para além do período de incubação considerado adequado, e problemas de contaminação dos próprios isolados. O estudo comparativo relativamente aos outros métodos de tipificação aplicados mostrou que, para a quase totalidade dos isolados apresentando uma classificação não esperada para a capacidade de utilização de determinados substratos carbonados, eram visualizados perfis de 'fingerprinting' compatíveis com o biovar 2 sub-fenótipo A, grupo RFLP 26. As excepções verificaram-se para os isolados CPBF 646, CPBF 648, CPBF 832, CPBF 847, CPBF 913 e CPBF 923 que apresentavam morfologia atípica das colónias, e perfis de 'fingerprinting' muito distintos dos esperados para alguns dos métodos utilizados. A repetição dos ensaios permitiu eliminar as dúvidas sobre o resultado real dos ensaios, para os restantes 8 isolados considerados duvidosos, que foram assim identificados como pertencendo ao biovar 2, por utilizarem maltose, celobiose e lactose, mas não manitol, sorbitol e dulcitol, à semelhança do que acontece na maioria dos países da Europa onde a doença existe (Hayward, 1994b; Janse, 1996).

Os isolados Portugueses CPBF 674 e CPBF 1192 foram identificados como pertencentes ao biovar 1, por não possuírem a capacidade de utilizar qualquer um dos seis substratos carbonados. Esta ocorrência recente, mostrou a necessidade de proceder a uma caracterização mais elaborada dos isolados obtidos em Portugal a partir de amostras bióticas e ambientais, uma vez que a identificação ao nível da espécie, incluindo os testes de patogenicidade em tomateiro, não reflecte a versatilidade nutricional e epidemiológica das estirpes. A caracterização infra-específica por esta via ou por outra com capacidade discriminante semelhante é por isso indispensável.

Os resultados obtidos nestes ensaios permitiram confirmar que quando utilizadas culturas puras e frescas, o meio de cultura com constituição adequada e o período de incubação correcto, obtêm-se resultados válidos, claramente distintos em termos de positividade/negatividade. Por outro lado, pela nossa experiência e através de inúmeras referências escritas, os resultados não se alteram caso o isolado seja armazenado durante períodos mais ou menos longos em condições apropriadas.

Quanto à especialização do biovar 2 nos seus três subfenótipos (Cook *et al.*, 1989; EPPO, 2004) – 2A (Grupo RFLP 26), 2A (Grupo RFLP 27) e 2T (N2) (Grupo RFLP 34)- todos os isolados portugueses previamente identificados como pertencendo ao biovar 2 de *R. solanacearum* utilizaram o inositol, mas não a trealose nem a D-ribose. Assim, os resultados obtidos permitiram classificá-los como pertencendo ao biovar 2A (Grupo RFLP 26), o que está de acordo com os padrões estabelecidos por Hayward *et al.* (1990) e Hayward (1994b). Relativamente ao isolado NCPPB 3989, este utilizou a trealose e a D-ribose, mas não o inositol, pelo que foi classificado como pertencendo ao biovar 2T. Na verdade, este isolado, com origem no Brasil, já se encontrava previamente classificado como pertencendo a este subfenótipo do biovar 2, revelando-se também deste modo a reprodutibilidade interlaboratorial deste método.

Hayward (1994a) refere que a característica biovar por si só não é suficiente para constituir uma base fidedigna a utilizar numa classificação taxonómica, mas que pode ter um papel

aditivo num estudo de análise numérica. À data, o criador desta nomenclatura referia que existia uma clara confirmação entre a diferenciação dos biovares e a separação de *R. solanacearum* em duas divisões efectuada por Cook. Contudo, reconhece a existência de alguma sobreposição entre isolados de diferentes biovares relativamente à utilização de certos substratos carbonados, nomeadamente para os isolados dos biovares 3 e 4, que possuem uma maior versatilidade em termos nutricionais.

Por outro lado, o estudo de colecções de isolados com distribuição geográfica muito heterógenea, e conhecimentos mais recentes resultantes da observação de características fenotípicas de estirpes japonesas (Horita & Tsuchiya, 2001), entre outras, reduzem o grau de confiança sobre a utilidade do biovar, mostrando a necessidade de usar características suplementares baseadas em dados serológicos e moleculares.

Apesar de algumas inconsistências, e da existência de estirpes atípicas, Denny *et al.* (2006) concluem que, apesar deste sistema de caracterização ter sido criado há 40 anos, continua a ser usado porque além de fácil, barato e reprodutível, possui uma base genética sólida. Gabriel *et al.* (2006) identificaram uma região de 22 Kb no genoma da estirpe GMI1000 que possui os genes necessários à utilização dos três alcóois derivados de hexoses, os quais parecem estar ausentes numa outra estirpe do biovar 2 (UW551), incapaz de proceder à sua utilização. Denny *et al.* (2006), embora não tenham conseguido identificar 'loci' defectivos para os biovares 1 e 4, sugerem que nas estirpes dos biovares 2, 3 e 5 os dissacáridos maltose, lactose e celobiose serão utilizados como dadores de electrões para a citocromo oxidase.

Estes dados recentes revelam que efectivamente existirá uma justificação de carácter genético, que se traduz em características fenotípicas estáveis para a maior parte dos grupos infra-específicos estabelecidos por esta via, justificando o sucesso e a aplicabilidade fidedigna deste meio de caracterização.

4.4.2 | Análise dos perfis electroforéticos das proteínas celulares totais

O método utilizado permitiu extrair com sucesso as proteínas celulares totais do conjunto de isolados de *R. solanacearum*, tendo o rendimento da extracção sido inferior para apenas duas estirpes identificadas como *B. cepacia* e *R. pickettii*. Este método de extracção, desenvolvido por Pot *et al.* (1994), tem sido utilizado com sucesso na análise de grupos bacterianos muito diversos, mostrando-se também adequado neste caso.

A reprodutibilidade da técnica foi estimada através do cálculo do coeficiente de semelhança entre os perfis de estirpes em estudo e das suas réplicas, obtidos em géis independentes ($87,0 \pm 5,05\%$, $cv=5,8\%$), e também, a partir de um dendrograma (Figura 4.4) constituído pelos perfis do marcador molecular *Psychrobacter immobilis* ($92,5 \pm 2,64\%$, $cv=2,9\%$), o que permitiu estimar os valores da reprodutibilidade média em $89,8 \pm 3,85\%$ ($cv=4,4\%$). O nível

de corte para definição de 'clusters' foi calculado tendo em conta o somatório dos valores da reprodutibilidade média e do coeficiente de variação, tendo-se definido assim o valor de 85%.

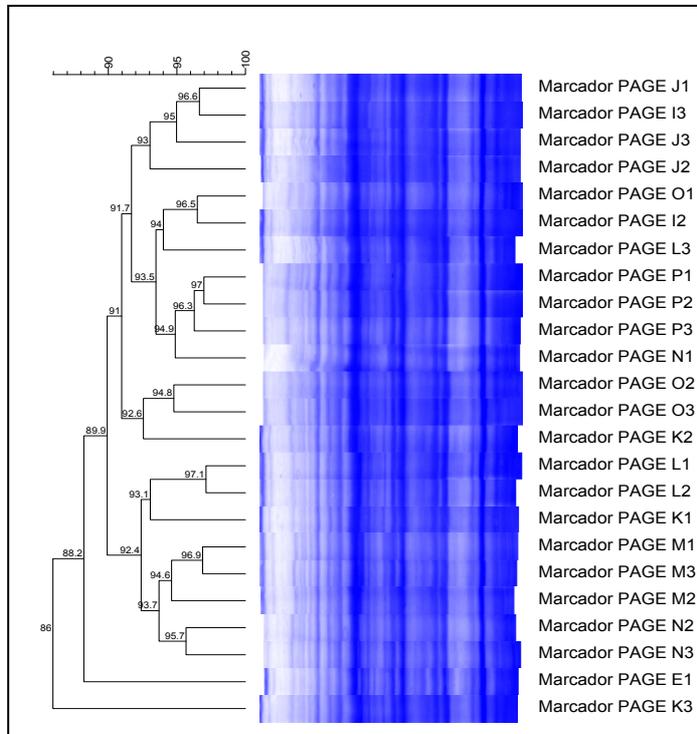


Figura 4.4 – Dendrograma obtido utilizando coeficiente de correlação linear de Pearson (r) e a distância aritmética média não ponderada (UPGMA) para 22 réplicas de *Psychrobacter immobilis* utilizadas como marcador molecular na electroforese da proteínas celulares totais por SDS-PAGE para caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum*.

O dendrograma gerado para as 88 estirpes analisadas (Figura 4.6) parece assim possuir robustez ($\rho=0,91$) desenhando-se um 'megacluster' (P) onde se incluem todas as estirpes portuguesas do subfenótipo biovar 2A, bem como outras estirpes europeias do mesmo subfenótipo ($r=71,1\%$). A única exceção reside na estirpe CPBF 917, isolada a partir de resíduos de uma unidade de transformação industrial de tubérculos de batateira da região de Palmela, aparentemente mais relacionada com *Ochrobactrum anthropii*, (IPO S306), um organismo saprófita serologicamente próximo da espécie *R. solanacearum*.

Todas as estirpes pertencentes a outros biovars e organismos relacionados com *R. solanacearum* se situam fora deste 'megacluster', à exceção da estirpe NCPPB 4005, obtida a partir do gengibre, na Filipinas, e originalmente identificada como pertencente ao biovar 4. É assim de admitir que esta estirpe pertence ao biovar 2A resultando a sua inclusão no biovar 4 de um perfil nutricional aberrante.

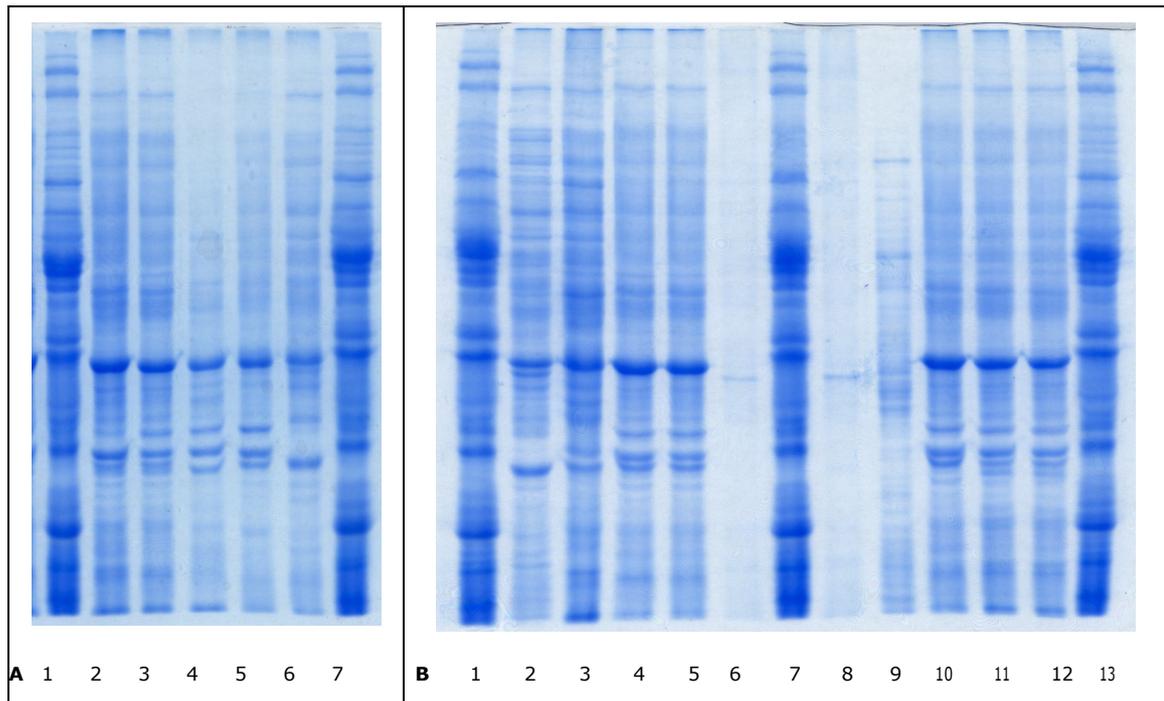


Figura 4.5 – Perfis electroforéticos de proteínas celulares totais obtidos por SDS-PAGE e corados com azul de Comassie para caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum*. Marcador molecular *Psychrobacter immobilis* linhas A1, A7, B1, B7 e B13. Estirpes em estudo: (A) **2** CPBF 803, **3** CPBF 805, **4** NCPPB 325 (Estirpe tipo) Bv1, **5** NCPPB 3989 Bv 2T, **6** NCPPB 3996 Bv3; (B) **2** NCPPB 4005 Bv4, **3** NCPPB 4028 Bv2 (Grupo RFLP 27), **4** NCPPB 4160 Bv2, **5** EURS 79 (CPBF 456) Bv2, **6** CFBP 2227 *Burkholderia cepacia*, **8** CFBP 2459 *Ralstonia pickettii*, **9** IPO S306 *Ochrobactrum anthropii*, **10** NCPPB 4156 (Estirpe tipo europeia) Bv2A, **11** CPBF 829, **12** CPBF 832.

É de referir que foi igualmente possível proceder à discriminação entre estirpes do subfenótipo 2A pertencentes ao Grupo RFLP 26 (estirpes europeias) e uma estirpe do subfenótipo 2A oriunda da Colômbia (NCPPB 4028), pertencente ao Grupo RFLP 27, que mostra ser a mais próxima das estirpes europeias ($r=60,5\%$). Efectivamente o seu perfil proteico (Figura 4.5) mostra-se distinto das estirpes europeias do biovar 2A, para as proteínas mais importantes.

A estirpe do biovar 2T, NCPPB 3989 (Grupo RFLP 33) mostrou-se mais afastada das estirpes do biovar 2, subfenótipo A apresentando um coeficiente de correlação de 51,9%. A análise visual cuidada dos géis (Figura 4.5) permite igualmente detectar nos perfis electroforéticos bandas correspondentes a proteínas discriminantes para os biovares 1, 2A, 2T, 3 e 4, com potencial diagnosticante, embora não identificadas neste trabalho.

Verificou-se a impossibilidade de concluir acerca da potencialidade de SDS-PAGE para discriminar isolados do biovar 5, por não ter sido possível integrar o isolado R 292 nestes ensaios.

No que diz respeito à diferenciação dos perfis de 'fingerprinting' das proteínas celulares totais para estirpes do biovar 2A, as estirpes PD 2762 (Holanda), IVIA 1632 (Espanha), CSL Pr 3610 (Reino Unido) e NCPPB 2505 (Suécia) mostram alguma variabilidade encontrando-se distribuídas ao longo do 'megacluster' P.

Stephani & Mazzucchi (1997), através da análise das proteínas celulares totais obtiveram um 'cluster' que incluía as estirpes da América Central, enquanto outro grupo incluía as estirpes dos biovars 3 e 4. Outros organismos relacionados em termos morfológicos, mas não patogénicos, situavam-se sempre fora daqueles grupos, à excepção de uma estirpe com perfil muito semelhante aos isolados da raça 1.

A inclusão de estirpes da zona oriental dos Andes, Europeias, Turcas e obtidas a partir de tubérculos importados do Egipto, num mesmo "cluster" com grande homogeneidade de perfis proteicos, permite mais uma vez especular sobre a dispersão da doença a partir de material de propagação vegetativa infectado com a bactéria e sobre o seu centro de origem, de acordo com as conclusões retiradas por outros autores (Smith *et al.*, 1995; Janse, 1996). Efectivamente, todas as estirpes da raça 3 (biovar 2), incluindo as da região Mediterrânica estudadas por Gillings & Fahy (1994) pareciam pertencer ao Grupo RFLP 26, e igualmente muito homogéneas quanto aos seus perfis proteicos, quando estudadas as proteínas celulares totais.

À semelhança dos resultados de Dristig & Dianese (1990), também não se obteve alteração no padrão geral das proteínas solúveis totais para as estirpes mucóides vs. secas. Efectivamente, para 44 estirpes onde se averiguou a morfologia das colónias (36 mucóides e 8 secas ou iridescentes), todas patogénicas em tomateiro, não se verificou o seu agrupamento em função desta característica fenotípica.

A Figura 4.6 mostra que a totalidade dos isolados de origem portuguesa se agrupa a um nível de semelhança $r=71,1\%$, distribuindo-se os isolados de origem ambiental ao longo do dendrograma. O mesmo dendrograma mostra que estes últimos possuem uma distribuição algo assimétrica, mostrando a existência de seis 'clusters'. No 'cluster' P1, constituído por 34 isolados, existe uma concentração significativa de isolados ambientais (20), nomeadamente, provenientes de águas superficiais (19), sendo no entanto dificilmente visualizada a presença de bandas únicas para estes isolados, parecendo a dissemelhança resultar da totalidade do perfil. O 'cluster' P2 possui um único isolado obtido de gengibre, do biovar 4, com origem nas Filipinas, e possivelmente mal classificado. O 'cluster' P3 inclui 14 isolados, dos quais sete, representam a quase totalidade dos isolados obtidos a partir de tomateiro. O grupo P4 integra oito isolados a maior parte obtidos de batateira. O 'cluster' P5 é constituído por três isolados. No 'cluster' P6, incluem-se 19 isolados, dos quais 13 provêm de lotes de batata-semente da região de Trás-os-Montes bem como de tubérculos e de campos de batateira destinados ao consumo da região do Ribatejo, e apenas duas amostras ambientais, sendo que uma é de água de rega, que embora colhida no Alentejo, provém do Rio Sorraia cujo aproveitamento hidro-agrícola serve muitos campos do Ribatejo.

Externamente a este 'megacluster' P, encontra-se ainda um único isolado de origem ambiental (CPBF 917) obtido de uma unidade industrial de processamento de tubérculos de batateira, fracamente relacionado com os outros isolados, e como já anteriormente referido possuindo grande similaridade com a estirpe IPO S306. De referir que o isolado CPBF 932 obtido a partir de batateira, obtido na Ilha de S. Miguel (Açores), possui um elevado nível de

Figura 4.6 - Dendrograma de perfis de 'fingerprinting' por SDS-PAGE, obtido utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de *Ralstonia solanacearum*, bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados ($p=0,94$).

similaridade com outros isolados no território continental situando-se dentro do 'megacluster' P.

A análise de um dendrograma (Figura 4.7) contendo os isolados provenientes de águas superficiais dos diferentes aproveitamentos hidro-agrícolas (29 estirpes) mostrou que estes isolados se agrupam a um nível de correlação de 69,3%, possuindo níveis de variabilidade elevados, os quais poderão resultar de uma estratégia adaptativa relativamente a esta matriz ou habitat. Por outro lado, a formação de pequenos clusters com elevados níveis de similaridade ($r=0,92$), e que se exemplificam na Figura 4.7, poderá reflectir a presença de uma única estirpe.

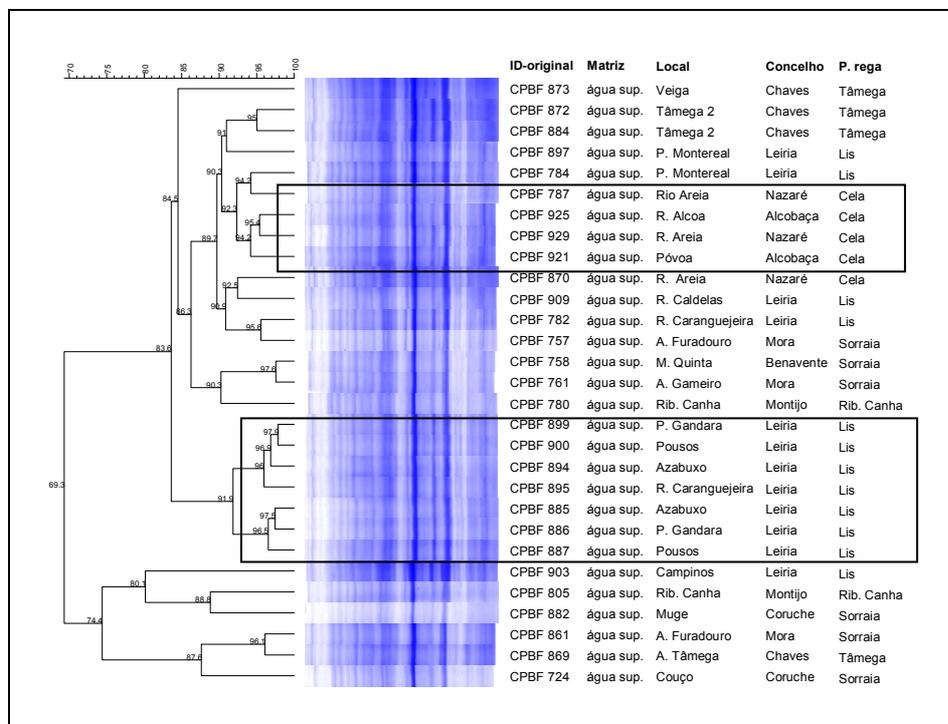


Figura 4.7 – Dendrograma de perfis SDS-PAGE utilizando o coeficiente de correlação linear de Pearson e UPGMA para caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* provenientes de águas superficiais de diferentes aproveitamentos hidroagrícolas em Portugal ($\rho=0,82$).

A análise por região permitiu a construção de dendrogramas robustos (Figura 4.8), nos quais se visualiza a formação de pequenos 'clusters' que tornam evidente alguma associação dos isolados dos aproveitamentos hidroagrícolas do Lis (Centro Litoral), Cela (Vale do Tejo) e Sorraia (Sul do Tejo).

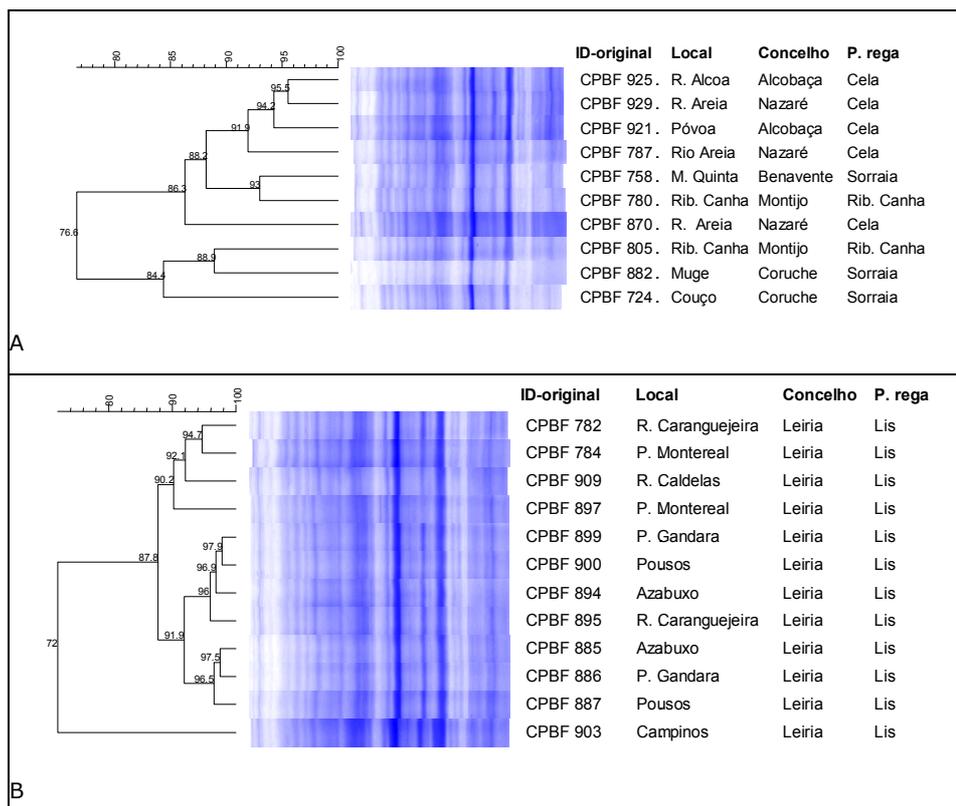


Figura 4.8 – Dendrograma de perfis SDS-PAGE utilizando o coeficiente de correlação linear de Pearson e UPGMA para caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos a partir de águas superficiais de rega doa aproveitamentos hidroagrícolas de: (A) Cela e Sorraia ($\rho=0,88$). (B) Lis ($\rho=0,76$).

Relativamente aos perfis electroforéticos de sete isolados obtidos a partir de alguns hospedeiros alternativos (Figura 4.9), verifica-se a inexistência de qualquer associação relativamente à região ou espécie hospedeira, à excepção das estirpes CPBF 874 e CPBF 877, obtidas de *Solanum nigrum* e *Senecio vulgaris*, com 98,1% de similaridade, isoladas do mesmo local, uma parcela situada em Muge, tratando-se portanto da mesma estirpe.

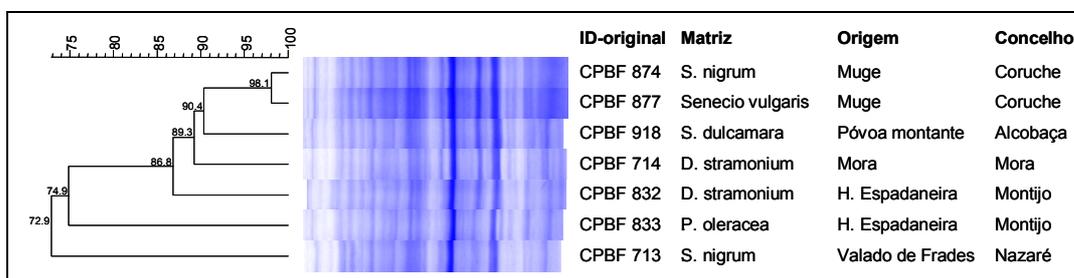


Figura 4.9 – Dendrograma de perfis SDS-PAGE utilizando o coeficiente de correlação linear de Pearson e UPGMA, para caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* provenientes de plantas espontâneas em Portugal ($\rho=0,90$).

Já no que diz respeito ao hospedeiro cultivado batateira, é notória alguma associação preocupante entre os isolados obtidos de batata-semente com origem em Trás-os-Montes e vários isolados obtidos de batata-consumo da região de Cela no ano de 1999 (Figura 4.10).

Os elevados níveis de similaridade, superiores a 95%, permitem especular sobre a origem geográfica daqueles isolados e sobre a comercialização de lotes de batata-semente potencialmente contaminados. É igualmente interessante a associação entre os isolados CPBF 473 e CPBF 568, ambos obtidos de campos com origem em batata-semente importada infectada.

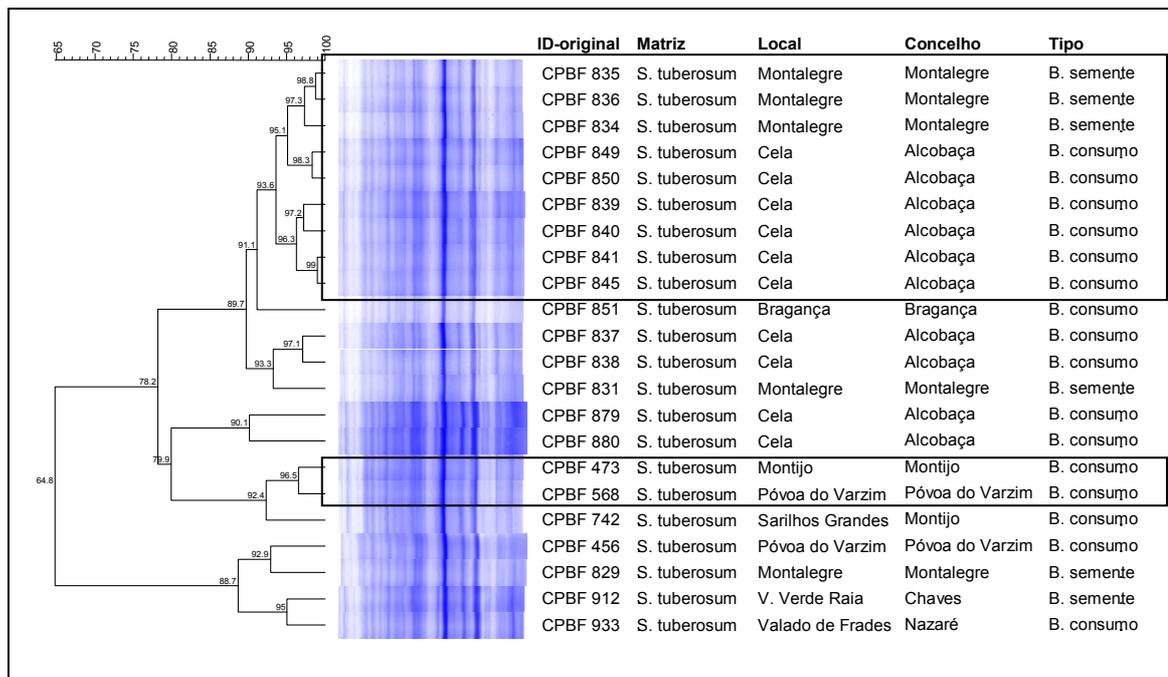


Figura 4.10 – Dendrograma de perfis SDS-PAGE utilizando o coeficiente de correlação linear de Pearson e UPGMA, para caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de *Solanum tuberosum* em Portugal ($\rho=0,86$).

No que diz respeito aos oito isolados obtidos de tomateiro, estes apresentam entre si um elevado nível de similaridade ($r=88,1\%$) não permitindo este método proceder a qualquer diferenciação relativamente à sua origem geográfica (Figura 4.11).

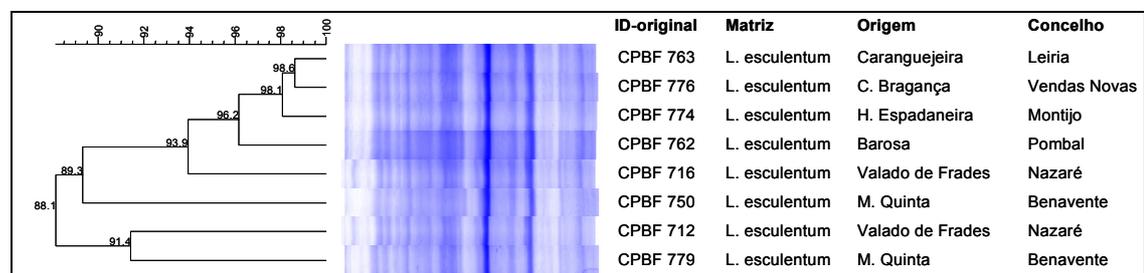


Figura 4.11 – Dendrograma de perfis SDS-PAGE utilizando coeficiente de correlação linear de Pearson e UPGMA para caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de *Lycopersicon esculentum* em Portugal ($\rho=0,85$).

A variabilidade detectada através dos perfis de 'fingerprinting' das proteínas celulares totais parece ser então uma ferramenta adequada para uma identificação infra-específica de

estirpes do biovar 2, subfenotipoA, Grupo RFLP 26 de *R. solanacearum*, embora fosse de interesse fazer um estudo comparativo introduzindo um número superior de estirpes dos sub-fenótipos 2A (Grupo RFLP 27) e 2T (Grupos RFLP 29 a 33).

Por outro lado, a existência de estirpes saprófitas ou avirulentas com 'fingerprints' proteicos muito próximos, não permite descartar a realização de ensaios de patogenicidade, não devendo por isso ser utilizada de forma independente.

A introdução de estirpes obtidas de outros hospedeiros, bem como de estirpes de origem ambiental provenientes de solos e de águas superficiais de irrigação permitiu averiguar acerca da variabilidade dos isolados associados a estas matrizes, e assim determinar o seu contributo para a riqueza da diversidade dos isolados portugueses de *R. solanacearum*; verificar se existem diferenças substanciais nos isolados destas origens; e analisar as potencialidades deste método na discriminação de possíveis populações.

4.4.3 | Análise dos perfis de 'fingerprinting' obtidos por rep-PCR e MSP-PCR

O recurso a estes métodos 'simplificados' de 'fingerprinting' genómico permitiu obter perfis polimórficos, com bandas bem individualizadas para BOX, ERIC e MSP-PCR conforme evidenciam as Figuras 4.12, 4.13 e 4.14. Os perfis obtidos para os 'primers' BOXA1R e ERIC 2 mostram ainda o elevado grau de variabilidade do genoma destas estirpes.

A utilização de lisados originou contudo alguma degradação do DNA genómico armazenado a -20°C, evidenciado pela redução da nitidez, número e qualidade dos fragmentos amplificados. Assim a utilização de lisados de suspensões aquosas obtidas de culturas puras de estirpes de referência, como controlos positivos, e já anteriormente congelados, não deverá ser recomendada.

A impossibilidade de controlar de modo sistemático as condições de migração durante a electroforese afectou também em alguns casos a qualidade da imagem adquirida. As consequências foram sobretudo notórias para a rep-PCR. Neste caso, a longa duração das corridas (aproximadamente oito horas) requer obrigatoriamente que seja efectuada em ambiente refrigerado, para evitar sobreaquecimento do tampão da tina, e consequente distorção dos géis, a qual introduzirá dificuldades acrescidas na sua posterior normalização e processamento.

No caso de MSP-PCR, a duração da electroforese, cerca de duas horas, não criou esse problema, tornando mais fácil o posterior processamento dos géis. Contudo, a utilização de voltagens adequadas à resolução dos fragmentos deve também ser tida em conta, e estritamente respeitada em estudos que envolvam a comparação de perfis em géis distintos.

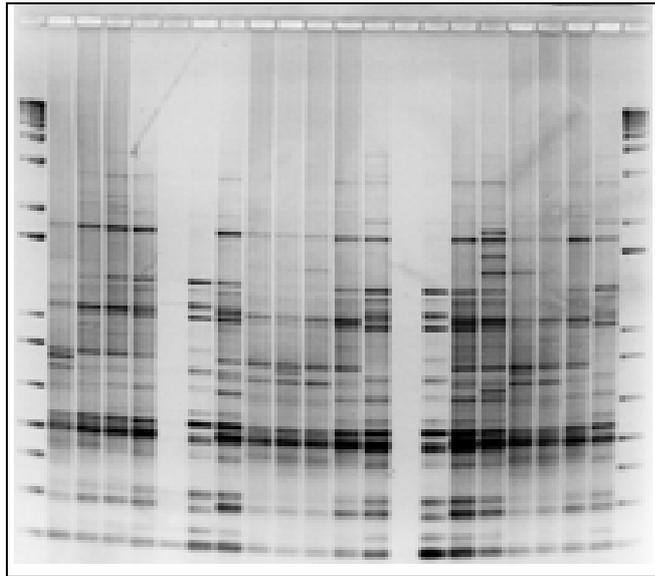


Figura 4.12 - Perfis electroforéticos de 'fingerprinting' obtidos por BOX-PCR a partir de suspensões aquosas de estirpes de *Ralstonia solanacearum*. Marcador molecular 1Kb plus (Invitrogen) - linhas **1** e **22**. Estirpes em estudo: **2** CPBF 803, **3** CPBF 805, **4** NCPPB 325 (Estirpe tipo) Bv1, **5** NCPPB 3989 Bv 2T, **6** NCPPB 3996 Bv3; (B) **2** NCPPB 4005 Bv4, **3** NCPPB 4028 Bv2 (Grupo RFLP 27), **4** NCPPB 4160 Bv2, **5** EURS 79 (CPBF 456) Bv2, **6** CFBP 2227 *Burkholderia cepacia*, **8** CFBP 2459 *Ralstonia pickettii*, **9** IPO S306 *Ochrobactrum anthropii*, **10** PD 2762 (Estirpe tipo europeia) Bv 2A, **11** CPBF 829, **12** CPBF 832.

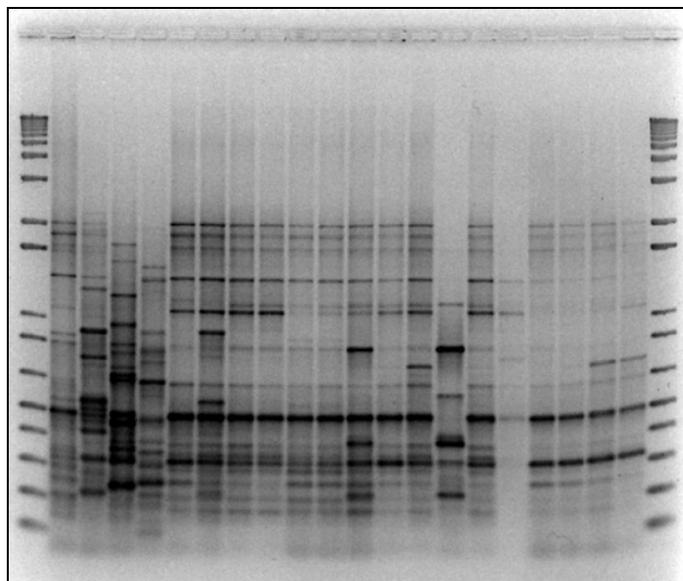


Figura 4.13 - Perfis electroforéticos de 'fingerprinting' obtidos por ERIC-PCR a partir de suspensões aquosas de estirpes de *Ralstonia solanacearum*. Marcador molecular 1Kb plus (Invitrogen) - linhas **1** e **22** Estirpes em estudo: **2** CPBF 803, **3** CPBF 805, **4** NCPPB 325 (Estirpe tipo) Bv1, **5** NCPPB 3989 Bv 2T, **6** NCPPB 3996 Bv3; (B) **2** NCPPB 4005 Bv4, **3** NCPPB 4028 Bv2 (atípica), **4** NCPPB 4160 Bv2, **5** EURS 79 (CPBF 456) Bv2, **6** CFBP 2227 *Burkholderia cepacia*, **8** CFBP 2459 *Ralstonia pickettii*, **9** IPO S306 *Ochrobactrum anthropii*, **10** NCPPB 4156 (Estirpe tipo europeia) Bv2A, **11** CPBF 829, **12** CPBF 832.

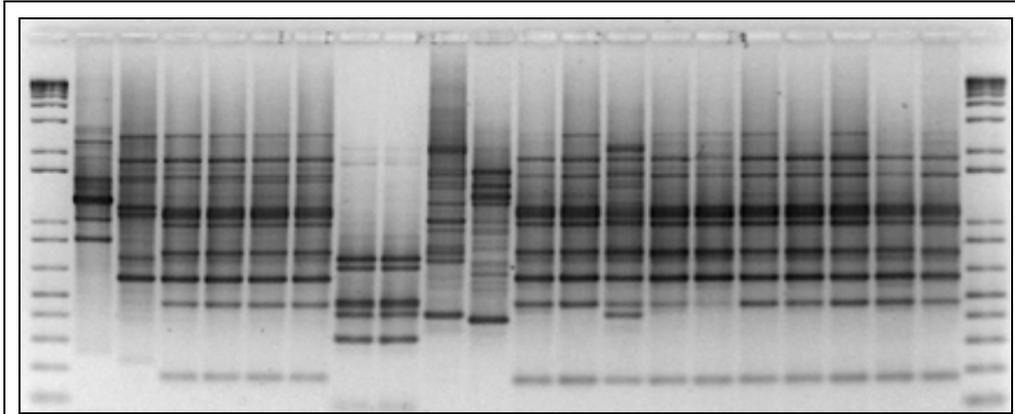


Figura 4.14 - Perfis electroforéticos de 'fingerprinting' obtidos por MSP-PCR a partir de suspensões aquosas de estirpes de *Ralstonia solanacearum*. Marcador molecular 1Kb plus (Invitrogen) - linhas **1 e 22** Estirpes em estudo: 2 CPBF 803, 3 CPBF 805, 4 NCPPB 325 (Estirpe tipo) Bv1, 5 NCPPB 3989 Bv 2T, 6 NCPPB 3996 Bv3; (B) 2 NCPPB 4005 Bv4, 3 NCPPB 4028 Bv2 (atípica), 4 NCPPB 4160 Bv2, 5 EURS 79 (CPBF 456) Bv2, 6 CFBP 2227 Burkholderia cepacia, 8 CFBP 2459 Ralstonia pickettii, 9 IPO S306 Ochrobactrum anthropii, 10 NCPPB 4156 (Estirpe tipo europeia) Bv2A, 11 CPBF 829, 12 CPBF 832.

A falta de um controlo sistemático de todos estes parâmetros é condicionante da qualidade final do 'fingerprint' obtido, e deverá ser tido em conta na gestão da qualidade em laboratórios que prestem serviços de diagnóstico recorrendo a técnicas biomoleculares.

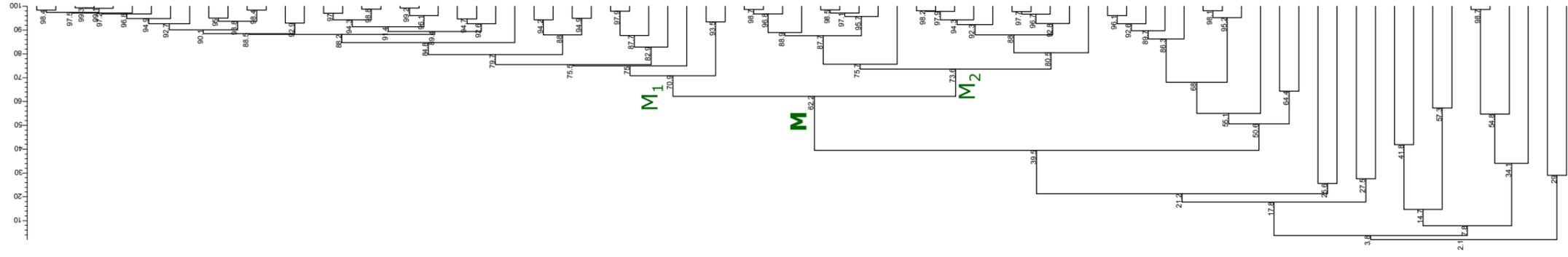
A utilização dos valores do coeficiente de similaridade de Pearson para comparação do nível de semelhança entre o isolado e a sua réplica, para 10% dos isolados utilizados em cada um dos métodos, permitiu estimar os valores da reprodutibilidade média para os métodos de 'fingerprinting' utilizados (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Reprodutibilidade média, desvio padrão (s) e coeficiente de variação obtidos em diferentes métodos de 'fingerprinting' genómico, utilizando lisados bacterianos e condições de electroforese pouco padronizadas.

| | ERIC-PCR | BOX-PCR | MSP-PCR |
|----|----------|---------|---------|
| X | 79,22 | 90,24 | 88,44 |
| s | 5,97 | 6,23 | 7,06 |
| cv | 7,53 | 6,90 | 7,98 |

Os perfis de 'fingerprinting' de 81 isolados gerados por MSP-PCR, utilizando as condições supra referidas, permitiram construir um dendrograma (Figura 4.15) com um coeficiente de correlação cofenética de 0,94, mostrando assim uma elevada coerência com os dados originais. Dendrogramas parciais igualmente robustos foram obtidos para as estirpes portuguesas de *R. solanacearum* e para estirpes de origem ambiental, com coeficientes de correlação cofenética de 0,92 (n=67) e de 0,94 (n=34). Estes valores situam-se nitidamente acima dos limites de qualidade (0,70 - 0,80) descritos por Priest & Williams (1993), validando a aceitação das estruturas hierárquicas obtidas.

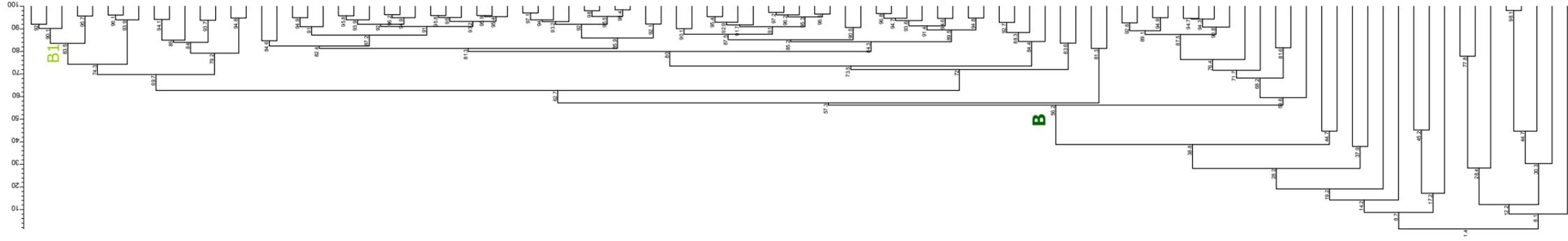
M 13



| ID-original | Espécie | Bv | Matriz | Local | Concelho |
|-------------|-----------------|-----------|--------------------|------------------|------------|
| CPBF 899 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Gandara | Leiria |
| CPBF 903 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Campinos | Leiria |
| CPBF 894 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Azabuxo | Leiria |
| CPBF 900 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Pousos | Leiria |
| CPBF 897 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Montereal | Leiria |
| CPBF 886 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Gandara | Bragança |
| CPBF 851 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Bragança | Leiria |
| CPBF 887 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Pousos | Leiria |
| CPBF 848 | R. solanacearum | biovar 2A | solo | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 855 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria |
| CPBF 869 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Tâmega | Chaves |
| CPBF 849 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 850 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 905 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Fronteira 2 | Chaves |
| CPBF 861 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Furadouro | Mora |
| CPBF 875 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Muge | Conuche |
| CPBF 878 | R. solanacearum | biovar 2A | U. urens | Muge | Conuche |
| CPBF 873 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Veiga | Chaves |
| CPBF 874 | R. solanacearum | biovar 2A | S. nigrum | Muge | Conuche |
| CPBF 870 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Areia | Nazaré |
| CPBF 872 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Tâmega 2 | Chaves |
| CPBF 871 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Areia | Nazaré |
| CPBF 883 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Tâmega | Chaves |
| CPBF 885 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Azabuxo | Leiria |
| CPBF 882 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Muge | Conuche |
| CPBF 877 | R. solanacearum | biovar 2A | Senecio vulgaris | Muge | Conuche |
| CPBF 914 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Muge | Conuche |
| CPBF 884 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Tâmega 2 | Chaves |
| CPBF 912 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | V. Verde Real | Chaves |
| CPBF 925 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Alcoa | Alcobaça |
| CPBF 929 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Areia | Nazaré |
| CPBF 933 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | V. Frades | Nazaré |
| CPBF 761 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Gameiro | Mora |
| CPBF 793 | R. solanacearum | biovar 2A | resíduo industrial | Sopragol | Mora |
| CPBF 895 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria |
| CPBF 880 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 881 | R. solanacearum | biovar 2A | solo | Muge | Conuche |
| CPBF 839 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 840 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 845 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 846 | R. solanacearum | biovar 2A | solo | H. Espadaneira | Montijo |
| IVIA 1632 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Espanha | nd |
| NCPPB 2505 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Suécia | nd |
| CPBF 456 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | P. Varzim | P. Varzim |
| CSLP 3610 | R. solanacearum | biovar 2A | nd | nd | nd |
| NCPPB 4028 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Colômbia | nd |
| CPBF 835 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 836 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 834 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 838 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 837 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| PD 2762 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Holanda | nd |
| CPBF 829 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 832 | R. solanacearum | biovar 2A | D. stramonium | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 833 | R. solanacearum | biovar 2A | P. oleracea | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 831 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 916 | R. solanacearum | biovar 2A | S. nigrum | Muge | Conuche |
| CPBF 918 | R. solanacearum | biovar 2A | S. dulcamara | Póvoa montante | Alcobaça |
| CPBF 917 | R. solanacearum | biovar 2A | resíduo industrial | Eurobatata | Palmela |
| CPBF 915 | R. solanacearum | biovar 2A | P. arenastrum | Muge | Conuche |
| CPBF 922 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Póvoa montante | Alcobaça |
| CPBF 907 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Fronteira 2 | Chaves |
| CPBF 933 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | V. Frades | Nazaré |
| CPBF 921 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Póvoa | Alcobaça |
| CPBF 913 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Azabuxo | Leiria |
| CPBF 923 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | C. Areia | Alcobaça |
| NCPPB 325 | R. solanacearum | biovar 1 | L. esculentum | EUA | nd |
| CPBF 747 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cadafaz | C. Beira |
| NCPPB 3989 | R. solanacearum | biovar 2T | S. tuberosum | Brasil | nd |
| IPO S306 | O. anthropii | nd | nd | Holanda | nd |
| CPBF 847 | R. solanacearum | na | solo | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 646 | R. solanacearum | na | L. esculentum | V. Frades | Nazaré |
| NCPPB 3996 | R. solanacearum | biovar 3 | L. esculentum | Peru | nd |
| CPBF 752 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | H. Montinho | Montijo |
| CPBF 742 | R. solanacearum | Biovar 2A | S. tuberosum | S. Grandes | Montijo |
| CPBF 2227 | B. cepacia | nd | nd | nd | nd |
| CPBF 2459 | R. pickettii | nd | nd | nd | nd |
| NCPPB 4005 | R. solanacearum | biovar 4 | Z. officinale | Filipinas | nd |
| CPBF 648 | R. solanacearum | na | água de irrigação | A. Furadouro | Mora |
| R 288 | R. solanacearum | biovar 5 | Monus sp. | China | nd |
| PD 2778 | Raistonia sp. | nd | nd | nd | nd |

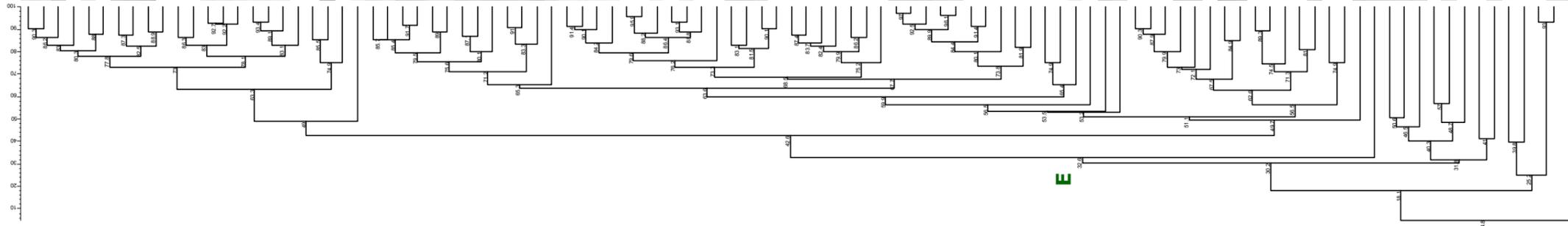
4.15 - Dendrograma de perfis de 'fingerprinting' por MSP-PCR ('primer' csm13), obtido utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de *Ralstonia solanacearum*, bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados ($p=0,94$).

BOX A1R



| ID-original | Espécie | Bv | Matriz | Local | Concelho |
|-------------|-----------------|-----------|--------------------|------------------|------------|
| NCPPB 4028 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Colômbia | nd |
| PD 2762 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Holanda | nd |
| CSLPT 3610 | R. solanacearum | biovar 2A | nd | nd | nd |
| IVIA 1632 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Espanha | nd |
| NCPPB 2505 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Suécia | Nazaré |
| CPBF 929 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Areia | Nazaré |
| CPBF 933 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | V. Frades | Alcobaça |
| CPBF 925 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Alcoa | Alcobaça |
| CPBF 914 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Muge | Conche |
| CPBF 915 | R. solanacearum | biovar 2A | P. arenastum | Muge | Conche |
| CPBF 916 | R. solanacearum | biovar 2A | S. nigrum | Muge | Conche |
| CPBF 917 | R. solanacearum | biovar 2A | resíduo industrial | Palmeira | Palmeira |
| CPBF 918 | R. solanacearum | biovar 2A | S. dulcamara | Póvoa montante | Alcobaça |
| CPBF 922 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Póvoa montante | Alcobaça |
| CPBF 921 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Póvoa | Alcobaça |
| CPBF 871 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Areia | Nazaré |
| CPBF 875 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Muge | Conche |
| CPBF 897 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Monteal | Leiria |
| CPBF 899 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Gandara | Leiria |
| CPBF 716 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | V. Frades | Nazaré |
| CPBF 829 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 831 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 713 | R. solanacearum | biovar 2A | S. nigrum | V. Frades | Nazaré |
| CPBF 805 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Rib. Canha | Montijo |
| CPBF 750 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Rib. Canha | Montijo |
| CPBF 887 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | M. Quinta | Benavente |
| CPBF 884 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Azabuxo | Leiria |
| CPBF 568 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Pousos | Leiria |
| CPBF 712 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Varzim | Leiria |
| CPBF 767 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | P. Varzim | Leiria |
| CPBF 834 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | V. Frades | Chaves |
| CPBF 835 | R. solanacearum | biovar 2A | so | M. Quinta | Conche |
| CPBF 803 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 883 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 789 | R. solanacearum | biovar 2A | so | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 785 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Tâmega | Chaves |
| CPBF 782 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Águas Belas | Conche |
| CPBF 784 | R. solanacearum | biovar 2A | so | Barosa | Conche |
| CPBF 873 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caranguejeira | Pombal |
| CPBF 874 | R. solanacearum | biovar 2A | so | Veiga | Leiria |
| CPBF 909 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Monteal | Leiria |
| CPBF 912 | R. solanacearum | biovar 2A | S. nigrum | Muge | Chaves |
| CPBF 900 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caldeias | Conche |
| CPBF 903 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | V. Verde Raia | Chaves |
| CPBF 905 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Pousos | Leiria |
| CPBF 886 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Campinos | Leiria |
| CPBF 851 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Fronteira 2 | Chaves |
| CPBF 870 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Leiria | Chaves |
| CPBF 855 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | P. Gandara | Leiria |
| CPBF 851 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cadaífaz | C. Beira |
| CPBF 839 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Couço | Conche |
| CPBF 840 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Caranguejeira | Leiria |
| CPBF 838 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Sarilhos Grandes | Montijo |
| CPBF 845 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Barosa | Pombal |
| CPBF 878 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | P. Varzim | Leiria |
| CPBF 880 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | P. Varzim | Leiria |
| CPBF 846 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Tâmega 2 | Chaves |
| CPBF 877 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Tâmega | Chaves |
| CPBF 759 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Areia | Nazaré |
| CPBF 761 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria |
| CPBF 473 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Bragança | Leiria |
| CPBF 861 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 788 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 758 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 833 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 892 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 752 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 776 | R. solanacearum | biovar 2A | U. urens | Muge | Conche |
| CPBF 770 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 779 | R. solanacearum | biovar 2A | so | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 715 | R. solanacearum | biovar 2A | S. vulgans | Muge | Conche |
| CPBF 885 | R. solanacearum | biovar 2A | so | H. Monteal | Montijo |
| CPBF 850 | R. solanacearum | biovar 2A | so | A. Gameiro | Mora |
| CPBF 881 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Montijo | Montijo |
| CPBF 872 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Furadouro | Mora |
| CPBF 646 | R. solanacearum | na | água de irrigação | M. Quinta | Benavente |
| CPBF 793 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | H. Espadaneira | Montijo |
| R 286 | R. solanacearum | biovar 5 | P. oleracea | Muge | Conche |
| CPBF 847 | R. solanacearum | na | água de irrigação | H. Monteal | Montijo |
| NCPPB 3989 | R. solanacearum | biovar 2T | so | A. Gameiro | Mora |
| CPBF 832 | R. solanacearum | na | so | Montijo | Montijo |
| PD 2778 | R. solanacearum | na | D. stramonium | H. Espadaneira | nd |
| CPBF 774 | R. solanacearum | biovar 2A | so | nd | nd |
| CPBF 923 | R. solanacearum | na | L. esculentum | H. Espadaneira | Montijo |
| NCPPB 3986 | R. solanacearum | biovar 3 | água de irrigação | Casal da areia | Alcobaça |
| NCPPB 4005 | R. solanacearum | biovar 4 | L. esculentum | Perú | nd |
| CPBF 325 | R. solanacearum | biovar 1 | Z. officinale | Filipinas | nd |
| CFBP 2227 | R. solanacearum | nd | L. esculentum | EUA | nd |
| CPBF 2459 | B. cepacia | nd | nd | nd | nd |
| CPBF 648 | R. picketti | na | nd | nd | nd |
| IPO S306 | R. solanacearum | na | água de irrigação | A. Furadouro | Mora |
| CPBF 913 | R. solanacearum | na | nd | Holanda | nd |
| | | | água de irrigação | Azabuxo | Leiria |

Figura 4.16 – Dendrograma de perfis de 'fingerprinting' por BOX-PCR ('primer' BOX A1R), obtido utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de *Ralstonia solanacearum*, bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados ($p=0,94$).



| ID original | Espécie | Biovar | Matriz | Origem | Concelho | P. rega |
|-------------|-----------------|-----------|---------------------|---------------------|-----------------|------------|
| CPBF 849 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | |
| CPBF 850 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | Cela |
| CPBF 473 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Monjolo | Monjolo | |
| CPBF 870 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Areia | Nazaré | Cela |
| CPBF 848 | R. solanacearum | biovar 2A | sob | H. Espadaneira | Monjolo | Rib. Canha |
| CPBF 871 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | R. Areia | Nazaré | Cela |
| CPBF 851 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Bragança | Bragança | |
| CPBF 855 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria | Lis |
| CPBF 861 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Furadouro | Mora | Sorraia |
| CPBF 869 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Tâmega | Chaves | Tâmega |
| CPBF 903 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Campinos | Leiria | Lis |
| CPBF 905 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Fronteira 2 | Chaves | Tâmega |
| CPBF 885 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Fronteira 2 | Chaves | Lis |
| CPBF 886 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Azabuko | Leiria | Lis |
| CPBF 887 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Gandara | Leiria | Lis |
| CPBF 887 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Pousos | Leiria | Lis |
| CPBF 887 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Montereal | Leiria | Lis |
| CPBF 889 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Gandara | Leiria | Lis |
| CPBF 895 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Gandara | Leiria | Lis |
| CPBF 912 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | V. Verde Rala | Chaves | |
| CPBF 872 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Tâmega 2 | Chaves | Tâmega |
| CPBF 873 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Veiga | Chaves | Tâmega |
| CPBF 909 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caidelas | Leiria | Lis |
| CPBF 894 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Azabuko | Leiria | Lis |
| CPBF 840 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | Cela |
| CPBF 845 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | Cela |
| CPBF 714 | R. solanacearum | biovar 2A | D. stramonium | Mora | Mora | Sorraia |
| CPBF 715 | R. solanacearum | biovar 2A | sob | Valado de Frades | Nazaré | Cela |
| CPBF 839 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | Cela |
| CPBF 846 | R. solanacearum | biovar 2A | sob | H. Espadaneira | Monjolo | Rib. Canha |
| CPBF 750 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | M. Quinta | Benevente | Sorraia |
| CPBF 757 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Furadouro | Mora | Sorraia |
| CPBF 712 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Valado de Frades | Nazaré | Cela |
| CPBF 875 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Muge | Conche | Sorraia |
| CPBF 877 | R. solanacearum | biovar 2A | Senecio vulgaris | Muge | Conche | Sorraia |
| CPBF 874 | R. solanacearum | biovar 2A | S. nigrum | Muge | Conche | Sorraia |
| CPBF 758 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | M. Quinta | Benevente | Sorraia |
| CPBF 882 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Muge | Conche | Sorraia |
| CPBF 883 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Muge | Conche | Sorraia |
| CPBF 881 | R. solanacearum | biovar 2A | sob | A. Tâmega | Chaves | Tâmega |
| CPBF 884 | R. solanacearum | biovar 2A | sob | Tâmega 2 | Chaves | Tâmega |
| CPBF 929 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Areia | Nazaré | Cela |
| CPBF 933 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Valado de Frades | Nazaré | Cela |
| CPBF 880 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Valado de Frades | Nazaré | Cela |
| CPBF 900 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Pousos | Alcobaça | Cela |
| CPBF 915 | R. solanacearum | biovar 2A | Polygonum arenarium | Cela | Alcobaça | Cela |
| CPBF 914 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Muge | Leiria | Lis |
| CPBF 878 | R. solanacearum | biovar 2A | Urtica urens | Muge | Conche | Sorraia |
| CPBF 716 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Valado de Frades | Nazaré | Cela |
| CPBF 724 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Coço | Conche | Sorraia |
| CPBF 922 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Póvoa montante | Conche | Sorraia |
| CPBF 925 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Alcoa | Alcobaça | Cela |
| CPBF 779 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | M. Quinta | Benevente | Sorraia |
| CPBF 803 | R. solanacearum | biovar 2A | sob | H. Espadaneira | Monjolo | Rib. Canha |
| CPBF 805 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Rib. Canha | Monjolo | Rib. Canha |
| PD 2762 | R. solanacearum | biovar 2 | S. tuberosum | Holandia | nd | |
| CPBF 776 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | C. Bragança | Vendas Novas | Rib. Canha |
| CPBF 789 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Águas Belas | Conche | Sorraia |
| CPBF 793 | R. solanacearum | biovar 2A | resíduo industrial | Sorraiol | Mora | Sorraia |
| CPBF 759 | R. solanacearum | biovar 2A | sob | H. Montinho | Mora | Rib. Canha |
| CPBF 761 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Gameiro | Mora | Rib. Canha |
| CPBF 747 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cadiaz | Mora | Sorraia |
| CPBF 762 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Barosa | Pombal | Liz |
| CPBF 763 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Caranguejeira | Leiria | Liz |
| CPBF 780 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Rib. Canha | Monjolo | Rib. Canha |
| CPBF 782 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria | Rib. Canha |
| PD 1941 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Portugal | nd | Lis |
| CPBF 767 | R. solanacearum | biovar 2A | sob | M. Quinta | Benevente | Sorraia |
| CPBF 784 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Montereal | Leiria | Lis |
| CPBF 770 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | H. Pavões | Conche | Sorraia |
| CPBF 788 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Chaves | Chaves | Tâmega |
| CPBF 847 | R. solanacearum | na | sob | H. Espadaneira | Monjolo | Rib. Canha |
| CPBF 923 | R. solanacearum | na | água de irrigação | Casal da areia | Alcobaça | Cela |
| CPBF 742 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Saillhos Grandes | Monjolo | Cela |
| CSLP-3610 | R. solanacearum | biovar 2A | nd | nd | nd | |
| CPBF 456 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Póvoa do Varzim | Póvoa do Varzim | |
| NCPFB 2505 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Suécia | nd | |
| I/A 1632 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Espanha | nd | |
| CPBF 829 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre | |
| CPBF 831 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre | |
| CPBF 772 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Foros de Salvaterra | S. Magos | |
| CPBF 832 | R. solanacearum | na | D. stramonium | H. Espadaneira | Monjolo | Rib. Canha |
| CPBF 833 | R. solanacearum | biovar 2A | P. oleracea | H. Espadaneira | Monjolo | Rib. Canha |
| CPBF 835 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre | |
| CPBF 836 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre | |
| CPBF 834 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre | |
| CPBF 837 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | Cela |
| CPBF 838 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | Cela |
| CPBF 785 | R. solanacearum | biovar 2A | sob | Barosa | Pombal | Lis |
| CPBF 787 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Rio Areia | Nazaré | Cela |
| CPBF 713 | R. solanacearum | biovar 2A | S. nigrum | Valado de Frades | Nazaré | Cela |
| CPBF 568 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Póvoa do Varzim | Póvoa do Varzim | |
| CPBF 646 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Valado de Frades | Nazaré | Cela |
| CPBF 648 | R. solanacearum | na | água de irrigação | A. Furadouro | Mora | Sorraia |
| R 288 | R. solanacearum | biovar 5 | Morus sp. | China | nd | |
| NCPFB 3989 | R. solanacearum | biovar 2T | S. tuberosum | Brazil | nd | |
| NCPFB 4028 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Colômbia | nd | |
| NCPFB 325 | R. solanacearum | biovar 1 | L. esculentum | EUA | nd | |
| CPBF 913 | R. solanacearum | na | água de irrigação | Azabuko | Leiria | Lis |
| IPO-S306 | O. anthraci | nd | nd | Holandia | nd | |
| NCPFB 3996 | R. solanacearum | biovar 3 | L. esculentum | Petu | nd | |
| NCPFB 4005 | R. solanacearum | biovar 4 | Zingiber officinale | Filipinas | nd | |
| CFBP 2227 | B. cepacia | nd | nd | nd | nd | |
| CPBF 2459 | R. pickettii | nd | nd | nd | nd | |
| CPBF 752 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | H. Montinho | Monjolo | Rib. Canha |

Figura 4.17 - Dendrograma de perfis de 'fingerprinting' por ERIC-PCR ('primer' ERIC2), obtido utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de *Ralstonia solanacearum*, bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados ($p=0,82$).

O dendrograma constituído pela totalidade dos isolados mostra claramente diferentes tipos de perfis e a existência de 'clusters' com diferente significado. Um 'megacluster' (M) constituído por 56 estirpes agrupadas a 62% de semelhança integra todos os isolados portugueses e europeus do biovar 2A, os quais possuem um perfil muito homogéneo diferindo em poucas bandas. Exteriormente, existem vários 'clusters' com um único isolado onde se individualizam todas as estirpes pertencentes aos biovars 1 e 2T, 3 e 4 e 5, outras pertencentes a espécies e géneros relacionados, bem como isolados portugueses de perfil atípico mas não relacionado com o perfil de qualquer biovar. *B. cepacia* e *R. pickettii* apresentam perfis semelhantes ($r=99\%$) mostrando-se tão próximas de *R. solanacearum* como estirpes dos biovars 3 e 4. O isolado NCPPB 4028 (Grupo RFLP 27), embora forme um 'cluster' com um indivíduo único, insere-se dentro do 'megacluster' que integra todas as estirpes do biovar 2A/Grupo RFLP 26, não se mostrando MSP-PCR, nestas condições, adequada para discriminar a este nível.

Para um nível de semelhança superior ($r=70\%$), o 'megacluster' divide-se em dois 'clusters' (M1 e M2), com aparente significado biológico, onde predominam os isolados obtidos de águas superficiais (M1), ou a quase totalidade de isolados obtidos de batateira (M2), nacionais e estrangeiros.

Parece também haver alguma associação entre a semelhança dos isolados e a sua proximidade geográfica, a qual é, no entanto, condicionada pelo hospedeiro. Contudo, para determinada matriz e região, verifica-se a formação de alguns 'microclusters' com isolados possuindo entre 96 e 98% de semelhança, indiciando a presença de uma única estirpe para cada 'cluster'.

Estes resultados parecem mostrar a grande homogeneidade dos isolados do biovar 2A de *R. solanacearum*, verificando-se que, apesar dos procedimentos pouco padronizados utilizados, é possível eleger um perfil-tipo para estes isolados e eventualmente inferir sobre a sua origem clonal. Relativamente a estirpes dos outros biovars, maior número de estirpes deveria ser estudado a fim de se poder conhecer a sua variabilidade. Todas as estirpes portuguesas aberrantes possuem perfis de MSP-PCR muito distintos, tornando difícil verificar se pertencem a outras linhagens.

A aplicação de BOX-PCR (Figura 4.16) e de ERIC-PCR (Figura 4.17) permitiu a construção de dendrogramas robustos para as estirpes em estudo, com valores do coeficiente de correlação cofenética de 0,94 e 0,82, respectivamente.

Entre os métodos utilizados, apesar de se ter assumido um nível de corte de modo a ultrapassar os possíveis erros de análise decorrentes da baixa reprodutibilidade obtida (Tabela 4.5), ERIC-PCR mostra ser o método que possui maior poder discriminante, como evidenciam os valores dos índices de diversidade de Simpson (D) e de Shannon-Weiner (J') constantes da Tabela 4.6.

BOX- e ERIC-PCR conduziram a resultados muito semelhantes aos revelados por MSP-PCR, apresentando, no entanto, um maior número de polimorfismos que são decorrentes da maior

complexidade dos perfis gerados por estes métodos. Verificou-se igualmente a presença de um perfil-tipo para a maior parte dos isolados pertencentes ao biovar 2A, à excepção de algumas estirpes aberrantes.

Tabela 4.6 – Valores dos índices de diversidade de Simpson (D) e de Shannon-Weiner (H' e J') obtidos para MSP-PCR e rep-PCR.

| | MSP-PCR | BOX-PCR | ERIC-PCR |
|-------------|---------|---------|----------|
| Nº isolados | 81 | 101 | 104 |
| Nº grupos | 26 | 29 | 33 |
| D | 0,869 | 0,764 | 0,923 |
| H' | 1,106 | 0,997 | 1,282 |
| J' | 0,782 | 0,682 | 0,844 |

Para ambos os 'primers' é possível proceder à discriminação do subfenótipo do biovar de estirpes de *R. solanacearum* situando-se, externamente a um 'megacluster' composto pela generalidade dos isolados do biovar 2A, o isolado do biovar 2T bem como as estirpes dos outros biovars e o isolado de *Ochrobactrum anthropii*. Os isolados de *B. cepacia* e *R. pickettii* apresentam-se semelhantes, não sendo discriminados em ambas as técnicas.

De referir que o isolado PD 1941, obtido a partir de tomateiro por M. Oliveira em 1960, possui um perfil genericamente semelhante, incluindo-se dentro do 'cluster' de biovar 2A por ERIC-PCR. Deste modo confirma-se a identidade de estirpes do biovar 2, subfenótipo A em Portugal antes da recorrência da doença em 1995.

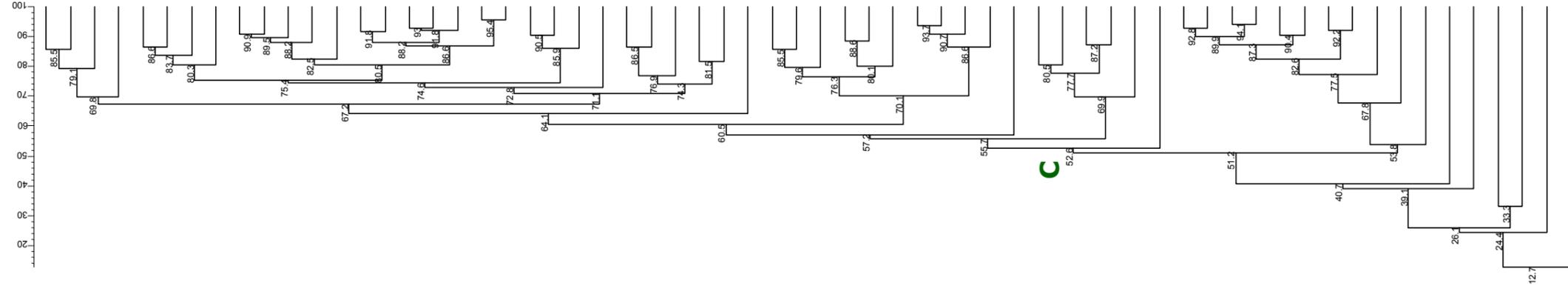
Já para os outros isolados do biovar 2A, é curioso notar que o dendrograma produzido a partir de BOX-PCR, associa num pequeno 'cluster' (B1) ($r=83,5\%$) todas as estirpes estrangeiras, incluindo as estirpes europeias e uma estirpe Colombiana, que se mostram ligeiramente mais diversas entre si, relativamente a outros pequenos 'clusters' de isolados portugueses.

É comum a formação de 'pequenos clusters' com elevado nível de similaridade em que se verifica uma forte associação geográfica a nível regional, determinando a existência de uma única estirpe para cada 'cluster'.

Nenhum dos métodos usados revelou qualquer associação entre o perfil de 'fingerprinting' e a morfologia das colónias ou a patogenicidade das estirpes em tomateiro.

O dendrograma conjunto de MSP-PCR, BOX e ERIC-PCR (Figura 4.18) evidencia, para os isolados obtidos em Portugal, a presença de pequenos grupos de isolados onde ocorre associação entre a área geográfica e a matriz, confirmando a presença de uma única estirpe para cada grupo. Frequentemente existe uma associação com níveis de semelhança inferiores, para isolados obtidos de águas superficiais de irrigação ou de batata-semente obtidos da região de Trás-os-Montes, podendo mais uma vez especular-se acerca da comercialização de material de propagação vegetativa contaminado com infecções latentes

MSP-PCR BOX-PCR ERIC-PCR



| ID-original | Espécie | Matriz | Local | Concelho |
|-------------|-----------------|--------------------|------------------|-------------------|
| CPBF 881 | R. solanacearum | solo | Muge | Coruche |
| CPBF 882 | R. solanacearum | água de irrigação | Muge | Coruche |
| CPBF 850 | R. solanacearum | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 895 | R. solanacearum | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria |
| CPBF 883 | R. solanacearum | água de irrigação | A. Tâmega | Chaves |
| CPBF 884 | R. solanacearum | água de irrigação | Tâmega 2 | Chaves |
| CPBF 912 | R. solanacearum | S. tuberosum | V. Verde Raia | Chaves |
| CPBF 914 | R. solanacearum | água de irrigação | Muge | Coruche |
| CPBF 855 | R. solanacearum | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria |
| CPBF 851 | R. solanacearum | S. tuberosum | Bragança | Bragança |
| CPBF 869 | R. solanacearum | água de irrigação | A. Tâmega | Chaves |
| CPBF 870 | R. solanacearum | água de irrigação | R. Areia | Nazaré |
| CPBF 871 | R. solanacearum | água de irrigação | R. Areia | Nazaré |
| CPBF 905 | R. solanacearum | água de irrigação | Fronteira 2 | Chaves |
| CPBF 903 | R. solanacearum | água de irrigação | Campinos | Leiria |
| CPBF 885 | R. solanacearum | água de irrigação | Azabuxo | Leiria |
| CPBF 887 | R. solanacearum | água de irrigação | Pousos | Leiria |
| CPBF 886 | R. solanacearum | água de irrigação | P. Gandara | Leiria |
| CPBF 897 | R. solanacearum | água de irrigação | P. Montereal | Leiria |
| CPBF 899 | R. solanacearum | água de irrigação | P. Gandara | Leiria |
| CPBF 873 | R. solanacearum | água de irrigação | Veiga | Chaves |
| CPBF 874 | R. solanacearum | S. nigrum | Muge | Coruche |
| CPBF 875 | R. solanacearum | L. esculentum | Muge | Coruche |
| CPBF 894 | R. solanacearum | água de irrigação | Azabuxo | Leiria |
| CPBF 878 | R. solanacearum | U. urens | Muge | Coruche |
| CPBF 877 | R. solanacearum | S. vulgaris | Muge | Coruche |
| CPBF 880 | R. solanacearum | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 761 | R. solanacearum | água de irrigação | A. Gameiro | Mora |
| CPBF 900 | R. solanacearum | água de irrigação | Pousos | Leiria |
| CPBF 861 | R. solanacearum | água de irrigação | A. Furadouro | Mora |
| CPBF 829 | R. solanacearum | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 831 | R. solanacearum | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 833 | R. solanacearum | P. oleracea | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 834 | R. solanacearum | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 835 | R. solanacearum | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 838 | R. solanacearum | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 839 | R. solanacearum | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 840 | R. solanacearum | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 845 | R. solanacearum | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 846 | R. solanacearum | solo | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 872 | R. solanacearum | água de irrigação | Tâmega 2 | Chaves |
| CPBF 929 | R. solanacearum | água de irrigação | R. Areia | Nazaré |
| CPBF 933 | R. solanacearum | S. tuberosum | V. Frades | Nazaré |
| CPBF 922 | R. solanacearum | água de irrigação | Póvoa montante | Alcobaça |
| CPBF 925 | R. solanacearum | água de irrigação | R. Alcoa | Alcobaça |
| CPBF 915 | R. solanacearum | P. arenastrum | Muge | Coruche |
| CPBF 793 | R. solanacearum | resíduo industrial | Sopragol | Mora |
| CPBF 789 | R. solanacearum | L. esculentum | Águas Belas | Coruche |
| CPBF 784 | R. solanacearum | água de irrigação | P. Montereal | Leiria |
| CPBF 780 | R. solanacearum | água de irrigação | Rib. Canha | Montijo |
| CPBF 782 | R. solanacearum | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria |
| CPBF 803 | R. solanacearum | solo | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 805 | R. solanacearum | água de irrigação | Rib. Canha | Montijo |
| CPBF 776 | R. solanacearum | L. esculentum | C. Bragança | Vendas Novas |
| CPBF 779 | R. solanacearum | L. esculentum | M. Quinta | Benavente |
| CPBF 785 | R. solanacearum | solo | Barosa | Pombal |
| CPBF 788 | R. solanacearum | água de irrigação | Chaves | Chaves |
| CPBF 747 | R. solanacearum | S. tuberosum | Cadafaz | Celorico da Beira |
| CPBF 832 | R. solanacearum | D. stramonium | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 847 | R. solanacearum | solo | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 913 | R. solanacearum | água de irrigação | Azabuxo | Leiria |
| CPBF 923 | R. solanacearum | água de irrigação | Casal da areia | Alcobaça |
| CPBF 646 | R. solanacearum | L. esculentum | V. Frades | Nazaré |
| CPBF 648 | R. solanacearum | água de irrigação | A. Furadouro | Mora |

Figura 4.18 - Dendrograma composto de perfis de 'fingerprinting' por cSM13-, BOXA1R- e ERIC2-PCR, obtido a partir da média das experiências e utilizando UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de *Ralstonia solanacearum*, bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados ($p=0,91$).

oriundo daquela região, em anos anteriores à implementação do “Plano de Luta Contra *Ralstonia solanacearum*”. De notar que um isolado (CPBF 872) obtido de água superficial colhida imediatamente a jusante da fronteira, no aproveitamento hidro-agrícola do Tâmega, se situa dentro do ‘megacluster’ C no dendrograma conjunto, mostrando elevada similaridade com outros isolados obtidos em Portugal, o mesmo acontecendo nos dendrogramas individuais obtidos para cada método.

Como resultado desta análise conjunta poderá equacionar-se a possibilidade de a recorrência de *R. solanacearum* em Portugal, na última década do século 20, ter ocorrido quer pela introdução directa de lotes de batata-semente importados, quer através da utilização de águas superficiais de rega do aproveitamento hidroagrícola do Tâmega, contaminadas exogenamente, na rega de campos de batata-semente de Trás-os-Montes. A presença de infecções latentes neste material de propagação vegetativa, produzido naquela região, terá constituído igualmente uma via de dispersão da doença em campos de batata-consumo de vários aproveitamentos hidroagrícolas em Portugal.

Alvarez *et al.* (2005) referem que a presença de baixa variabilidade genética pode traduzir o resultado de uma única introdução. Efectivamente, a presença de perfis com bandas comuns, mas possuindo contudo diferenças perceptíveis, para os isolados obtidos em Portugal, Espanha e outros países da Europa, resultará de uma introdução e dispersão comum.

Os resultados obtidos corroboram a utilidade da rep-PCR para proceder à tipificação de estirpes relacionadas a nível infra-específico. Costa *et al.* (2006) parecem, inclusivamente, ter encontrado uma nova variante de *R. solanacearum* na Amazónia, que se mostrou patogénica apenas para *Eryngium foetidum*. No entanto, vários autores verificaram que a sua utilização em estudos taxonómicos, para organismos menos relacionados, deverá ser limitada (Bruijn, 1992; Louws *et al.*, 1994). Para estudos de carácter filogenético, a sequenciação de determinados genes parece ser mais adequada.

A utilização de estirpes obtidas em datas muito distintas permitiu verificar a estabilidade dos perfis, e a consequente validação deste método para tipificação de estirpes de *R. solanacearum*. A reprodutibilidade é no entanto afectada por determinados factores tendo, neste caso em particular, sido ligeiramente afectada pelo uso de suspensões aquosas sujeitas a lise por choque térmico e pela impossibilidade de controlar na totalidade as condições de electroforese. O potencial destes métodos para tipificação infra-específica de estirpes, com o objectivo de proceder à sua utilização em rotina, parece ser no entanto indiscutível, desde que utilizadas suspensões bacterianas frescas, reagentes, e condições de PCR e de corrida semelhantes. Lows *et al.* (1994) evidenciam mesmo a utilidade deste “whole cell rep-PCR” aplicada à rotina laboratorial com o objectivo de obter um diagnóstico mais rápido e fiável.

Os resultados obtidos no Projecto da UE SMT-4-CT97-2179 conduziram a conclusões semelhantes para BOX-PCR, utilizando os ‘primers’ e as condições de amplificação descritas por Lows *et al.* (1994).

Segundo Smith *et al.* (1995), rep-PCR parece produzir uma informação mais coerente sobre os isolados, na presença de uma diversidade genética superior, enquanto outras abordagens como a análise de macrorestrição (PFGE) são muito apropriadas para determinar diferenças entre isolados muito próximos. Segundo os mesmos autores, a inexistência de diferenças a nível geográfico, entre isolados de batateira oriundos do Quênia, poderá dever-se ao fluxo de material de propagação vegetativa albergando infecções latentes, prática comum naquele país.

A presença de isolados aberrantes pode contudo traduzir o movimento de outras estirpes, pelo uso de material de propagação vegetativa contaminado. No entanto, pode acontecer também que tenha ocorrido troca de material genético entre as mesmas estirpes ao longo de um determinado período de tempo, numa determinada área geográfica (Natural *et al.*, 2005).

4.4.4 | Análise de fragmentos obtidos por FAFLP

A electroforese capilar dos fragmentos obtidos por AFLP em sequenciador automático (FAFLP) permitiu obter perfis densitométricos, resultantes da emissão de fluorescência pelos fragmentos amplificados, que se podem visualizar, na Figura 4.19, para a estirpe CPBF 568, bem como para alguns isolados obtidos em Portugal.

A escolha dos 'primers' *EcoRI*+0 e *MseI*+C, para estudo da colecção apresentada na Tabela 4.4, permitiu obter um número significativo de fragmentos de restrição amplificados e polimórficos tornando este método altamente discriminante, com a formação de 54 grupos de indivíduos entre os 93 isolados estudados. Desai *et al.* (2001) verificaram igualmente que a combinação dos 'primers' *EcoRI*+0 e *MseI*+C parecia ser a mais eficiente para a tipificação epidemiológica do fagotipo 4 de *Salmonella enterica*, serovar Enteritidis. Esta constatação poderá ser uma base de partida para a sua utilização noutros estudos similares.

De modo a eliminar o erro resultante das distorções introduzidas nas fases inicial e final da electroforese capilar, foram analisados apenas os fragmentos possuindo entre 100 e 640 pb.

O processamento dos perfis densitométricos no software CEQ 8000 permitiu obter uma matriz de caracteres (presença/ausência) composta por 93 linhas, referentes ao número de isolados em estudo, e por 229 colunas, correspondentes ao número fragmentos distintos detectados em pelo menos um dos isolados. Esta matriz de dados booleanos foi exportada para o software BioNumerics versão 4.61, de modo a permitir a análise numérica hierárquica comparativa utilizando o coeficiente de Dice e a distância aritmética média não ponderada.

Na análise da reprodutibilidade, de acordo com Sneath & Johnson (1972), a probabilidade média de erro (p) foi estimada em 0,05, pelo que a reprodutibilidade do método se revelou elevada (95%) e os resultados obtidos de elevada fidedignidade.

Dado o elevado número de caracteres gerado, e verificando-se que muitos dos fragmentos existiam apenas em poucos isolados, procedeu-se à sua remoção da matriz e a nova análise utilizando um total de 33 caracteres. A verificação da congruência entre os dendrogramas gerados, utilizando o coeficiente de Dice em ambas as situações, mostrou um valor de 95,2%, demonstrando assim a elevada robustez dos resultados encontrados. Efectivamente, a redução do número de bandas ou caracteres parece não afectar grandemente a análise numérica, mas sim o nível de similaridade entre os isolados. Podem-se dar alguns exemplos observados neste caso, em que o número de clusters com homologia de 100% para estirpes do biovar 2, subfenotipo A, subiu de 6 para 10, quando a análise numérica, efectuada inicialmente com 229 caracteres, passou a ser efectuada com os 33 caracteres mais frequentes naquelas estirpes.

Observando o dendrograma construído utilizando todos os caracteres (Figura 4.20), é reduzido o número de estirpes formando clusters com 100% de homologia, evidenciando o grande poder discriminante deste método. Um megacluster (F) contendo 80 dos 93 isolados em estudo, agrupa todos os isolados do biovar 2, subfenotipo A, portugueses e europeus, a um nível de similaridade de 17%. Exteriormente situam-se alguns isolados portugueses aberrantes com baixo nível de similaridade relativamente aos outros isolados e tendo alguma proximidade com a estirpe IPO S306, à semelhança do isolado obtido da Suécia NCPP B2505, o qual se mostrou atípico apenas neste estudo, pelo que se deveria encontrar contaminado. Com maiores dissimilaridades, situam-se ainda o isolado com origem na Colômbia NCPPB 4028, do biovar 2, sub-fenotipo A, Grupo RFLP 27, *B. cepacia*, *R. pickettii*, *Ralstonia* sp., e por ultimo a estirpe tipo de *R. solanacearum* pertencente ao biovar 1, NCPPB 325.

Este parece ser portanto o único método de 'fingerprinting' estudado capaz de discriminar entre *B. cepacia* e *R. pickettii*, mostrando, contudo, que não será particularmente adequado para estudos de diversidade entre organismos taxonomicamente mais afastados. Efectivamente, a estirpe tipo de *R. solanacearum*, NCPPB 325, revela por este meio um maior nível de similaridade com as estirpes de *B. cepacia* e *R. pickettii* do que com a maioria das estirpes portuguesas do biovar 2A.

De referir que dentro do 'megacluster' F os isolados PD 2762 obtido da Holanda e PD 1941 obtido em Portugal anteriormente à recorrência da doença em 1995, mostram 95% de homologia entre si.

Os isolados das águas de irrigação mostraram grande homogeneidade (Figura 4.21). No entanto, quando comparados com estirpes desta espécie isoladas de outras matrizes (Figura 4.20), essa homogeneidade esbate-se, distribuindo-se ao longo do dendrograma, sem qualquer associação específica. Observa-se igualmente que a homogeneidade destes isolados é superior naqueles obtidos no ano 2000, relativamente aos obtidos em 1999, indiciando a presença de um processo adaptativo às condições presentes.

Neste grupo de isolados, formam-se alguns 'clusters' com elevada homologia, mostrando por vezes a mesma origem geográfica. Contudo, noutros casos esses 'clusters' apresentam isolados com origem geográfica muito distinta por resultarem, quanto a nós, de

contaminações com origem em infecções primárias a partir de material de propagação vegetativa com infecções latentes de origem comum.

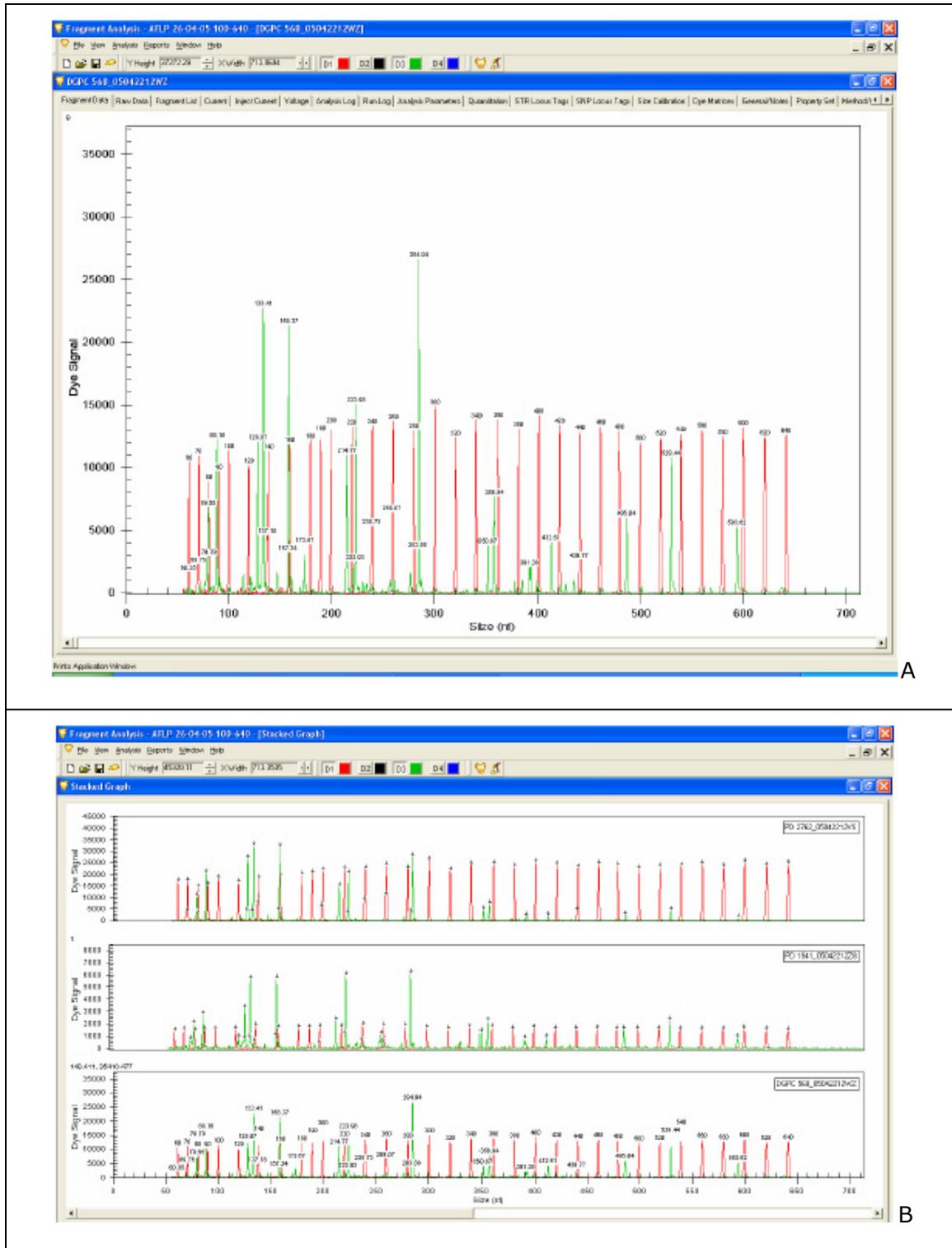
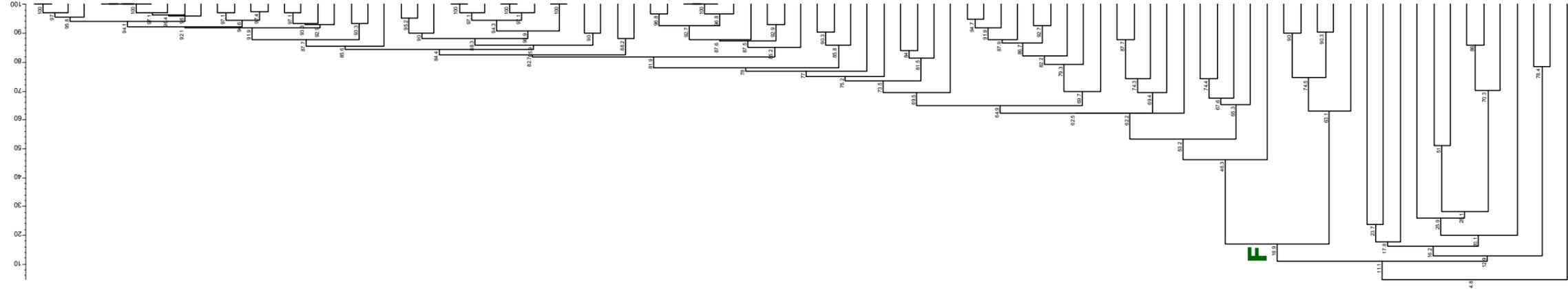


Figura 4.19 – Janela do software CEQ 8000 mostrando perfis densitométricos obtidos por eletroforese capilar em sequenciador automático a partir dos fragmentos de DNA amplificados por AFLP. Picos de cor verde - Fragmentos amplificados do DNA dos isolados em estudo. Picos de cor vermelha - Marcador molecular interno. (A) estirpe CPBF 568; (B) imagem comparativa de três estirpes em estudo.



ID-original
 CPBF 881
 CPBF 918
 CPBF 895
 CPBF 855
 CPBF 789
 CPBF 873
 CPBF 882
 CPBF 916
 IVIA 1632
 CPBF 929
 CPBF 774
 CPBF 883
 CPBF 897
 CPBF 840
 CPBF 861
 CPBF 849
 CPBF 878
 CPBF 914
 CPBF 848
 CPBF 831
 CPBF 884
 CPBF 909
 PD 1941
 PD 2762
 CPBF 845
 CPBF 834
 CPBF 877
 CPBF 872
 CPBF 835
 CPBF 869
 CPBF 833
 CPBF 782
 CPBF 803
 CPBF 780
 CPBF 832
 CPBF 836
 CPBF 839
 CPBF 887
 CPBF 922
 CPBF 885
 CPBF 886
 CPBF 889
 CPBF 837
 CPBF 568
 CPBF 933
 CSLPr 3610
 CPBF 829
 CPBF 900
 CPBF 921
 CPBF 925
 CPBF 776
 CPBF 793
 CPBF 905
 CPBF 917
 CPBF 894
 CPBF 757
 CPBF 784
 CPBF 787
 CPBF 880
 CPBF 712
 CPBF 724
 CPBF 742
 CPBF 747
 CPBF 772
 CPBF 785
 CPBF 915
 CPBF 923
 CPBF 767
 CPBF 874
 CPBF 759
 CPBF 715
 CPBF 788
 CPBF 770
 CPBF 456
 CPBF 847
 CPBF 716
 CPBF 750
 CPBF 752
 CPBF 763
 CPBF 762
 CPBF 646
 NCPBF 325
 CPBF 761
 CPBF 850
 CPBF 713
 CPBF 805
 IPO S306
 NCPBF 2505
 CPBF 648
 NCPBF 4028
 CFBP 2459
 CFBP 2227
 PD 2778

| ID-original | Espécie | Bv | Matriz | Local | Concelho |
|-------------|-----------------|-----------|--------------------|------------------|------------|
| CPBF 881 | R. solanacearum | biovar 2A | solo | Muge | Coruche |
| CPBF 918 | R. solanacearum | biovar 2A | S. dulcamara | Póvoa montante | Alcobaça |
| CPBF 895 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria |
| CPBF 855 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria |
| CPBF 789 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Águas Belas | Coruche |
| CPBF 873 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Veiga | Chaves |
| CPBF 882 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Muge | Coruche |
| CPBF 916 | R. solanacearum | biovar 2A | S. nigrum | Muge | Coruche |
| IVIA 1632 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Espanha | nd |
| CPBF 929 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Aveia | Nazaré |
| CPBF 774 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 883 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | A. Tâmega | Chaves |
| CPBF 897 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Monteal | Leiria |
| CPBF 840 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 861 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | A. Furdouro | Mora |
| CPBF 849 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 878 | R. solanacearum | biovar 2A | U. urens | Muge | Coruche |
| CPBF 914 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Muge | Coruche |
| CPBF 848 | R. solanacearum | biovar 2A | solo | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 831 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 884 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Tâmega 2 | Chaves |
| CPBF 909 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caldeias | Leiria |
| PD 1941 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Portugal | nd |
| PD 2762 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Holanda | nd |
| CPBF 845 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 834 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 877 | R. solanacearum | biovar 2A | S. vulgaris | Muge | Coruche |
| CPBF 872 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Tâmega 2 | Chaves |
| CPBF 835 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 869 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Tâmega | Chaves |
| CPBF 833 | R. solanacearum | biovar 2A | P. oleracea | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 782 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | H. Espadaneira | Leiria |
| CPBF 803 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria |
| CPBF 780 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 832 | R. solanacearum | na | D. stramonium | Rib. Canha | Montijo |
| CPBF 836 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 839 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 887 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 922 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Pousos | Leiria |
| CPBF 885 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Póvoa montante | Alcobaça |
| CPBF 886 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Azabuxo | Alcobaça |
| CPBF 889 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Gandara | Leiria |
| CPBF 837 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Gandara | Leiria |
| CPBF 568 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 933 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | P. Varzim | P. Varzim |
| CSLPr 3610 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | V. Frades | Nazaré |
| CPBF 829 | R. solanacearum | biovar 2A | nd | nd | nd |
| CPBF 900 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | Montalegre |
| CPBF 921 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Pousos | Leiria |
| CPBF 925 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Póvoa | Alcobaça |
| CPBF 776 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Alcoa | Alcobaça |
| CPBF 793 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | C. Bragança | V. Novas |
| CPBF 905 | R. solanacearum | biovar 2A | residuo industrial | Sopragol | Mora |
| CPBF 917 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Fronteira 2 | Chaves |
| CPBF 894 | R. solanacearum | biovar 2A | residuo industrial | Eurobatata | Palmeira |
| CPBF 757 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Azabuxo | Leiria |
| CPBF 784 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Furdouro | Mora |
| CPBF 787 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Monteal | Leiria |
| CPBF 880 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Rio Aveia | Nazaré |
| CPBF 712 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 724 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | V. Frades | Nazaré |
| CPBF 742 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Couço | Coruche |
| CPBF 747 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | S. Grandes | Montijo |
| CPBF 772 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cadálaz | C. Beira |
| CPBF 785 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | F. Salvaterra | S. Magos |
| CPBF 915 | R. solanacearum | biovar 2A | solo | Barosa | Pombal |
| CPBF 923 | R. solanacearum | biovar 2A | P. arenarium | Muge | Coruche |
| CPBF 767 | R. solanacearum | na | água de irrigação | C. Aveia | Alcobaça |
| CPBF 874 | R. solanacearum | biovar 2A | solo | M. Quinta | Benavente |
| CPBF 759 | R. solanacearum | biovar 2A | S. nigrum | Muge | Coruche |
| CPBF 715 | R. solanacearum | biovar 2A | solo | H. Montinho | Montijo |
| CPBF 788 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | V. Frades | Nazaré |
| CPBF 770 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Chaves | Chaves |
| CPBF 456 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | H. Pavões | Coruche |
| CPBF 847 | R. solanacearum | na | S. tuberosum | P. Varzim | P. Varzim |
| CPBF 716 | R. solanacearum | biovar 2A | solo | H. Espadaneira | Montijo |
| CPBF 750 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | V. Frades | Nazaré |
| CPBF 752 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | V. Frades | Nazaré |
| CPBF 763 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | M. Quinta | Benavente |
| CPBF 762 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | H. Montinho | Montijo |
| CPBF 646 | R. solanacearum | na | L. esculentum | Caranguejeira | Leiria |
| NCPBF 325 | R. solanacearum | biovar 1 | L. esculentum | Barosa | Pombal |
| CPBF 761 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | V. Frades | Nazaré |
| CPBF 850 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Gameiro | Mora |
| CPBF 713 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça |
| CPBF 805 | R. solanacearum | biovar 2A | S. nigrum | V. Frades | Nazaré |
| IPO S306 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Rib. Canha | Montijo |
| NCPBF 2505 | O. anthropli | nd | nd | Holanda | nd |
| CPBF 648 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Suécia | nd |
| NCPBF 4028 | R. solanacearum | na | água de irrigação | A. Furdouro | Mora |
| CFBP 2459 | R. pickettii | biovar 2A | S. tuberosum | Colombia | nd |
| CFBP 2227 | B. cepacia | nd | nd | nd | nd |
| PD 2778 | Ralstonia sp. | nd | nd | nd | nd |

Figura 4.20 - Dendrograma de perfis de caracteres por "Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism" (FAFLP), obtido a partir do coeficiente de Dice e utilizando UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de *Ralstonia solanacearum*, bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados ($p=0,95$).

Relativamente aos isolados de tubérculos de batateira (Figura 4.22), também não se observa associação geográfica, o que não será de estranhar tratando-se de material de propagação vegetativa. É evidente a distribuição de isolados obtidos de batata-semente da região de Trás-os-Montes ao longo do dendrograma, mostrando-se alguns mais semelhantes a outros com origem geográfica distinta, do que relativamente a outros isolados obtidos daquela região.

No que diz respeito ao tomateiro (Figura 4.23), existe um grupo de isolados (T), com perfis apresentando 100% de homologia, mas com níveis de similaridade muito baixos quando comparados, quer com os isolados obtidos do tomateiro, quer de outras matrizes. Este comportamento foi encontrado apenas para isolados obtidos a partir de tomateiro, os quais mostraram características fenotípicas e de patogenicidade semelhantes aos outros isolados obtidos em Portugal, pelo que parece resultar da interacção entre *R. solanacearum* e este hospedeiro em particular.

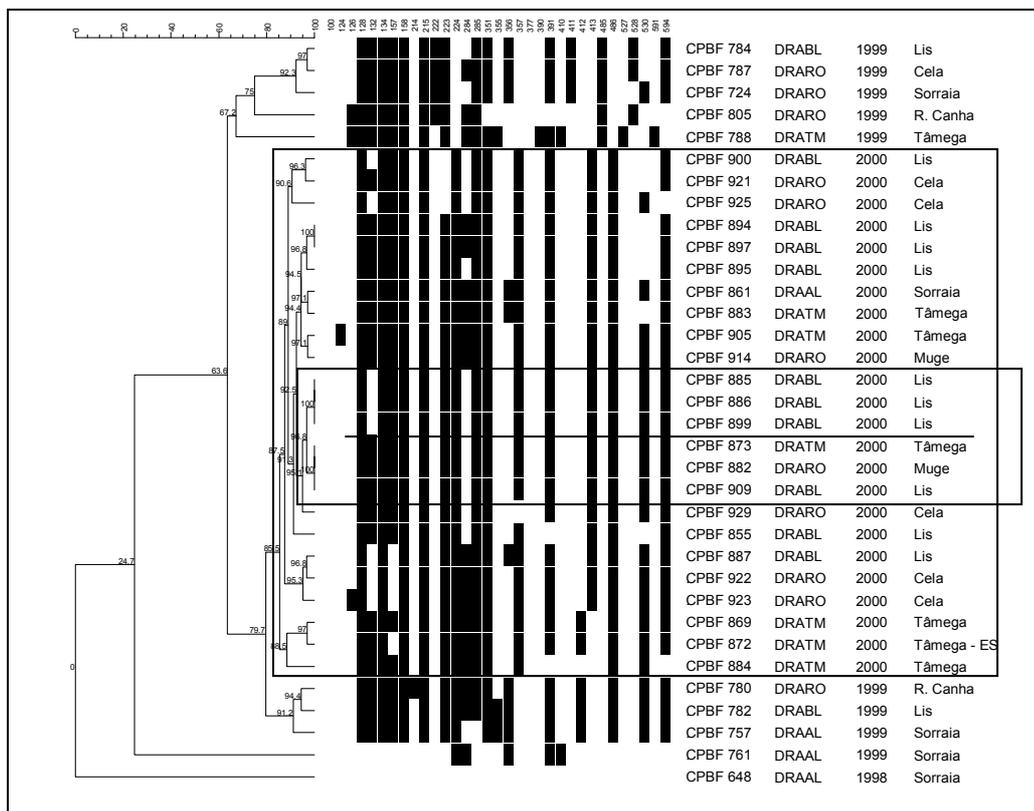


Figura 4.21 – Dendrograma de perfis de FAFLP, utilizando o coeficiente de Dice e UPGMA para caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos a partir de águas superficiais de rega (baseado na análise de 33 caracteres).

Os isolados de *R. solanacearum* obtidos a partir de plantas espontâneas revelam similaridades próximas dos 100% para o mesmo local (Figura 4.24). Não existe, contudo, qualquer associação entre isolados obtidos do mesmo hospedeiro ou família botânica.

Os resultados obtidos por Poussier (2000) utilizando diferentes métodos de tipificação, entre

os quais AFLP na versão tradicional, revelaram que *R. solanacearum* possui elevada diversidade taxonómica, demonstrando a necessidade de efectuar um estudo das relações filogenéticas entre subdivisões desta espécie, e entre ela e outra espécies relacionadas, de modo a fazer uma reavaliação da sua classificação específica.

O uso da técnica AFLP por Wolf *et al.* (1998), permitiu separar as estirpes da raça 3 em grupos distintos indicando a presença de diferentes linhas clonais na Europa. Estes autores obtiveram perfis com 30 a 40 bandas por estirpe que se mostraram altamente discriminantes. Apesar de ocorrer diversidade genómica entre estirpes de França, Holanda e Inglaterra, as diferenças encontradas foram reduzidas, à semelhança dos resultados aqui obtidos para uma parte importante das estirpes do biovar 2, subfenótipo A, Grupo RFLP 26 (ver Figura 4.20).

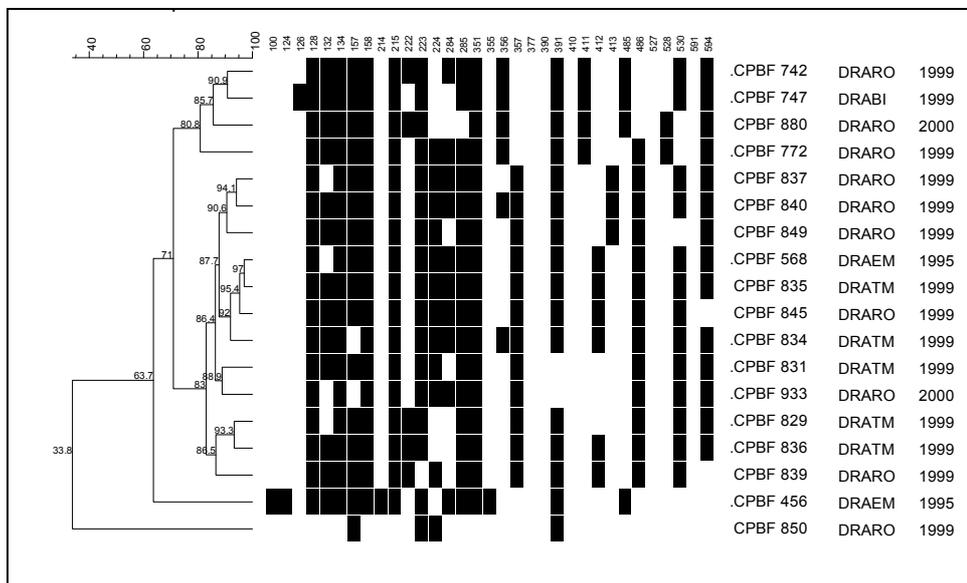


Figura 4.22 – Dendrograma de perfis de FAFLP, utilizando o coeficiente de Dice e UPGMA, para caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos a partir de *Solanum tuberosum* (baseado na análise de 33 caracteres).

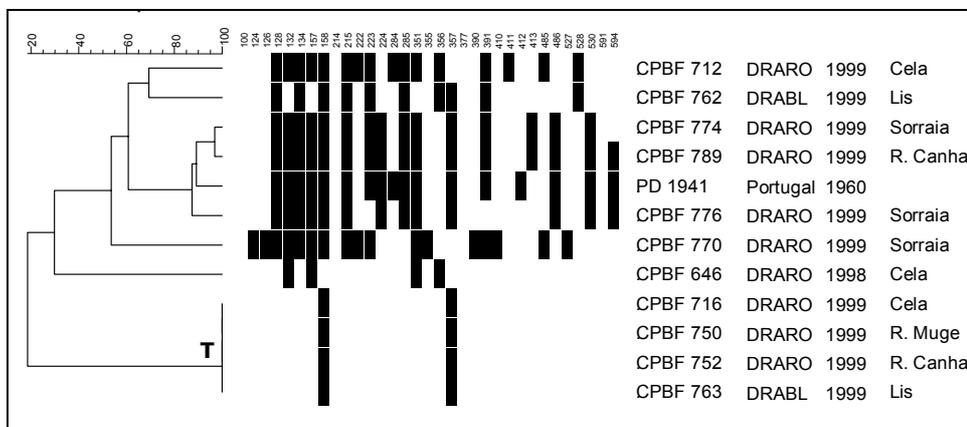


Figura 4.23 – Dendrograma de perfis de FAFLP, utilizando o coeficiente de Dice e UPGMA para caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos a partir de *Lycopersicon esculentum* (baseado na análise de 33 caracteres).

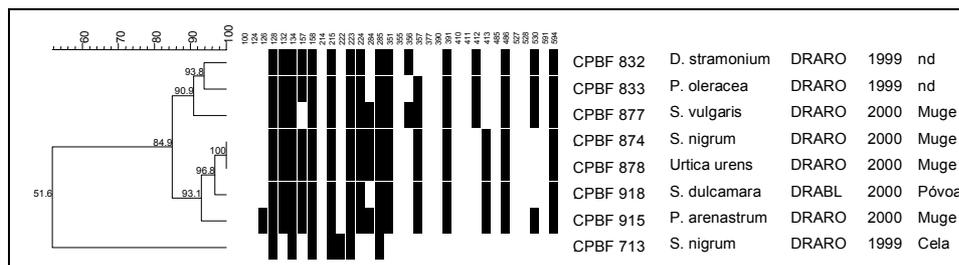


Figura 4.24 - Dendrograma de perfis de FAFLP utilizando o coeficiente de Dice e UPGMA para caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos a partir de plantas espontâneas (baseado na análise de 33 caracteres).

A introdução de estirpes obtidas de uma gama mais variada de hospedeiros, bem como de isolados de origem ambiental, permitiu contudo observar a variabilidade patente nestas estirpes as quais possuem níveis de variabilidade semelhantes às presentes nas matrizes bióticas. De facto, Fegan & Prior (2005) referem a necessidade de proceder ao estudo de estirpes de origem ambiental e de novos hospedeiros de modo a evidenciar a diversidade real de *R. solanacearum*.

O Projecto da UE SMT-4-CT97-2179 fez o estudo de 84 isolados desta espécie provenientes de diferentes origens e pertencentes a diferentes biovars, bem como de estirpes de outros organismos que apresentavam reacções cruzadas quando testadas por IF ou ELISA com antisoros policlonais. A abordagem de AFLP utilizada naquele estudo foi diferente, recorrendo à separação dos fragmentos em géis de sequenciação de poliacrilamida.

A análise numérica dos resultados obtidos neste projecto permitiu definir um grande 'cluster' com estirpes do biovar 2A que se associavam a 80% de similaridade. As estirpes do biovar 2T associavam-se a 70% num 'cluster' distinto. A similaridade entre estirpes do biovar 2A e 2T foi inferior a 55%. A distribuição dos 'clusters' de outros biovars pareceu algo aleatória. A espécie *Ralstonia pickettii* pareceu mais relacionada com as estirpes do biovar 1, embora a sua similaridade fosse reduzida. Esta técnica não permitiu fazer qualquer associação destas estirpes relativamente à sua origem geográfica. As conclusões finais daquele trabalho revelaram a necessidade de otimizar diferentes etapas do procedimento tornando-o menos laborioso e mais sistematizado.

Este método é frequentemente utilizado em estudos de classificação taxonómica a par com outros métodos de referência, na descrição de novos géneros, espécies e variantes genómicas, referindo Coeyne *et al.* (2001) de acordo com observações efectuadas em estudos anteriores (Coeyne *et al.*, 1999; Coeyne *et al.*, 2000), que os resultados obtidos por AFLP são consistentemente comparáveis aos obtidos por hibridação DNA-DNA, e de qualidade superior aos obtidos por SDS-PAGE, na diferenciação de *Burkholderia* spp..

Os resultados aqui observados permitem concluir, à semelhança do descrito por Janssen *et al.* (1996), que o método AFLP possui a capacidade de discriminar a nível infra-subespecífico, nomeadamente a nível infra-biovar, possuindo assim enormes potencialidade para a

detecção de ecótipos ou de linhas clonais, sendo de grande aplicabilidade em estudos epidemiológicos. A título de exemplo, Bossier *et al.* (2000) identificaram por AFLP mutações em *Ralstonia eutropha*, associadas a diferenças no seu comportamento, induzidas pela exposição a determinados ambientes.

A resolução dos fragmentos em sequenciador automático, permitindo a determinação precisa da sua dimensão, além de melhorar a reprodutibilidade reduzindo os níveis de corte para definição de grupos ou 'clusters', aumenta a capacidade discriminativa deste método relativamente a outros métodos de 'fingerprinting' que recorrem à electroforese tradicional (Desai *et al.*, 2001). Como consequência, os índices de discriminação obtidos são em regra elevados.

Uma vez que FAFLP resulta da análise de fragmentos de restrição resultantes do genoma completo de determinado organismo, este método parece particularmente adequado para tipificação epidemiológica possuindo uma base filogenética válida (Arnold *et al.*, 1999). Efectivamente, a variabilidade associada aos perfis de 'fingerprinting' gerados por este método parece mostrar a existência de processos de diferenciação e adaptação em curso.

4.4.5 | Análise Fenética Global

O trabalho desenvolvido neste capítulo teve por base o estudo da diversidade dos isolados portugueses de *R. solanacearum* numa perspectiva polifásica de modo a avaliar de entre os métodos fenotípicos e genotípicos, o(s) mais adequado(s) a essa caracterização, tentando ao mesmo tempo perceber a sua conformidade com a realidade epidemiológica. As discrepâncias encontradas na literatura, sobre os resultados obtidos estes métodos e pelos estudos filogenéticos, como consequência da transferência horizontal de genes, mutações cromossómicas e rearranjos genómicos, justificam em muitos casos esta abordagem (Vos *et al.*, 1998).

Para avaliação dos diferentes métodos utilizados deve ter-se em conta o seu poder tipificante, avaliado pela sua capacidade de produzir um resultado não-ambíguo para cada indivíduo, bem como a sua capacidade para discriminar, aferida pelo seu potencial para distinguir um determinado organismo de outros distintos.

Relativamente aos métodos utilizados na caracterização fenotípica, a determinação do biovar permitiu, por observação directa (visual) dos resultados, tipificar todas as estirpes em estudo, desde que observadas condições de padronização adequadas às várias etapas de execução do método. A sua capacidade discriminante permitiu diferenciar entre estirpes a nível infraespecífico (biovar), bem como discriminar ainda os subfenótipos do biovar 2.

No que diz respeito a SDS-PAGE retiraram-se conclusões semelhantes, uma vez que os perfis de 'fingerprinting' obtidos permitiram analisar todos os isolados de *R. solanacearum* em estudo, e discriminar ao mesmo nível de subfenótipo. Deve contudo referir-se que neste caso

foi necessário recorrer a métodos de análise numérica, de modo a poder retirar estas conclusões, uma vez que a inferência relativamente à estirpe NCPPB 4028 da Colômbia, não seria possível por análise visual dos géis, mas apenas recorrendo à análise da totalidade dos perfis, e tendo em conta vários parâmetros para caracterização dos picos densitométricos. Por outro lado, são inúmeros os factores capazes de afectar a reprodutibilidade desta técnica, comprometendo a normalização dos géis e a análise numérica dos resultados. Os valores dos diferentes índices de discriminação relativamente baixos, apresentados por este método na Tabela 4.7, resultam de se pretender diferenciar organismos muito próximos.

Constatámos assim que a determinação do biovar e SDS-PAGE parecem apresentar uma capacidade discriminante adequada, apresentando no entanto, vocações distintas. A similaridade quase total para todos os isolados do biovar 2 classificados pelo sistema de biovars de Hayward, permitirá facilmente prever o comportamento das estirpes face aos seus hospedeiros 'primários', não sendo contudo informativo relativamente a um surto infeccioso comum, por originar um perfil bioquímico baseado em apenas seis caracteres discriminantes (Kuhn *et al.*, 1991). Deste modo, a determinação do biovar é facilmente aplicável em laboratórios de análise. Já SDS-PAGE poderá, neste caso, enquadrar-se em estudos que visem a produção de anticorpos específicos, por exemplo.

O uso de métodos hierárquicos, para formação de agrupamentos entre indivíduos relativamente próximos, mostrou capacidade de resolução da variabilidade fenética e epidemiológica desta colecção de isolados. Estas conclusões foram igualmente obtidas por outros autores, quando efectuado o estudo comparativo relativamente à análise de componentes principais (Bruijn *et al.*, 1996).

Os métodos de 'fingerprinting' genómico aqui utilizados possuem um poder discriminante apropriado para um maior nível de diferenciação. Através dos resultados obtidos, e de modo a certificar o seu poder discriminante, identificando com um perfil semelhante isolados que estão efectivamente muito relacionados a nível genómico, calcularam-se os índices de discriminação para os três métodos utilizados, através do índice de diversidade de Simpson (D) e dos índices de Shannon-Weiner (H' e J') (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 - Comparação de diferentes índices de diversidade obtidos para os diferentes métodos de 'fingerprinting' genómico utilizados na avaliação do poder discriminante de cada método.

| | SDS-PAGE | MSP-PCR | BOX-PCR | ERIC-PCR | Conjunto | FAFLP | Global |
|-------------|----------|---------|---------|----------|----------|-------|--------|
| Nº isolados | 81 | 81 | 101 | 104 | 64 | 93 | 81 |
| Nº grupos | 9 | 26 | 29 | 33 | 27 | 54 | 57 |
| D | 0,709 | 0,869 | 0,764 | 0,923 | 0,940 | 0,911 | 0,988 |
| H' | 0,653 | 1,106 | 0,997 | 1,282 | 1,289 | 1,607 | 1,657 |
| J' | 0,684 | 0,782 | 0,682 | 0,844 | 0,890 | 0,928 | 0,9443 |

A amostra composta por isolados de origem diversa deveria permitir verificar que isolados relacionados por terem em comum mesma origem geografia, hospedeiro ou terem origem num acontecimento comum (clonalidade), estariam organizados em grupos após tipificação.

Burucoa *et al.* (1999) referem que para um método de tipificação permitir uma análise correcta da clonalidade entre indivíduos deverá possuir valores do coeficiente de diversidade de Simpson superiores a 0,95.

MSP-PCR e BOX-PCR parecem ser os métodos de 'fingerprint' genómico com menor poder discriminante, apresentando valores mais baixos para o índice de diversidade de Simpson, e portanto, com menor capacidade para diferenciar os isolados entre si. ERIC-PCR e FAFLP possuem índices de discriminação superiores embora aquém dos valores recomendados por (Burocoa *et al.*, 1999). ERIC possui mesmo valores superiores. Efectivamente aqueles autores referem que os métodos que têm por base PCR, nomeadamente rep-PCR, possuem elevada capacidade de tipificação, bem como de discriminação.

MSP-PCR tem vindo a ser aplicada com sucesso à diferenciação de espécies de fungos patogénicos (Roque *et al.*, 2006), embora tenha sido possível proceder a discriminação correlacionada com a origem geográfica de leveduras (Libkind *et al.*, 2007), ou seja a nível infra-específico. Estas constatações obtidas por outros autores corroboram os resultados obtidos neste trabalho, onde foi possível efectuar discriminação a nível infra-específico, bem como especular quanto à presença de 'clusters' constituído por vários isolados mas correspondentes a uma única estirpe, e ainda, observar alguma correlação com a origem geográfica daqueles isolados a nível regional.

A utilização de perfis de 'fingerprinting' de rep-PCR (BOX, ERIC), obtidos a partir de PCR directa de lisados, na caracterização da diversidade de uma colecção de isolados de tamanho apreciável, permitiu tipificar com sucesso as estirpes ao nível do subfenótipo do biovar. Foram igualmente gerados perfis discriminantes para todos os fenótipos e organismos relacionados, exceptuando-se *B. cepacia* e *R. pickettii* que evidenciaram perfis apenas discriminados por FAFLP. Os níveis de reprodutibilidade obtidos foram aceitáveis para BOX, mas menos razoáveis para ERIC, tendo em conta os resultados obtidos por outros autores (Rademaker *et al.*, 1998; Vinuesa *et al.*, 1998). No entanto, tendo em conta que se procedeu à sua correcção para determinação do nível de corte dos dendrogramas, este aspecto foi ultrapassado.

A variabilidade obtida infra-biovar 2, subfenótipo A, Grupo RFLP 26, será certamente resultado da capacidade de rep-PCR para discriminar uma possível diversificação genética, resultante de processos de adaptação e conseqüente evolução, como referem Nakatsu *et al.* (1998). Estes autores identificaram evolução genotípica paralela e divergente, por rep-PCR, em populações experimentais de *Ralstonia* sp..

A utilização conjunta de MSP-, BOX- e ERIC-PCR permitiu observar um índice de diversidade de Simpson superior ao determinado por FAFLP (Tabela 4.7), permitindo concluir acerca do potencial deste tipo de abordagem na caracterização da diversidade infra-específica de *R. solanacearum*.

A utilização de uma abordagem polifásica relativamente aos vários métodos de 'fingerprinting' genómico, resultou na construção de um dendrograma global (Figura 4.25),

0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0



| ID-original | Espécie | Bv | Matriz | Local | Concelho | Ano |
|-------------|-----------------|-----------|--------------------|------------------|-----------|------|
| CPBF 883 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Tâmega | Chaves | 2000 |
| CPBF 884 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Tâmega 2 | Chaves | 2000 |
| CPBF 912 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | V. Verde Raia | Chaves | 2000 |
| CPBF 914 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 900 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Pousos | Leiria | 2000 |
| CPBF 878 | R. solanacearum | biovar 2A | U. urens | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 877 | R. solanacearum | biovar 2A | S. vulgaris | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 897 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Monterreal | Leiria | 2000 |
| CPBF 899 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Gandara | Leiria | 2000 |
| CPBF 848 | R. solanacearum | biovar 2A | solo | H. Espadaneira | Montijo | 1999 |
| CPBF 885 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Azabuxo | Leiria | 2000 |
| CPBF 886 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | P. Gandara | Leiria | 2000 |
| CPBF 887 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Pousos | Leiria | 2000 |
| CPBF 905 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Fronteira 2 | Chaves | 2000 |
| CPBF 903 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Campinos | Leiria | 2000 |
| CPBF 871 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Areia | Nazaré | 2000 |
| CPBF 870 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Areia | Nazaré | 2000 |
| CPBF 875 | R. solanacearum | biovar 2A | L. esculentum | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 874 | R. solanacearum | biovar 2A | S. nigrum | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 873 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Veiga | Chaves | 2000 |
| CPBF 855 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria | 2000 |
| CPBF 851 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Bragança | 1999 | |
| CPBF 849 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 869 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Tâmega | Chaves | 2000 |
| CPBF 861 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Furadouro | Mora | 2000 |
| CPBF 894 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Azabuxo | Leiria | 2000 |
| CPBF 881 | R. solanacearum | biovar 2A | solo | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 882 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 880 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | 2000 |
| CPBF 895 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Caranguejeira | Leiria | 2000 |
| CPBF 872 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Tâmega 2 | Chaves | 2000 |
| CPBF 793 | R. solanacearum | biovar 2A | resíduo industrial | Mora | 1999 | |
| CPBF 831 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | 1999 | |
| CPBF 833 | R. solanacearum | biovar 2A | P. oleracea | H. Espadaneira | Montijo | 1999 |
| CPBF 835 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | 1999 | |
| CPBF 836 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | 1999 | |
| CPBF 834 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | 1999 | |
| CPBF 837 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 838 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 839 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 840 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 845 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 846 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | H. Espadaneira | Montijo | 1999 |
| IVIA 1632 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Espanha | nd | 1996 |
| CPBF 829 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Montalegre | 1999 | 1999 |
| CPBF 456 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | P. Varzim | P. Varzim | 1995 |
| PD 2762 | R. solanacearum | biovar 2 | S. tuberosum | Holanda | nd | 1995 |
| CSLPr_3610 | R. solanacearum | biovar 2A | nd | nd | nd | nd |
| CPBF 832 | R. solanacearum | na | D. stramonium | H. Espadaneira | Montijo | 1999 |
| CPBF 925 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Alcoa | Alcobaça | 2000 |
| CPBF 929 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | R. Areia | Nazaré | 2000 |
| CPBF 907 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Fronteira 2 | Chaves | 2000 |
| CPBF 933 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | V. Frades | Nazaré | 2000 |
| CPBF 921 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Póvoa | Alcobaça | 2000 |
| CPBF 915 | R. solanacearum | biovar 2A | P. arenastrum | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 917 | R. solanacearum | biovar 2A | resíduo industrial | Palmela | 2000 | 2000 |
| CPBF 916 | R. solanacearum | biovar 2A | S. nigrum | Muge | Coruche | 2000 |
| CPBF 918 | R. solanacearum | biovar 2A | S. dulcamara | Póvoa montante | Alcobaça | 2000 |
| CPBF 922 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | Póvoa montante | Alcobaça | 2000 |
| CPBF 761 | R. solanacearum | biovar 2A | água de irrigação | A. Gameiro | Mora | 1999 |
| CPBF 850 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cela | Alcobaça | 1999 |
| CPBF 747 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Cadafaz | C. Beira | 1999 |
| CPBF 742 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | S. Grandés | Montijo | 1999 |
| NCPBP 4028 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Colombia | nd | nd |
| NCPBP 2505 | R. solanacearum | biovar 2A | S. tuberosum | Suécia | nd | 1972 |
| CPBF 847 | R. solanacearum | na | solo | H. Espadaneira | Montijo | 1999 |
| CPBF 923 | R. solanacearum | na | água de irrigação | Casal da areia | Alcobaça | 2000 |
| CPBF 913 | R. solanacearum | na | água de irrigação | Azabuxo | Leiria | 2000 |
| NCPBP 3996 | R. solanacearum | biovar 3 | L. esculentum | Perú | nd | 1966 |
| NCPBP 4005 | R. solanacearum | biovar 4 | Z. officinale | Filipinas | nd | nd |
| NCPBP 325 | R. solanacearum | biovar 1 | L. esculentum | EUA | nd | nd |
| NCPBP 3989 | R. solanacearum | biovar 2T | S. tuberosum | Brasil | nd | 1979 |
| CPBF 752 | R. solanacearum | na | L. esculentum | H. Montinho | Montijo | 1999 |
| CPBF 646 | R. solanacearum | na | L. esculentum | V. Frades | Nazaré | 1998 |
| R 288 | R. solanacearum | biovar 5 | Monus sp. | China | nd | nd |
| CPBF 648 | R. solanacearum | na | água de irrigação | A. Furadouro | Mora | 1998 |
| IPO S306 | O anthropii | nd | nd | Holanda | nd | nd |
| CFBP 2227 | B. cepacia | nd | nd | nd | nd | nd |
| CFBP 2459 | R. pickettii | nd | nd | nd | nd | nd |
| PD 2778 | Ralstonia sp. | nd | nd | nd | nd | nd |

Figura 4.25 - Dendrograma composto de perfis de 'fingerprinting' (SDS-PAGE, GM13-, BOXA1R- e ERIC2-PCR e FAFLP) obtido a partir da média das experiências e utilizando UPGMA, para caracterização de isolados portugueses e estrangeiros de *Ralstonia solanacearum*, bem como de outros organismos taxonomicamente relacionados ($p=0,95$).

que na generalidade se mostrou consistente com os 'megaclusters' definidos nos dendrogramas parciais, permitiu uma resolução mais completa do genoma total dos isolados, maximizando o nível de discriminação, e dando alguma coerência "filogenética" à análise global efectuada.

No que diz respeito a FAFLP, o seu enorme potencial discriminante resultante da resolução dos fragmentos em sequenciador automático, com níveis de diferenciação entre fragmentos na ordem de um par de bases, evidenciou uma enorme variabilidade, daí resultando um enorme número de grupos relativamente ao número total de isolados em estudo. Efectivamente AFLP parece particularmente adequado à discriminação de grupos a nível infra-específico, conforme se constatou neste trabalho, relativamente a estirpes menos próximos taxonomicamente. Avrova *et al.* (2002) constataram o mesmo relativamente à diferenciação de bactérias causadoras de podridões moles, *Erwinia carotovora* e *E. chrysanthemi*.

A capacidade discriminante de FAFLP reflecte-se melhor através dos valores dos índices de Shannon-Weiner (H'), que têm em conta não só o número de tipos, mas também a sua uniformidade, sendo geralmente alto quando existem grupos formados por um único indivíduo, como acontece com os resultados obtidos por FAFLP. Os valores elevados obtidos também para J' comprovam que a diversidade identificada por FAFLP se encontra mais próxima da diversidade máxima, que poderá existir para aquele grupos de indivíduos, e que ocorreria se todos os tipos estivessem presentes em igual número.

A elevada diversidade obtida por FAFLP para os isolados portugueses do biovar 2, sub-fenótipo A, de *R. solanacearum*, poderá significar que o processo adaptativo às condições edafoclimáticas presente se encontra em evolução, mostrando essa variabilidade a ocorrência de uma microevolução, conforme constataram Buckling *et al.* (2003), num estudo sobre a redução da diversidade associada a processos de adaptação em populações bacterianas, embora a nível experimental. Inversamente, Stevens & van Elsas (2006) verificaram que *R. solanacearum* persiste ainda associada a águas superficiais e a *S. dulcamara* na Holanda, pelo que equacionaram a hipótese deste organismos ter evoluído no sentido de aumentar a sua performance conseguindo sobreviver saprofiticamente na presença de temperaturas inferiores às dos climas temperados. A análise de amostras ambientais por PFGE permitiu detectar alguma heterogeneidade entre estirpes obtidas de diferentes nichos ecológicos resultantes da ausência de elemento genético móvel que parece estar envolvido neste processo adaptativo.

Segundo Goulding *et al.* (2000), tendo em conta que este método detecta substituições de poucos nucleótidos na totalidade do genoma de determinados organismos, a presença ou ausência de uma única banda pode ser crítica, e poderá efectivamente gerar informação sobre processo de microevolução em determinada população. Esta optimização do poder discriminante poderá contudo encobrir uma origem epidemiológica clonal (Desai *et al.*, 2001). Por isso, e tal como acontece neste trabalho, é importante o conhecimento de toda a informação relevante para a rastreabilidade de determinado isolado.

Por ser um método relativamente sofisticado exigindo laboratórios dotados de sequenciador, não foi até agora amplamente utilizado, nem estabelecido qualquer critério relativamente ao nível de dissimilaridade entre fragmentos, que permitisse identificar indivíduos pertencentes a clones distintos, ao invés daqueles já estabelecidos para PFGE.

Aqueles autores preconizam que diferenças de um par de base poderá ser suficiente para identificar uma nova estirpe, desde que se tenha em conta o contexto epidemiológico. No nosso caso, a avaliação da reprodutibilidade e do erro permitiram estabelecer um nível de corte de 90%, que parece adequado à identificação de estirpes diferenciadas, partindo do pressuposto que as condições edafoclimáticas e os sistemas culturais poderão permitir uma diversificação dos isolados de várias formas, a partir de um ou poucos eventos de introdução de estirpes do biovar 2, sub-fenótipo A com um ancestral comum.

A utilização dos diferentes métodos de 'fingerprinting' de forma conjunta permitiu detectar os níveis de diversidade mais elevados, reflectindo de forma mais fiel toda a variabilidade inerente à colecção de isolados estudados (amostra), bem como da totalidade dos isolados obtidos até à data em Portugal, conforme expresso nos índices de diversidade referidos na Tabela 4.7.

O estudo da congruência relativamente à utilização dos diferentes métodos mostra que a variabilidade total desta amostra só pode ser explicada pela sua utilização conjunta, não se podendo substituir entre si (Figura 4.26).

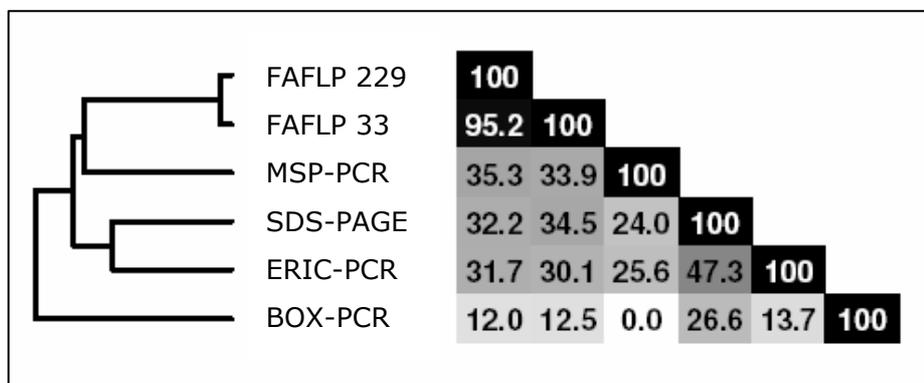


Figura 4.26 - Análise comparativa dos diferentes métodos de 'fingerprinting' utilizados nos estudos de diversidade de *Ralstonia solanacearum*, produzida no software BioNumerics.

4.4.6 | Análise Filogenética de isolados de *Ralstonia solanacearum* em Portugal: história epidemiológica

A identificação recente de casos de doença do pus, em campos de batateira do Baixo Mondego, com origem em isolados do biovar 1 foi um evento inesperado por se pensar que, à semelhança do verificado noutros países do Norte e Centro da Europa, os isolados

Portugueses de *R. solanacearum* tinham a mesma origem clonal, sendo de um modo geral fenotípica e genotipicamente semelhantes, pertencendo ao biovar 2, subfenótipo A, Grupo RFLP 26.

Efectivamente os isolados obtidos até 2006 tinham sido identificados e caracterizados como tal, e uma amostra representativa da sua totalidade (369 isolados obtidos entre 1995 e 2006), composta por uma centena de isolados foi sujeita à caracterização polifásica descrita neste capítulo, confirmando-se, para a generalidade dos isolados, a inclusão no biovar 2A.

A integração de isolados com origem em hospedeiros e substratos diversos poderia evidenciar a presença outros biovars, o que não se verificou. A elevada dispersão geográfica e a sistemática presença deste organismo nos principais aproveitamentos hidroagrícolas do País, permitiu-nos concluir que aí se estabeleceu, considerando-se endémico nesses locais (Capítulo 3).

O conhecimento documentado sobre a existência da doença do pus da batateira na década de 30 e a existência de registos sobre a identificação deste organismo até finais dos anos 60; a recorrência da doença associada à importação de batata-semente da Holanda na década de 90, também acompanhada de variados surtos da doença em batateira em muitos Países Europeus; e, por fim, a detecção e identificação de vários casos no ano de 2007 associados à presença de um novo biovar em Portugal, pode permitir inferir sobre a existência de pelo menos dois eventos distintos na introdução de *R. solanacearum* em Portugal.

Deste modo, o recurso a uma análise filogenética comparativa de isolados representativos dos diferentes grupos obtidos por via fenética, relativamente a um grupo mais vasto de isolados, com origem geográfica mais ou menos distante, permitiria integrar os isolados Portugueses de *R. solanacearum* num contexto epidemiológico global.

A filogenia, construída com base na proposta por Fegan & Prior (2005) e apresentada na Figura 4.27, permitiu integrar os isolados Portugueses de *R. solanacearum* no filotipo II. Concluiu-se como esperado, pela existência de, pelo menos, duas populações distintas, uma composta por isolados do biovar 2 e outra composta por isolados do biovar 1, associadas a dois eventos (introduções) distintos. Estas duas populações integram-se nos dois 'subclusters' do filotipo II. As estirpes do biovar 2 no integram-se 'subcluster' A, e as do biovar 1 no 'subcluster' B.

Os isolados Portugueses do 'subcluster' B ("broad host range"), do qual faz parte integrante a estirpe-tipo da espécie (K 60) e estirpes da América Central e do Sul, bem como outras obtidas de países do Norte de África (Quênia e Burquina-Faso), parecem mais próximos de estirpes obtidas de *Musa* sp. com origem no Brasil (ICMP 6782 e ICMP 9600). Neste 'subcluster' integram-se assim isolados do biovar 1 obtidos a partir de solanáceas, bem como de bananeira ou mesmo de eucalipto, pertencentes aos sequevares 5, 6 e 7, incluindo os isolados Portugueses associados ao sequevar 6.

Relativamente aos isolados Portugueses do 'subcluster' A ("narrow host range"), estes distribuem-se de forma mais ou menos homogénea, alinhados com outras estirpes do biovar

2, subfenótipo A, obtidas a partir de plantas solanáceas e com origem primária no continente Americano, particularmente adaptadas a baixas temperaturas.

Os isolados Portugueses deste grupo são constituídos por dois grupos, os isolados resultantes de uma nova introdução da doença na década de 90, bem como um exemplar datado de 1960 obtido por M. Oliveira a partir de plantas de tomateiro (PD 1941). Efectivamente, estes dois grupos de isolados terão um ancestral comum, embora neste filograma, resultante da sequenciação parcial do gene da endoglucanase, este isolado mais antigo revele algum nível de divergência relativamente à maior parte dos outros isolados que se situam no 'subcluster' A. De notar que um isolado obtido de solo do aproveitamento hidroagrícola do Lis (CPBF 785) possui um elevado nível de semelhança com PD 1941, parecendo possuir uma origem comum e derivar de focos infecciosos anteriores à recorrência da doença. Sendo este isolado obtido em anos recentes, poderá equacionar-se a hipótese de a doença não ter sido efectivamente erradicada na década de 60. Este aspecto deverá ser confirmado, uma vez que os métodos de 'fingerprinting' utilizados neste trabalho apenas evidenciam que este isolado se integra no 'megacluster' das estirpes do biovar 2, subfenótipo A. No entanto, FAFLP considera este isolado como único do seu tipo, possuindo efectivamente um menor nível de similaridade dentro deste grupo, mas situando-se distante de PD 1941.

Relativamente aos outros isolados Portugueses deste grupo é notória a similaridade com estirpes com origem em diferentes países, incluindo Holanda, Suécia e Egipto, entre outras. A possível dispersão de *R. solanacearum* a partir de batata-semente com origem em Trás-os-Montes não poderá ser justificada por esta via.

No que diz respeito à utilização da análise bayesiana, a árvore aqui obtida é congruente com aquela obtida por Castillo & Greenberg (2007) para as sequências parciais de *egl*. Contudo, esta árvore global obtida a partir de 149 sequências parciais deste gene, revelou a existência de algumas estirpes aberrantes, não se enquadrando no sistema classificativo composto pelos quatro filotipos. As estirpes CFBP 3059 e UW 386, integradas no filotipo III por estes autores através da utilização da análise hLRT ('Hierarchical Likelihood Ratio Tests'), pela abordagem baieseana, aqui utilizada, não se enquadram em qualquer um dos filotipos. Estes autores escolheram o método hLRT, por considerarem ser o mais adequado de acordo com a análise referida por Posada & Crandal (2001). No entanto, tendo em conta que o filotipo III parece ser aquele que possui um menor grau de clonalidade no que diz respeito aos genes funcionais (Castillo & Greenberg, 2007), poderá acontecer o mesmo para outros genes, o que convirá sem dúvida esclarecer.

O facto deste estudo ter sido iniciado muito recentemente não permite que sejam introduzidas novas metodologias na apreciação dos dados que agora dispomos no decurso deste trabalho.

A análise filogenética aqui realizada permitiu no entanto esclarecer algumas pistas sobre a história epidemiológica de *R. solanacearum* em Portugal.

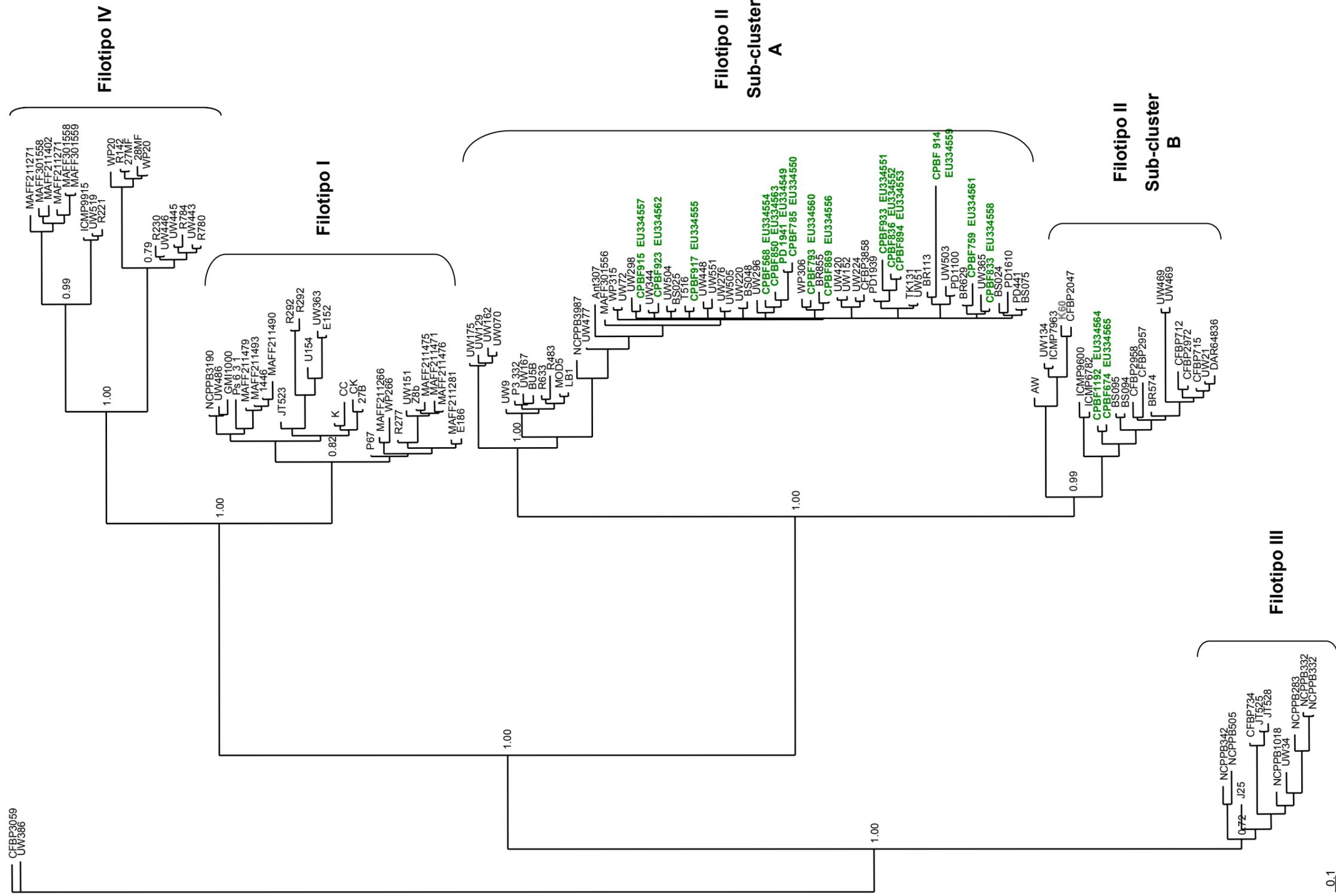


Figura 4.27 – Filogenia de *Ralstonia solanacearum* construída a partir da análise de 149 sequências de 750 bp do gene da endoglucanase (*egl*) utilizando uma abordagem bayesiana. 132 sequências foram obtidas do Genbank e as restantes 17 são representativas da diversidade da coleção de isolados portugueses estudada. Os filótipos e 'subclusters' encontram-se identificados. Junto dos isolados portugueses encontram-se referidos os respectivos números de registo na base de dados do Genbank.

4.5 | Referências bibliográficas

- Alvarez AM. 2005. Diversity and Diagnosis of *Ralstonia solanacearum*. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- Ansorge W, Voss H, Wiemann S, Schwager C, Sproat B, Zimmerman J, Stegemann J, Erfle H, Hewitt N & Rupp T. 1992. High-throughput automated DNA sequence facility with fluorescent labels at the European Molecular Biology laboratory. *Electrophoresis* **13**:616-619.
- Avrova AO, Hyman LJ, Toth RL & Toth IK. 2002. Application of Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting for Taxonomy and Identification of Soft Rot Bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:1499-1508.
- Bliss K, Mansfield JW, Elphinstone J & Thwaites R. 2006. Adaptation of *Ralstonia solanacearum* to temperate conditions. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Bossier P, Top EM, Huys G, Kerstes K, Boonaert CJP, Rouxhet PG & Verstraete W. 2000. Modification of aggregation behaviour of the environmental *Ralstonia eutropha*-like strain AE815 is reflected by both surface hydrophobicity and amplified fragment length polymorphism (AFLP) patterns. *Environmental Microbiology* **2**:51-58.
- Boucher A, Guidot A, Carrère S, Peeters N, Elbaz M, Prior P & Genin S. 2006. Genomic variability and evolution in *Ralstonia solanacearum*. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Bridge P. 1998. Numerical Analysis of Molecular Variability: A Comparison of Hierarchic and Non-hierarchic Methods. In: Bridge PD, Couteaudier Y & Clarkson JM (Eds). *Molecular Variability of Fungal Pathogens*. CAB International: Wallingford. p. 291-308.
- Brujin FJ, Rademaker J & Schneider M. 1996. Rep-PCR Genomic Fingerprinting of Plant-Associated Bacteria and Computer Assisted Phylogenetic Analysis. In: *Biology of Plant-Microbe Interaction*. Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions. Stacey G, Mullin B & Gresshoff P (Eds). APS Press. p. 479-502.
- Buddenhagen I, Sequeira L & Kelman A. 1962. Designation of the races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **52**:726.
- Burucoa C, Lhomme V & Fauchere JL. 1999. Performance Criteria of DNA Fingerprinting Methods for Typing of *Helicobacter pylori* Isolates: Experimental Results and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**:4071-4080.
- Castillo JA & Greenberg JT. 2007. Evolutionary Dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:1225-1238.
- Chambel, L. 2001. *Análise Taxonómica Polifásica em Leuconostoc e Weissella*. Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 300pp.
- Chandrashekara KN, Jagadish K, Krishnamurthy KB, Rashmi S, Prasanna MK. 2006. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Clarridge JE III. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Review*. **17**:840-862.
- Coenye T, Falsen E, Vancanneyt M, Hoste B, Govan JRW, Kerters K & Vandamme P. 1999. Classification of *Alcaligenes faecalis*-like isolates from environment and human clinical samples as *R. sp. nov.*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **49**:405-413.
- Coenye T, Falsen E, Vancanneyt M, Hoste B, Ohlén M, Goris J, Govan JRW, Gillis M & Vandamme P. 2000. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonica* sp. nov., *Pandoraea pnomenusa* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**:887-899.
- Coenye T, Goris J, De Vos P, Vandamme P & LiPuma J. 2003. Classification of *Ralstonia pickettii*-like isolates from environment and clinical samples as *Ralstonia insidiosa* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:1075-1080.
- Coenye T, LiPuma JJ, Henry D, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Gillis M, Speert DP & Vandamme P. 2001. *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**:271-279.

- Cook D & Sequeira L. 1994. Strain Differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by Molecular Genetic Methods. In: Hayward AC and Hartman GL (eds) *Bacterial wilt: The Disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* CAB International, Wallingford. p. 77-93.
- Cook D, Barlow E & Sequeira L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2**:113-21.
- Cook D, Barlow E & Sequeira L. 1991. DNA probes as tools for the study of host-pathogen evolution: the example of *Pseudomonas solanacearum*. In: Henneke, H & Verma DPS (Eds). *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Kluwer, The Netherlands. Vol. I. p. 103-108.
- Costa SB, Fonseca MEN, Lopes CA, Ferreira MASV & Boiteux LS. 2006. Genetic and phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* isolates from the Brazilian Amazon Region. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Costas M. 1990. Numerical analysis of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoretic protein patterns for the classification, identification and typing of medically important bacteria. *Electrophoresis*. **11**:382-391.
- Daniel J, McHugh RC & Saddler GS. 2006. Molecular characterisation of the potato brown rot pathogen *Ralstonia solanacearum* race 3/biovar 2A. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Denny TP, Cowart T & Morrison C. 2006. Genetic basis of the *Ralstonia solanacearum* biovar assay. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Desai M, Threlfall, EJ & Stanley J. 2001. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism subtyping of the *Salmonella enterica* serovar enteritidis phage type 4 clone complex. *Journal Clinical Microbiology* **39**:201-206.
- Dianese JC, Dobereiner J & Santos LTP. 1989. Membrane protein patterns of three *Azospirillum* species and *Herbaspirillum seropedicae*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **61**:223-230.
- Dianese, J. C. & Dristig, M. C. G. 1994. Strain characterization of *Pseudomonas solanacearum* Based on Membrane protein Patterns. In: Hayward AC and Hartman GL (eds) *Bacterial wilt: The Disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford. p. 113-121.
- Dristig, M. C. G & Dianese, J. C. 1990. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* biovars based on protein patterns. *Phytopathology* **80**: 641-646.
- Eden-Green SJ. 1994. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* and Related Bacteria in South East Asia: New Directions for Moko Disease. In: Hayward AC and Hartman GL (eds) *Bacterial wilt: The Disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (p. 25-34) CAB International, Wallingford.
- EPPO/OEPP. 2004. *Diagnostic protocols for regulated pests – Ralstonia solanacearum*. 10 pp..
- Fegan M & Prior P. 2006. Sub-specific characterisation and development of molecular diagnostic tests for members of the *R. solanacearum* species complex. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Fegan, M. 2005. Bacterial Wilt Diseases of Banana; Evolution and Ecology. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 510 pp..
- Fegan M & Prior P. 2005. How Complex is the "Ralstonia solanacearum Species Complex"? In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 510 pp..
- Fegan M, Taghavi M, Sly LI & Hayward AC. 1998. Phylogeny, Diversity and Molecular Diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. In: Prior Ph, Allen C and Elphinstone J (eds.) *Bacterial Wilt Disease – Molecular and Ecological aspects*. Springer-Verlag, INRA. p. 19-33.
- Frey P, Smith JJ, Albar L, Prior P, Saddler GS, Trigalet-Demery D, Trigalet A. 1996. Bacteriocin Typing of *Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum* Race 1 of the French West Indies and Correlation with Genomic variation of the Pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**:473-479.
- Gabriel DW, Allen C, Schell M, Denny TP, Greenberg JT, Duan YP, Flores-Cruz Z, Huang Q, Clifford JM, Presting G, González ET, Reddy J, Elphinstone J, Swanson J, Yao J, Mulholland V, Liu L, Farmerie W, Patnaikuni M, Balogh B, Norman D, Alvarez A, Castillo JA, Jones J, Saddler G, Walunas T, Zhukov A & Mikhailova N. 2006. Identification of Open Reading Frames Unique to a Select Agent: *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2. *Molecular Plant Microbe Interactions*. **19**:69-79.

- Gadanhó M, Almeida JM, Sampaio JP. 2003. Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. *Antonie Van Leeuwenhoek* **84**:217-27.
- Genin S. & Boucher, C. 2002. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology* **3**:111-118.
- Genin S. & Boucher, C. 2004. Lessons Learned from the Genome Analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**:107-34.
- Gillings, M. R. & Fahy, P. 1994. Genomic 'fingerprinting' towards a Unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In: Hayward AC and Hartman GL (eds) *Bacterial wilt: The Disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford. p. 95-112.
- Goulding JN, Stanley J, Saunders N & Arnold C. 2000. Genpme-Sequence-Based Fluorescent Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* **38**:1121-1126.
- Grover A, Azmi W, Gadewar AV, pattanayak D, Naik PS, Shekhawat GS & Chakrabarti SK. 2006. Genotypic diversity in a localized population of *Ralstonia solanacearum* as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Applied Microbiology.* **101**:798-806.
- Guidot A, Prior P, Schoenfeld J, Carrère S, Genin S & Boucher C. 2007. Genomic Structure of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Inferred from Gene Distribution Analysis. *Journal of Bacteriology* **189**:377-387.
- Hayward AC 1964 Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* **27**:265-77.
- Hayward AC 1994 Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Hayward AC and Hartman GL (eds) *Bacterial wilt: The Disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford. p. 123-136.
- Hayward AC. 1991. Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **29**:65-87.
- Hayward AC. 1996. Molecular Biology in Systematics and Diagnosis of Phytopathogenic Prokaryotes. *Phytoparasitica.* **24**:271-275.
- Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. & De Lindo, L. (1990) Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* **69**:269-280.
- Horita M & Tsuchiya. 2001. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **91**:399-407.
- International Journal of Systematic Bacteriology. 1996. Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB. List No. 57. **46**:625-626.
- Janse JD, Goossens E, A. van Beuningen E, Gaisch K & Tjou Tam Sin NNA. 2006. *Begonia elatior*, a new host for *Ralstonia solanacearum* race 1, biovar 1 In: *The 4th International BacterialWilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Janse JD. 1996. Potato brown rot in western Europe – history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **26**:679-695.
- Janse JD. 1991. Infra- Intraspecific Classification of *Pseudomonas solanacearum* Strains, using Whole Cell Fatty Acid Analysis. *System Appl. Microbiol.* **14**:335-345.
- Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M & Kertters K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* **142**:1881-1893.
- Ji P, Allen C, Sanchez-Perez A, Yao J, Elphinstone JG, Jones JB & Momol MT. 2006. Novel diversity and diagnostic challenges associated with *Ralstonia solanacearum* strains in Florida. In: *The 4th International BacterialWilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Jones D & Sackin MJ. 1980. Numerical methods I the classification and identification of bacteria with special reference to the Enterobacteriaceae. In: Goodfellow M & Board RG (Eds). *Microbiological Classification and Identification*. Academic Press, London. p. 73-106.
- Kelman A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. A literature review and bibliography. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin* **99**:1-194.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Landers JP. 1993. capillary electrophoresis: pioneering new approaches for biomolecular analysis. *Trends Biochem Sci* **18**:409-414.

- Leblond-Bouger N, Philippe H, Mangin I, Decaris B. 1996. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analysis reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**:102-111.
- Lee Y, Fan S, Chiu L & Hsia K. 2001. Isolation of an Insertion Sequence from *Ralstonia solanacearum* Race 1 and its Potential Use for Strain Characterization and Detection. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:3943-3950.
- Lelliot RA and Stead DE (1987) Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 216 pp.
- Li X and Hayward AC (1994) Bacterial whole cell protein profiles of the rRNA group II pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology* **74**:324-329.
- Li X, Dorsch M, Del Dot T, Sly LI, Stackebrandt E and Hayward AC (1993) Phylogenetic studies of the rRNA group II pseudomonads based on the 16S rRNA gene sequences. *Journal of Applied Bacteriology* **74**:324-329.
- Libkind A, Ruffini A, van Brook M, Alves L & Sampaio P. 2007. Biogeography, Host Specificity and Molecular Phylogeny of the Basidiomycetous Yeast *Phaffa rhodozyma* and Its Sexual Form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:1120-1125.
- Louws FJ, Fulbright DW, Stevens CT and de Bruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:2286-2295.
- Martin F, Costa G, Delaruelle C & Diez J. 1990. Genomic Fingerprinting of Ectomycorrhizal Fungi by Microsatellite-Primed PCR. 1998. In: Varma, A. Ed. *Mycorrhiza Manual*. Springer-Verlag, Berlin. p. 463-474.
- Meyer W., Maszewska K. and Sorrell T.C. 2001. PCR fingerprinting a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **39**:185-193.
- Moissenet, D.; Bidet, P.; Chenon, A.; Arlet, G. e Vo-thien, H., 2001. *Ralstonia paucula* (Formerly CDC Group IV c-2): Unsuccessful Strain Differentiation With PCR-Based Methods, Study of the 166S-23S Spacer of the rRNA Operon, and Comparison With Other *Ralstonia* Species (*R. eutropha*, *R. pickettii*, *R. gilardii*, and *R. solanacearum*). *Journal of Clinical Microbiology*.**39**:381-384.
- Nakatsu CH, Ryszard K, Lenski RE, Bruijn FJ, Marsh TL & Forney LJ. 1998. Parallel and Divergent Genotypic Evolution in Experimental Populations of *Ralstonia* sp. *Journal of Bacteriology* **180**:4325-4331.
- Natural MP, Lando LAD & Jover EM. 2005. Variability of the Potato Bacterial Wilt Pathogen, *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith) Yabuuchi et al., in the Philippines. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 510 pp..
- Palleroni NJ & Doudoroff. 1971. Phenotypic Characterization and Deoxyribonucleic Acid Homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology*. **107**:690-696.
- Parkinson N, Shoala T, Danial J, Bliss E & Elphinstone J. 2006. Analysis of small tandemly repeated DNA sequences reveals different genotypes within the pandemic biovar 2 *Ralstonia solanacearum* strain. In: *The 4th International BacterialWilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Peterson GL. 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* **100**:201-220.
- Posada D. & Crandal KA. 2001. Selecting the best-fit model for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:13757-13762.
- Pot B, Vandamme P & Kerters K. 1994. Analysis of electrophoretic whole-organism protein 'fingerprint's. In: M. Goodfellow & A. G. O'Donnell (Eds.). *Chemical methods in prokaryotic systematics* (pp. 493-521). Chichester: Jhon Wiley & Sons.
- Poussier S, Prior P, Luisetti J, Hayward C & Fegan M. 2000a. Partial sequencing of the hrpB and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within *Ralstonia solanacearum* species complex.
- Poussier S, Trigalet-Demery D, Vandewalle P, Goffinet B, Luisetti J & Trigalet A. 2000b. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the hrp gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* **146**:1679-1692.
- Poussier S, Vandewalle P & Luisetti J. 1999. Genetic Diveristy of African and Worldwide Strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the hrp Gene Region. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**:2184-2194.

- Prior P & Fegan M. 2005a. Diversity and Molecular Detection of *Ralstonia solanacearum* Race 2 Strains by Multiplex PCR. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 510 pp..
- Prior P & Fegan M. 2005b. Recent Developments in the Phylogeny and Classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Horticulturae* **695**:127-136.
- Rademaker, J. L. W., and F. J. de Bruijn. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: G. Caetano-Anollés, and P. M. Gresshoff (ed.), *DNA markers: protocols, applications and overviews*. John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y. p. 151-171.
- Roberts SJ, Eden-Green SJ, Jones P & Ambler DJ. 1990. *Pseudomonas syzygii* sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. *Syst Appl Microbiol* **13**:34-43.
- Roque HD, Vieira R, Rato S & Luz-Martins M. 2006. Specific Primers for rapid Dtection of *Microsporium audouinii* by PCR in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology* **44**:4336-4341.
- Roumagnac P, Gagnevin L, Gardan L, Sutra L, Manceau C, Dickstein ER, Jones JB, Rott P & Pruvost O. 2004. Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different Xanthomonas species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:15-24.
- Ryskov AP, Jincharadze AG, Pronysak MI, Ivanov PL & Limborska SA. 1988. M13 phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganisms. *FEBS Letters* **233**:388-392.
- Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, Billaut A, Brottier P, Camus JC, Cattolico L, Chandler M, Choisne N, Claudel-Renerd 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 A. 2002. genome Sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*. **415**:497-502.
- Smith JJ, Offord C, Holderness M & Saddler GS. 1995. Genetic Diversity of *Burkholderia solanacearum* (Synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:4263-4268.
- Sneath PHA & Johnson R. 1972. The influence of numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests. *Journal of General Microbiology*. **72**:377-392.
- Stephani E & Mazzuchii U. 1997. Protein electrophoretograms for the identification of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers. *Journal of Plant Pathology* **79**:189-95.
- Stevens P & van Elsas JD. 2006. Deletion of a Putative Genomic Island in a Dutch *R. solanacearum* bittersweet strain. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Taghavi M, Hayward C, Lindsay IS and Fegan M. 1996. Analysis of the Phylogenetic Relationships of Strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii* and the Blood Disease Bacterium of Banana Based on 16S rRNA Gene Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**:10-15.
- Tenreiro R. 1995. *Análise Taxonómica em Leuconostoc oenos – uma perspectiva polifásica*. Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 300 pp.
- Thwaites R, Mansfield J, Eden-Green S & Seal S. 1999. RAPD and rep PCR-based Fingerprinting of vascular bacterial pathogens of *Musa* spp. *Plant Pathology* **48**:121-128.
- Timmis-Wilson TM, Bryant T & Barley MJ. 2001. Strain characterization and 16-23S probe development for differentiating geographically dispersed isolates of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Environ. Microbiol.* **3**:785-797.
- União Europeia. 2006. Directiva 2006/63/CE da Comissão de 14 de Julho de 2006 que altera os anexos II a VII da Directiva 98/57/CE do Conselho relativa ao controlo de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* *Jornal Oficial da União Europeia* L 206 de 27/07/2006, 36-106.
- Van der Wolf JM, Bonants PJM, Smith JJ, Hagenaar M, Nijhuis E, Van Beckhoven RCM, Saddler GS, Trigalet A and Feuillade R (1998) Genetic Diversity of *Ralstonia solanacearum* RACE 3 In Western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. In: Prior Ph, Allen C and Elphinstone J (eds.) *Bacterial Wilt Disease – Molecular and Ecological aspects*. Springer-Verlag, INRA. p. 44-49.
- Vanechoutte M, Kampfer P, De Baere T, Falsen Enevold & Verschraegen. 2004. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *ralstnia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts *et al.* 1990) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:317-327.

- Vauterin L, Swings J & Kersters K. 1993. Protein electrophoresis and classification. In: Goodfellow M & O'Donnell AG (Eds). *Handbook of new bacterial systematics*. Academic Press, London. p. 251-280.
- Versalovic J, Schneider M, Bruijn FJ & Lupski JR. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Moll. Cell. Biol.* **5**:25-40.
- Vinuesa P, Rademaker JLW, Bruijn FJ & Werner D. 1998. Genotypic Characterization of *Bradyrhizobium* Strains Nodulating Endemic Woody Legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Genes Encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive Extragenic palindromic PCR Genomic Fingerprinting, and Partial 16S rDNA Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:2096-2104.
- Vos D, Bouton C, Sarniguet A, Vos P, Vauterin M & Cornelis P. 1998. Sequence Diversity of the *oprI* gene, Coding for Major Outer Membrane Lipoprotein I, among rRNA Group I Pseudomonads. *Journal of Bacteriology* **180**:6551-6556.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, Van de Lee T, Hornes, ; Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M & Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. **23**:4407-4414.
- Weising K, Atkinson RG & Gardner RC. 1995. Genomic Fingerprinting by Microsatellite-primed PCR: A Critical Evaluation. *PCR Methods and Applications*. **4**:249-255.
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian E, Guilbaud C & Prior P. 2005. Emerging Strains of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies): A case study for Epidemiology of Bacterial Wilt. *Acta Horticulturae* **695**:145-152.
- Williamson L, Hudelson BD & Allen C. 2002. *Ralstonia solanacearum* strains isolated from geranium belong to race 3 and are pathogenic on potato. *Plant Disease* **86**:987-991.
- Woose CR. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* **51**:221-271.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H & Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiology and Immunology* **39**:179-186.

Capítulo⁵

Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* biovar 2/raça 3 nos hospedeiros alternativos *Solanum nigrum* e *Solanum dulcamara*

| | |
|-------|--|
| 5.1 | Plantas espontâneas e outros hospedeiros "alternativos" |
| 5.2 | Objectivos |
| 5.3 | Métodos experimentais e de análise de dados |
| 5.3.1 | Culturas bacterianas |
| 5.3.2 | Material vegetal |
| 5.3.3 | Substratos |
| 5.3.4 | Observações e procedimentos laboratoriais |
| 5.3.5 | Tratamento dos dados analíticos |
| 5.4 | Análise dos resultados experimentais |
| 5.4.1 | Presença de sintomas em <i>Solanum nigrum</i> e <i>Solanum dulcamara</i> |
| 5.4.2 | Sobrevivência e dinâmica das populações de <i>Ralstonia solanacearum</i> |
| 5.5 | Discussão e Conclusões |
| 5.6 | Referências bibliográficas |



5.1 | Plantas espontâneas e outros hospedeiros “alternativos”

A elevada plasticidade de *R. solanacearum* no que diz respeito à sua capacidade de sobrevivência em condições edafoclimáticas muito distintas reflecte-se, como já frequentemente referido, na vasta gama de famílias botânicas que possui como hospedeiros principais ou alternativos.

Kelman escreve em 1953 um artigo de revisão onde enumera de forma exaustiva os hospedeiros conhecidos de *R. solanacearum*. Entre 1953 e 1994 surgiram inúmeras referências sobre novos hospedeiros, declarando Hayward (1994b) que se torna impossível proceder a uma nova revisão, e indicando que, à excepção de *Agrobacterium tumefaciens*, *R. solanacearum* é a espécie bacteriana que possui uma maior gama de hospedeiros. Apenas a totalidade das espécies do género *Xanthomonas* parece ultrapassar em número a variedade de plantas que afecta. Hayward (1991) constata que *R. solanacearum* afecta mais de 450 espécies vegetais pertencentes a 55 famílias botânicas, valores que continuam a ser amplamente citados em bibliografia muito recente (Wicker *et al.*, 2007). Entre os vários trabalhos publicados a este respeito, cita-se o de Janse *et al.* (2005), por compilar, de forma mais ou menos exaustiva, as espécies vegetais referidas na restante bibliografia como hospedeiros, embora se refira apenas a estirpes do biovar 2/raça 3.

De entre a variada lista de plantas hospedeiras contam-se várias famílias de monocotiledóneas de grande importância económica. Referem-se os géneros *Musa*, *Zingiber*, *Heliconia* e *Strelitzia*. Entre as dicotiledóneas herbáceas contam-se várias leguminosas nomeadamente *Arachis hypogea*, Rosáceas como o morangueiro, *Labiatae* e *Convolvulaceae* (*Ipomoea batatas*). Existem ainda muitas árvores e arbustos como *Anona* spp., *Phoenix* spp., *Caryca papaya*, *Diospyros digyna*, *Morus alba*, *Eucalyptus* e *Olea* sp., entre outros (Hayward, 1994b).

Entretanto têm surgido inúmeras referências a novos hospedeiros integrando espécies cultivadas e espontâneas com infecções causadas pelas diferentes raças e biovars de *R. solanacearum*. Entre estes referem-se as plantas espontâneas *Marsypianithes chamaedrys* e *Hyptis suaveolens* (Quezado-Soares & Lopes, 1994), *Piper hispidinervium* (Lopes *et al.*, 1998), *Eryngium foetidum* e *Talinum triangulare* (Lopes *et al.*, 2003) no Brasil; *Solanum anguivi*, *S. torvum*, *S. xanthocarpum*, *Croton bonplandianum*, *Euphorbia hirta*, *Colcasia esculenta*, *Portulaca oleracea*, *Phyllanthus niruri* e *Parthenium hysterophorus* em Bangala (Samaddar *et al.*, 1998) e *Urtica dioica* na Holanda (Wenneker *et al.*, 1999).

Após variados surtos de *R. solanacearum* biovar 2/raça 3 na Europa, no final do século XX verificou-se, em alguns países, que *Solanum dulcamara* possuía um importante papel na sobrevivência deste organismo de quarentena, especialmente nos meses mais frios do ano, permitindo a sua dispersão através de águas superficiais contaminadas, que veiculariam este agente patogénico, infectando culturas solanáceas de elevada importância económica e agrícola (Elphinstone *et al.*, 1998; Janse & Schans, 1998). Esta espécie ripícola adquiriu

assim o estatuto de principal hospedeiro alternativo nos países da Europa ocidental.

Hong *et al.* (2006) detectaram igualmente, nos Estados Unidos, a presença de infecções latentes causadas por estirpes do biovar 1/raça 1 de *R. solanacearum* nas plantas espontâneas aquáticas *Hydrocotyle* spp. e *Polygonum pennsylvanicum*, tendo as primeiras desenvolvido sintomas visíveis da doença em condições experimentais.

A escala de plantas espontâneas constantes na literatura como hospedeiros alternativos de *R. solanacearum* é também muito vasta e continuamente surgem novos registos referentes a novas espécies, géneros e famílias os quais, muitas vezes, se baseiam em resultados obtidos através de inoculações experimentais, não procedem à caracterização infra-específica das estirpes no que diz respeito a raças, biovares ou grupos genómicos e, quando as espécies são identificadas a partir infecções naturais, não determinam se a origem da infecção resulta de uma colonização epifítica ou endofítica. Omitem ainda frequentemente informação sobre o órgão da planta a partir do qual se procede à recuperação da bactéria.

A definição dos vários tipos de hospedeiros foi também estabelecida por Kelman (1953) e teve por base alguns critérios: (i) hospedeiros susceptíveis em condições naturais; (ii) susceptíveis em condições naturais e também por inoculação; (iii) muito susceptíveis por inoculação. As espécies vegetais que cumprissem todos estes requisitos seriam consideradas hospedeiros verdadeiros. Noutra grupo, integrou aqueles que designou por hospedeiros não verdadeiros, onde ficariam as espécies que cumprissem alguns critérios menos restridentes.

Outro tipo de abordagem usada prende-se com o interesse económico e/ou agrícola de determinada espécie vegetal, e faz a distinção entre espécies vegetais cultivadas relativamente àquelas que fazem parte da flora espontânea, utilizando as designações de hospedeiros principais e alternativos, respectivamente. Esta nomenclatura, não informa acerca do comportamento dos últimos no que respeita à sua capacidade para albergar *R. solanacearum*, não devendo, por isso, menosprezar-se o seu contributo como reservatórios de inóculo. Contrariamente, e tendo em conta a elevada abundância e diversidade que possuem, deve advertir-se que podem constituir uma importante fonte de inóculo, devendo ser tidos em conta quando se pretende estabelecer estratégias de controlo e erradicação deste organismo de quarentena. Hayward (1994b) refere que o conhecimento sobre o contributo destas espécies no processo epidemiológico é incompleto, mas que poderão ter um impacto muito importante na manutenção da doença, mesmo quando usados esquemas de rotação em períodos de quarentena.

As plantas espontâneas podem comportar-se como resistentes, susceptíveis ou tolerantes, constituindo neste último caso reservatórios assintomáticos que albergam populações latentes de *R. solanacearum*. Nestas condições, este agente fitopatogénico pode manter-se viável até ao ciclo cultural seguinte do seu hospedeiro natural (Smith *et al.*, 1998). Por outro lado, podem também promover o crescimento da população deste organismo no solo (Hayward, 1994a). A rizosfera das plantas espontâneas parece constituir um local privilegiado para a sobrevivência de *R. solanacearum*, inversamente ao verificado no solo desprovido de hospedeiros (Granada & Sequeira, 1983).

Tendo em conta o estudo efectuado por Gillings & Fahy (1994), foi possível verificar que as estirpes do biovar 2/raça 3 parecem ter tido origem em zonas de grande altitude, nos Andes, onde coevoluíram com plantas de batateira selvagem (*Solanum phureja*), as quais têm centro de origem nesta região, e se mostram resistentes para estirpes deste grupo. Por outro lado, as estirpes deste biovar isoladas da bacia do Amazonas parecem possuir características fenotípicas diferentes, mostrando-se patogénicas noutras espécies de *Solanum* sp..

O papel do hospedeiro parece condicionar assim também a diversidade das estirpes de *R. solanacearum*, conforme verificaram Elbaz *et al.* (2005) através de estudos de diversidade realizados com estirpes do biovar 2/raça 3, inoculadas em plantas de tomateiro de uma cultivar parcialmente resistente, tendo uma parte importante das mesmas estirpes adquirido perfis metabólicos distintos. Stevens & van Elsas (2006) detectaram alterações genéticas nas estirpes obtidas de *Solanum dulcamara* (doce-amarga), crescendo em regiões com águas superficiais contaminadas, na Holanda. Nestas condições *R. solanacearum* parece ter desenvolvido estratégias de adaptação a baixas temperaturas, que passaram pela deleção de uma ilha genómica putativa que lhe permite, por interacção com o hospedeiro, sobreviver em condições menos favoráveis.

A variabilidade genómica de *S. dulcamara* poderá também interferir na interacção patogéneo-hospedeiro (Winfield *et al.*, 2006). Costa *et al.* (2006) verificaram, por sequenciação de um segmento de 260 a 300 pb do gene de 16S rRNA de estirpes de *R. solanacearum*, obtidas da região amazónica, que algumas estirpes do biovar1/raça 1, com um perfil de virulência atípico, infectam apenas *Eryngium foetidum* (*Apiaceae*). Estas estirpes, com um perfil de BOX-PCR também distinto, parecem constituir uma nova variante deste complexo de espécies.

A presença de plantas espontâneas, de grande abundância na flora de campos de cultivo de solanáceas, comportando-se como hospedeiros de *R. solanacearum*, causa grandes dificuldades ao controlo e erradicação do patogéneo, limitando a utilidade das rotações (Tusiime *et al.*, 1998). Estes autores encontraram, no Uganda, uma gama de plantas espontâneas apresentando apenas infecções latentes, mais vasta que o esperado (12 das 14 espécies estudadas), e concluíram que as interacções hospedeiro-patogéneo-ambiente devem possuir um papel importante na supressão de sintomas de doença em plantas hospedeiras não solanáceas.

Dittapongpitch & Surat (2003) detectaram também níveis de incidência de *R. solanacearum* em plantas espontâneas elevados e superiores aos verificados em amostras de solo, tendo constatado que *Physalis minima*, *Amatranthus spinosus* e *Euphorbia hirta* pareciam albergar preferencialmente a bactéria. Estas conclusões podem, contudo, ser afectadas pela fidedignidade dos métodos de diagnóstico utilizados (Capítulo 2). Parece, no entanto, que nestas condições *R. solanacearum* terá um reduzido poder competitivo comparativamente ao que possui quando associada a plantas hospedeiras (Sequeira, 1985), as quais poderão constituir, por isso, um reservatório preferencial deste organismo.

O papel desempenhado pelas sementes de algumas espécies hospedeiras como reservatórios e agentes de disseminação de *R. solanacearum* é um aspecto que se encontra nitidamente por esclarecer. Existem trabalhos acerca da sua sobrevivência em sementes de *Arachys hypogea* (Dongfang *et al.*, 1994), *Solanum melongena* (Sumithra, 2000) e de *Lycopersicon esculentum* (Martins *et al.*, 2005). Todos estes autores referem que a sobrevivência e transmissão por via seminal poderá depender do nível de desidratação da semente, bem como da temperatura, e de outros factores climáticos. Efectivamente, verificou-se que a sobrevivência da bactéria poderá estar dependente do nível de humidade presente nas sementes, podendo viabilizar-se para valores superiores a 10% (Zhang *et al.*, 1993). Conclui-se assim que, embora não sendo prevalente, estes elementos poderão constituir um contributo para a sobrevivência de *R. solanacearum*. Já a transmissão de *R. solanacearum* a partir de sementes de *S. melongena* encontra-se devidamente fundamentada e permite concluir que, na presença de condições climáticas favoráveis, poderá possuir uma grande importância como factor de risco na disseminação do patogéneo.

Nos últimos anos tem sido notório o número de novas plantas hospedeiras, utilizadas como ornamentais, nas quais se identificou *R. solanacearum*, como consequência das novas rotas do comércio global. *Pelargonium zonale* (Quênia, Guatemala, Costa Rica e Brasil) na Europa ocidental; *Epipremnum aureum* (Costa Rica) e *Anthurium andreanum* (Equador) nos Estados Unidos da América; *Curcuma longa* e *C. anisomatifolia* (Indonésia, África do Sul, Tailândia e Zimbabué) e *Begonia elatior* (Costa Rica) na Holanda (Janse *et al.*, 2006). Estas sinalizações têm sido muitas vezes associadas a plantas com infecções latentes, com origem em diferentes raças e biovars de *R. solanacearum*.

Tendo em conta a importância da cultura de *Pelargonium* sp. a nível mundial, e uma vez que a maior parte dos propágulos comercializados tem origem em países onde *R. solanacearum* se mostra endémica, Norman *et al.* (2006) estudaram mais de 60 cultivares deste género pertencentes às cultivares 'zonal', 'ivy', 'regal' e 'scented', que mostraram susceptibilidade diferenciada, comportando-se algumas cultivares como portadores assintomáticos de doença, quando inoculados com estirpes das raças 1 e 3.

A persistência de *R. solanacearum* biovar 2/raça 3 em plantas espontâneas e culturas alternativas quando se aplicam esquemas de rotação de regiões onde se procede à utilização de águas superficiais contaminadas, foi avaliada por Van Vaerenbergh *et al.* (2006). *R. solanacearum* foi recuperada a partir da rizosfera de *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Chrysanthemum segetum*, *Senecio vulgaris* e *Urtica urens*, ocorrendo infecção sistémica apenas em *Solanum nigrum*. Este organismo não foi recuperado de plantas espontâneas perenes, bem como de plantas cultivadas de feijoeiro, espinafre, ervilheira, trigo, milho, e de outras culturas arvenses como *Lolium* sp. ou *Trifolium* sp. *R. solanacearum* persistiu no solo em plantas infectadas de *S. nigrum* durante o Inverno, mas esse inóculo não foi suficiente para originar infecções em tubérculos de batateira plantados nesse solo, no ano seguinte, nas condições edafoclimáticas prevalentes na Bélgica. Neste caso, a presença de plantas espontâneas hospedeiras parece aumentar o risco de contaminação relativamente ao cultivo de plantas que não as solanáceas.

Dada a capacidade que *R. solanacearum* biovar 2/raça 3 possui para infectar muitos hospedeiros, além das plantas solanáceas, deve ser dada uma especial atenção a sua detecção em novas espécies vegetais de modo a evitar a implantação do cultivo dessas espécies em áreas onde a bactéria é endêmica (Álvarez *et al.*, 2006). A observação de sintomas produzidos por inoculações experimentais, o resultado de isolamentos e a observação de cortes histológicos, permitirá decidir o estatuto de diferentes espécies vegetais, com potencial para integrar os esquemas de rotação, como culturas alternativas. A coloração diferencial de cortes histológicos realizados a partir de regiões da raiz e do caule, permite localizar e determinar a efectiva extensão dos danos causados por *R. solanacearum* em espécies vegetais de interesse.

Huang (2006) constata a necessidade de se proceder à caracterização dos isolados, obtidos a partir de novos hospedeiros, de modo a conhecer melhor a realidade epidemiológica. Por outro lado, e como medida de precaução, refere ainda que plantas ornamentais evidenciando sintomas por inoculação (*Nicotiana x alata*, *Zinnia elegans* e *Portulaca grandiflora*) deverão ser consideradas como potenciais hospedeiros, uma vez que as condições de viveiro propiciam a manifestação da doença.

Ji *et al.* (2006) confirmaram ainda a presença de estirpes do biovar 3/raça 1 na Florida infectando plantas de *Hydrangea paniculata*, *H. macrophylla* e de *Pelargonium x hortorum*, muito relacionadas com estirpes do sequevar 5, de um 'cluster' distinto das estirpes do filotipo II, pertencentes ao biovar 1, isoladas da Martinica, Brasil e Burquina-Faso, muito virulentas em tomateiro, e ao mesmo tempo capazes de causar sintomas em plantas de tabaco. Este estudo demonstra a presença de estirpes de *R. solanacearum* claramente distintas de outras usualmente detectadas naquela latitude, para aqueles hospedeiros.

Também Wicker *et al.* (2005, 2007) verificaram a emergência de novas estirpes de *R. solanacearum* em Martinica com um novo potencial em termos de capacidade patogénica relativamente à escala de hospedeiros, afectando *Anthurium andreanum*, *Heliconia caribea*, espécies cucurbitáceas como *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata* e *Cucurbita pepo*, e plantas espontâneas como *Urtica* sp., *Solanum americanum*, *Cleome viscosa* e *Lilanthus* sp..

Em Portugal as espécies espontâneas identificadas como hospedeiras parecem mostrar-se normalmente mais resistentes que as plantas cultivadas, uma vez que não demonstram sintomas tão evidentes da doença. Por outro lado, os níveis populacionais da bactéria tendem também a ser mais baixos, sobretudo no Outono-Inverno. A análise de várias centenas de plantas espontâneas permitiu obter diagnósticos positivos, comprovados pelo isolamento da bactéria a partir de lesões resultantes da colonização dos feixes vasculares, para as espécies *Capsella rubeola*, *Chenopodium album*, *Datura stramonium*, *Polygonum arenastrum*, *Portulaca oleracea*, *Senecio vulgaris*, *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *S. sublubatum* e *Urtica urens*. De entre estas, todas muito frequentes no país, e muitas vezes também em campos de cultivo de solanáceas (Manso, 2004), salientam-se *D. stramonium*, *S. dulcamara* e *S. nigrum*, todas pertencentes à família *Solanaceae* (Cruz *et al.*, 2001). Além

destas, constatou-se a existência de outras espécies espontâneas como potenciais hospedeiras. Estão neste grupo *Amaranthus retroflexus*, *Apium nodiflorum*, *Cynodon dactylon*, *Cyperus rotundus*, *Cyperus longus*, *Lathyrus annuus*, *Digitaria sanguinalis*, *Heliotropium europaeum*, *Polygonum persicaria*, *Scanix* sp., *Tribulus terrestris* e *Typha* sp. (Capítulo 3).

Além do risco associado à manutenção e dispersão de inóculo, que novos hospedeiros não identificados poderão ocultar, o seu potencial papel no desenvolvimento de novos perfis de virulência de estirpes de *R. solanacearum* demonstra a necessidade de proceder de forma sistemática à monitorização e identificação desses hospedeiros, sua abundância, determinar o seu papel na persistência daquele organismo entre ciclos culturais e avaliar a sua importância como factores de risco associados à dispersão.

5.2 | Objectivos

As conclusões retiradas no Capítulo 3 evidenciam a notória contribuição que *S. nigrum* possui na sobrevivência e repositório de *R. solanacearum* em Portugal. POR sua vez, *S. dulcamara* planta espontânea ripícola sarmentosa, com um papel preponderante na sobrevivência deste organismo fitopatogénico de quarentena nos países do norte da Europa Ocidental, parece não possuir em Portugal a mesma relevância na epidemiologia da doença.

Ainda no que diz respeito a *S. dulcamara*, o estudo de plantas apresentando necrose dos feixes vasculares permitiu averiguar que o grau de desenvolvimento da planta e o local a partir do qual se procede à colheita de amostras, para análise laboratorial, poderá condicionar as conclusões a retirar relativamente à sua intervenção naquele processo.

O estudo comparativo de alguns aspectos relacionados com a capacidade que estirpes do biovar 2/raça 3 de *R. solanacearum* possuem de desenvolver sintomas externos de doença, e de proceder à colonização endofítica dos feixes vasculares destas espécies espontâneas, mostra-se importante. Por outro lado, não se encontra também claramente esclarecido o papel que as plantas de *S. dulcamara*, que não se encontram imersas, poderão possuir na sobrevivência de *R. solanacearum*. A imersão das raízes de plantas desta espécie poderá afectar a dinâmica das populações de *R. solanacearum* presentes na água. Convém ainda esclarecer a influência que a rizosfera destas espécies espontâneas possui na dinâmica de populações independentes de *R. solanacearum* no solo. O estudo destas questões mostra-se mais difícil *in situ*, na presença de nichos ecológicos apresentando condições edafoclimáticas distintas, onde a influência de variados factores se mostra impossível de quantificar. Torna-se assim mais fácil tentar esclarecer as diferentes questões levantadas em condições de ensaio padronizadas. Assim foram objecto deste estudo: i) a expressão de sintomas na parte aérea dos hospedeiros; ii) as alterações do seu desenvolvimento radicular; iii) a colonização

dos feixes vasculares; iv) a dinâmica das populações de *R. solanacearum* no solo e na água.

5.3 | Métodos experimentais e de análise de dados

5.3.1 | Culturas bacterianas

Após a realização de ensaios prévios de patogenicidade utilizando diversas estirpes portuguesas de *R. solanacearum* biovar 2/raça 3, em condições de inoculação e incubação padronizadas, elegeu-se o isolado CPBF 711 que mostrou ser mais agressivo em diferentes hospedeiros para ser utilizado como fonte de inóculo neste ensaio.

Produziu-se o inóculo a partir do crescimento desta estirpe em placas de meio SPA após incubação durante 48h a 28°C. Este crescimento foi utilizado para inocular quatro litros de caldo nutritivo (Nutrient Broth – NB, Difco Laboratoires, Le Pont de Claix, França) em frascos tipo Schott. O crescimento bacteriano foi obtido por agitação à temperatura ambiente durante o mesmo período de tempo. Procedeu-se então à leitura da absorvância (OD=0,1 a 630 nm), tendo as suspensões sido ajustadas de modo a dosear uma concentração inicial de 10^9 ufc.mL⁻¹. Esta concentração de inóculo foi confirmada pelo método das placas de contagem.

A suspensão inicial foi sujeita a uma série de diluições decimais em água da rede pública, após ter sido avaliada a inexistência de efeitos negativos para o desenvolvimento de *R. solanacearum*, provocados pelas desinfecções efectuadas de modo a torná-la adequada ao consumo humano (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Modalidades de inóculo a utilizar no ensaio de sobrevivência de *Ralstonia solanacearum*, e respectivas concentrações.

| Modalidade | Solo (ufc.g ⁻¹) | Água (ufc.mL ⁻¹) |
|------------|-----------------------------|------------------------------|
| A | 10^9 | 10^8 |
| B | 10^7 | 10^6 |
| C | 10^5 | 10^4 |
| D | 10^3 | 10^2 |
| E | 10^1 | 10^0 |
| C- | - | - |

5.3.2 | Material Vegetal

As sementes de *S. dulcamara* utilizadas no ensaio foram adquiridas pela DGPC, enquanto as de *S. nigrum* foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Protecção das Plantas e de Fitoecologia (DPPF) do Instituto Superior de Agronomia. Foram optimizadas as condições de germinação das duas espécies vegetais, que são claramente distintas apesar de pertencerem à mesma família botânica e género.

No que diz respeito a *S. dulcamara*, procedeu-se à pré-germinação das sementes em água destilada esterilizada, ou alternativamente em placas de Petri onde se criou uma câmara húmida. Em ambos os casos as sementes foram incubadas durante 7 dias a 28°C, em condições de obscuridade.

As sementes de *S. nigrum* foram germinadas de acordo com Sá & Vasconcelos (1981). Após um choque térmico de dois dias/4°C, procedeu-se à pré-germinação recorrendo à utilização de câmaras húmidas em placa de Petri. Deste modo, após a quebra de dormência, as placas foram transferidas para uma câmara de crescimento por um período de uma semana, com alternância de luz/obscuridade (16h/8h) e temperatura (22°C/15°C).

As plântulas de ambas as espécies, obtidas após germinação, foram transferidas para vasos de secção quadrada (9x9 cm) contendo turfa esterilizada, e mantidas em câmara de crescimento nas condições já referidas. Realizaram-se periodicamente as regas e adubações necessárias ao desenvolvimento adequado das plantas. Após duas semanas de crescimento das plantas, produziram-se estacas contendo 2 a 3 nós, que foram então enraizadas e mantidas em alvéolos contendo turfa até à instalação do ensaio.

5.3.3 | Substratos

Utilizou-se um solo de textura arenosa colhido num local de aspecto homogéneo a uma profundidade entre os 0 e os 30 cm. O solo foi recolhido de um terreno agrícola dos arredores de Lisboa, que se sabia não ter albergado culturas solanáceas nos últimos 30 anos. A determinação da humidade do solo foi efectuada de acordo com o procedimento descrito por Botelho da Costa (1995).

O solo foi pesado e distribuído em seis sacos de polietileno resistentes, correspondentes às diferentes modalidades ou níveis de infestação. Cerca de 5 kg de solo/modalidade foram infestados com 500 ml de uma suspensão bacteriana contendo a concentração adequada, à excepção do controlo negativo em que se utilizou água da rede pública. A distribuição homogénea das células bacterianas foi conseguida através da agitação enérgica dos sacos. O solo infestado foi de seguida distribuído por 10 vasos de secção quadrada (9x9 cm) onde foram plantadas as duas espécies vegetais. Para cada nível de infestação, utilizaram-se cinco

vasos por espécie vegetal, tendo-se instalado três plantas por vaso, num total de 15 plantas por espécie vegetal e nível de concentração de inóculo.

No que diz respeito ao substrato água, utilizaram-se 2000 ml de cada suspensão bacteriana correspondente a um nível de infestação distinto, que foram distribuídos por cinco copos (400 ml/copo). No substrato água foram instaladas apenas plantas de *S. dulcamara*, utilizando uma distribuição semelhante à referida para o solo.

Os vasos e copos contendo as plantas hospedeiras foram então transferidos para uma câmara de crescimento, com alternância de luz/obscuridade (16h/8h) e temperatura (22°C/15°C), onde se mantiveram por um período de cinco semanas.

5.3.4 | Observações e procedimentos laboratoriais

Procedeu-se à observação e registo diário de sintomas típicos da doença nas plantas. As plantas apresentando sintomas bem definidos e estáveis foram recolhidas e analisadas de modo a verificar a responsabilidade de *R. solanacearum* pelos sintomas evidenciados. Para estas plantas procedeu-se igualmente ao registo de todos os sintomas externos da parte aérea e radicular, bem como dos sintomas internos evidenciados pelos feixes vasculares.

A recuperação de *R. solanacearum* a partir do material vegetal colhido para análise, bem como de alíquotas de solo e de água foi efectuada de acordo com os procedimentos descritos no Capítulo 2 e na Directiva 2006/63/CE (União Europeia, 2006).

No que diz respeito à análise de segmentos dos feixes vasculares, no caso de *S. nigrum* destacaram-se pequenos fragmentos de tecido xilémico da zona de transição entre a raiz e o caule. Para *S. dulcamara*, após observação cuidada dos sintomas, destacaram-se também pequenos fragmentos de tecido vegetal de três locais do caule, nomeadamente aos zero, cinco e 15 cm de distância a partir da região radicular, que foram depois analisados separadamente.

Periodicamente efectuou-se uma rega com uma solução nutritiva de modo a evitar qualquer ambiguidade relativamente a sintomas gerados por deficiências de minerais, que poderiam surgir sobretudo nas plantas de *S. dulcamara* instaladas em água.

Cinco semanas após instalação do ensaio procedeu-se ao seu levantamento, com análise das plantas ainda presentes de forma isolada ou em lotes de três plantas, de acordo com o nível de infestação, substrato e hospedeiro, dependendo da presença ou ausência de sintomas de doença. Foram ainda analisadas 18 amostras de solo e seis amostras de água resultantes das várias combinações hospedeiro, substrato e nível de infestação, onde se incluíram os controlos negativos e o solo sem hospedeiro.

5.3.5 | Tratamento dos dados analíticos

Procedeu-se ao cálculo da frequência relativa das plantas evidenciando sintomas de doença por vaso no final de cada semana de ensaio, sendo os valores expressos em percentagem e transformados em $\arcsen \sqrt{x}$, de modo a obter uma distribuição normal da população, para posterior tratamento estatístico.

Os novos valores foram então sujeitos a uma análise de variância de um ou mais factores. Em alguns dos casos surgiram grupos em que se verificou a presença ou ausência de doença, na totalidade das plantas, pelo que não se reuniram os critérios necessários para realização de análise de variância. Nestas situações procedeu-se à realização de ANOVA prévia, e à comparação múltipla das médias de cada grupo *a posteriori*, utilizando-se o teste de Tukey (HSD) (Zar, 1996). O nível de significância utilizado na análise de variância foi variável, enquanto para os testes de Tukey se utilizou um nível de 0,05.

5.4 | Análise dos resultados experimentais

5.4.1 | Presença de sintomas em *Solanum nigrum* e *Solanum dulcamara*

Foram observados sintomas evidentes de doença na presença de elevados níveis de infestação em ambas as espécies espontâneas utilizadas no ensaio, independentemente do substrato em que se encontravam instaladas. De entre os sintomas registados, e dependendo da severidade da doença, contavam-se a presença de uma murchidão típica, mais evidente no extremo apical do caule de *S. dulcamara*, e nas folhas da base de *S. nigrum*. Nas raízes observou-se um desenvolvimento inferior da massa radicular, o qual estava por vezes associado a um menor desenvolvimento da parte aérea das plantas. Internamente, verificou-se a presença de necrose dos feixes vasculares para as duas espécies vegetais. As plantas de *S. dulcamara* instaladas em água parecem ter sido as que expressaram uma maior variedade de sintomas que apareceram de forma isolada ou em associação com outros sintomas. Referem-se, de acordo com a sua frequência, a necrose dos feixes vasculares (61%), flacidez foliar (42%), atrofia radicular (29%), clorose foliar (28%), desfoliação (19%) e nanismo (3%). Aos sintomas mais frequentes nestas condições, e também observados em condições naturais, será dada uma atenção particular.

5.4.1.1 | Sintomas externos da parte aérea dos hospedeiros

Cerca de 24h após o estabelecimento do ensaio, as plantas de *S. dulcamara* sujeitas ao nível de infestação mais elevado da água (10^8 ufc.mL⁻¹) mostravam flacidez parcial das folhas. Estes sintomas evoluíram, ao longo da primeira semana, para uma murchidão generalizada das folhas, as quais mostravam igualmente descolorações caracterizadas por cloroses e/ou necroses do limbo. A manifestação destes sintomas poderá ter decorrido da produção de toxinas por parte de algas ou cianobactérias que proliferaram na água daqueles contentores.

Para as plantas daquela espécie, bem como para as plantas de *S. nigrum* estabelecidas em solo infestado, a manifestação dos primeiros sintomas foi observada apenas no final da primeira semana de ensaio em plantas sujeitas a níveis de infestação variando entre 10^8 e 10^6 ufc.g⁻¹, revelando diferenças significativas no número de plantas visivelmente doentes entre as duas espécies vegetais ($\chi^2=13,303$; $p= 0,0003$).

Para níveis de infestação inferiores dos diferentes substratos, a expressão da doença tornou-se notória decorridas três semanas do início do ensaio, à excepção de um caso pontual de uma planta de *S. dulcamara* estabelecida em água doseando 10^2 ufc.mL⁻¹. Na generalidade dos casos, os sintomas evidenciados pela parte aérea das plantas eram constituídos por murchidão e descoloração das folhas mais próximas da base do caule, e desfoliação em algumas plantas de *S. dulcamara*.

Foi possível confirmar a presença de *R. solanacearum* nos extractos vegetais através de ensaios de aglutinação, e proceder ao seu isolamento para a generalidade das plantas que apresentavam sintomas de doença. A identidade de presumíveis colónias foi também confirmada através de ensaios de aglutinação em lâmina e/ou PCR. Apenas para uma planta de *S. nigrum* com sintomas, instalada em solo infestado com 10^2 ufc.mL⁻¹, não foi possível proceder à recuperação deste organismo por isolamento.

A análise comparativa da expressão da doença nos hospedeiros *S. nigrum* e *S. dulcamara*, traduzida pela presença de murchidão das folhas após 35 dias de exposição a diferentes níveis de infestação dos substratos solo e água, foi efectuada através de uma análise prévia de variância, e teste "post hoc" de Tukey para comparação múltipla de médias, devido à ausência de homocedasticidade, por falta de variância de amostras de alguns dos grupos.

No que diz respeito ao estudo comparativo dos sintomas na parte aérea evidenciados por *S. dulcamara* e *S. nigrum*, em solos com diferentes concentrações de inóculo, no final do ensaio, o factor hospedeiro não demonstrou possuir um efeito significativo. Por outro lado, o factor nível de infestação demonstrou afectar o número de plantas apresentando sintomas típicos de doença, conforme se demonstra na Tabela 5.2. A interacção entre os dois factores também não se mostrou significativa, podendo proceder-se à análise do efeito do factor concentração de inóculo, de forma isolada, independentemente da espécie espontânea presente neste substrato.

Tabela 5.2 - Análise de variância sobre os factores hospedeiro (*Solanum nigrum* e *Solanum dulcamara*) e concentração de inóculo (10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 , 10^0 e C-) no substrato solo (ufc.g⁻¹).

| VARIAÇÃO | GL | SQD | QM | Fs | p | Significância |
|---------------|----|-----------|-----------|--------|---------|---------------|
| Entre grupos | 11 | 78397,629 | 7127,057 | 31,493 | 0,00000 | *** |
| A=Hospedeiro | 1 | 6,319 | 6,319 | 0,028 | 0,86799 | NS |
| B=Conc. Inoc. | 5 | 77476,242 | 15495,248 | 68,471 | 0,00000 | *** |
| AxB | 5 | 915,068 | 183,014 | 0,809 | 0,54923 | NS |
| Erro | 48 | 10862,519 | 226,302 | | | |

GL - graus de liberdade; SQD - soma dos quadrados; QM - quadrado médio; Fs - F calculado; p - erro; F tab - F tabelado; NS - não significativo; *** - significativo para $\alpha=0,001$.

A ausência de homocedasticidade verificada resultou da presença de sintomas na totalidade das plantas das duas espécies sujeitas a elevadas concentrações de inóculo no solo (10^8 ufc.g⁻¹).

A comparação múltipla de médias, efectuada *a posteriori* e com recurso ao teste de Tukey (HSD), revelou a presença de um número médio de plantas com sintomas de murchidão significativamente superior (80 a 100%), independentemente da espécie vegetal espontânea, para níveis de infestação do solo superiores a 10^4 ufc.g⁻¹. Para este limiar existem diferenças significativas entre as duas espécies vegetais, apresentando *S. nigrum* um número médio de plantas com sintomas visíveis significativamente inferior (33%). Para níveis de infestação iguais a 10^2 ufc.g⁻¹ de solo, as duas espécies não revelam diferenças significativas apresentando uma reduzida percentagem de plantas com sintomas de murchidão, com 13% para *S. dulcamara* e 7% para *S. nigrum* (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Presença de sintomas de murchidão em plantas de *Solanum nigrum* (Sn) e *Solanum dulcamara* (Sd) expostas a diferentes níveis de infestação do solo. Comparação múltipla do número médio de plantas com sintomas obtida pelo teste de Tukey (HSD). Presença de diferenças significativas para $q^*(0,05,60,70)=6,375$.

| | Sn C- | Sd C- | Sn 10 ⁰ | Sd 10 ⁰ | Sn 10 ² | Sd 10 ² | Sn 10 ⁴ | Sd 10 ⁴ | Sn 10 ⁶ | Sd 10 ⁶ | Sn 10 ⁸ | Sd 10 ⁸ |
|--------------------|-------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Sn C- | 0,00 | | | | | | | | | | | |
| Sd C- | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | | | |
| Sn 10 ⁰ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | | |
| Sd 10 ⁰ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | |
| Sn 10 ² | 1,05 | 1,05 | 1,05 | 1,05 | 0,00 | | | | | | | |
| Sd 10 ² | 2,10 | 2,10 | 2,10 | 2,10 | 1,05 | 0,00 | | | | | | |
| Sn 10 ⁴ | 4,77 | 4,77 | 4,77 | 4,77 | 3,72 | 2,68 | 0,00 | | | | | |
| Sd 10 ⁴ | 6,40 | 6,40 | 6,40 | 6,40 | 5,35 | 4,30 | 1,63 | 0,00 | | | | |
| Sn 10 ⁶ | 10,23 | 10,23 | 10,23 | 10,23 | 9,18 | 8,14 | 5,46 | 3,83 | 0,00 | | | |
| Sd 10 ⁶ | 10,70 | 10,70 | 10,70 | 10,70 | 9,65 | 8,60 | 5,93 | 4,30 | 0,47 | 0,00 | | |
| Sn 10 ⁸ | 12,33 | 12,33 | 12,33 | 12,33 | 11,28 | 10,23 | 7,56 | 5,93 | 2,10 | 1,63 | 0,00 | |
| Sd 10 ⁸ | 13,38 | 13,38 | 13,38 | 13,38 | 12,33 | 11,28 | 8,60 | 6,98 | 3,15 | 2,68 | 1,05 | 0,00 |

No que diz respeito ao estudo comparativo efectuado para *S. dulcamara*, nos substratos solo e água, as conclusões mantêm-se, não existindo interacção significativa entre os factores hospedeiro e concentração de inóculo (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Análise de variância sobre os factores substrato (solo e água) e concentração de inóculo (10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 , 10^0 e C-) no hospedeiro *Solanum dulcamara*.

| VARIAÇÃO | GL | SQD | QM | FS | p | Significância. |
|---------------|----|-----------|-----------|--------|---------|----------------|
| Entre grupos | 11 | 58675,228 | 5334,112 | 16,948 | 0,00000 | *** |
| A=Substrato | 1 | 663,146 | 663,146 | 2,107 | 0,15313 | NS |
| B=Conc. Inoc. | 5 | 55499,082 | 11099,816 | 35,268 | 0,00000 | *** |
| AxB | 5 | 2513,000 | 502,600 | 1,597 | 0,17900 | NS |
| Erro | 48 | 15106,786 | 314,725 | | | |

GL – graus de liberdade; SQD – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; Fs – F calculado; p – erro; F tab – F tabelado; NS – não significativo; *** - significativo para $\alpha=0,001$.

A comparação múltipla de médias segundo o teste de Tukey demonstra a existência de diferenças significativas, com um número médio de plantas com sintomas de murchidão muito superior, para níveis de infestação iguais ou superiores a 10^6 ufc.mL⁻¹ ou 10^6 ufc.g⁻¹ (67 a 100%), não dependente do substrato. Para níveis inferiores a este limiar populacional, o factor substrato parece não apresentar também uma influência significativa sobre o número médio de plantas doentes (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Presença de sintomas de murchidão em plantas de *Solanum dulcamara* (Sd) expostas a diferentes níveis de infestação do solo (s) e da água (a). Comparação múltipla do número médio de plantas com sintomas obtida pelo teste de Tukey (HSD). Presença de diferenças significativas para $q^*(0,05,60,70)=6,375$.

| | Sd s C- | Sd a C- | Sd s 10 ⁰ | Sd a 10 ⁰ | Sd s 10 ² | Sd a 10 ² | Sd s 10 ⁴ | Sd a 10 ⁴ | Sd s 10 ⁶ | Sd a 10 ⁶ | Sd s 10 ⁸ | Sd a 10 ⁸ |
|----------------------|---------|---------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Sd s C- | 0,00 | | | | | | | | | | | |
| Sd a C- | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | | | |
| Sd s 10 ⁰ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | | |
| Sd a 10 ⁰ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | |
| Sd s 10 ² | 1,78 | 1,78 | 1,78 | 1,78 | 0,00 | | | | | | | |
| Sd a 10 ² | 2,27 | 2,27 | 2,27 | 2,27 | 0,49 | 0,00 | | | | | | |
| Sd s 10 ⁴ | 3,56 | 3,56 | 3,56 | 3,56 | 1,78 | 1,29 | 0,00 | | | | | |
| Sd a 10 ⁴ | 5,43 | 5,43 | 5,43 | 5,43 | 3,65 | 3,16 | 1,87 | 0,00 | | | | |
| Sd s 10 ⁶ | 7,30 | 7,30 | 7,30 | 7,30 | 5,52 | 5,03 | 3,74 | 1,87 | 0,00 | | | |
| Sd a 10 ⁶ | 8,68 | 8,68 | 8,68 | 8,68 | 6,90 | 6,41 | 5,12 | 3,25 | 1,38 | 0,00 | | |
| Sd s 10 ⁸ | 9,08 | 9,08 | 9,08 | 9,08 | 7,30 | 6,81 | 5,52 | 3,65 | 1,78 | 0,40 | 0,00 | |
| Sd a 10 ⁸ | 11,34 | 11,34 | 11,34 | 11,34 | 9,57 | 9,08 | 7,79 | 5,92 | 4,05 | 2,67 | 2,27 | 0,00 |

Para todos os binómios hospedeiro-substrato, níveis de infestação de 10^0 ufc não deram origem à presença de doença.

S. nigrum parece assim mostrar-se ligeiramente mais resistente que *S. dulcamara* para determinado nível de infestação do solo, embora na generalidade não haja diferenças significativas na morbilidade média das plantas das duas espécies. No caso de *S. dulcamara* a natureza do substrato parece não condicionar a expressão de sintomas de doença na parte aérea das plantas.

No que diz respeito aos substratos em estudo, o solo parece favorecer a presença de sintomas para os níveis de infestação mais elevados (superiores a 10^4 ufc), produzindo uma percentagem média de plantas com murchidão superior.

5.4.1.2 | Desenvolvimento radicular

A observação das plantas revelou assimetrias no desenvolvimento do sistema radicular dos dois hospedeiros instalados nos substratos infestados, relativamente às testemunhas, e que resultaram do processo de colonização das raízes por *R. solanacearum* (Tabela 5.6).

A análise prévia de variância revelou a presença de valores de F significativos para o hospedeiro e concentração de inóculo, bem como a existência de uma interacção significativa entre estes factores e entre grupos, demonstrando a necessidade de proceder à sua análise conjunta (Tabela 5.7).

A comparação múltipla do número médio de plantas com desenvolvimento inferior da massa radicular foi significativamente superior para *S. dulcamara* para níveis de infestação entre 10^8 e 10^6 ufc quando se encontrava instalada no solo. Para níveis de infestação iguais ou inferiores a 10^6 ufc, as plantas desta espécie instaladas em água apresentavam níveis de redução da massa radicular inferiores e que não diferiam significativamente dos apresentados por plantas *S. nigrum* sujeitas aos diferentes níveis de infestação do solo.

Tabela 5.6 - Frequência relativa de plantas de *Solanum nigrum* e *Solanum dulcamara*, expostas a diferentes níveis de infestação do solo e da água, apresentando atrofia do sistema radicular, no final do ensaio.

| Nível de infestação | <i>S. dulcamara</i> água | <i>S. dulcamara</i> solo | <i>S. nigrum</i> solo |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 10^8 | 100% ^a | 87% | 40% |
| 10^6 | 27% | 60% | 53% |
| 10^4 | 7% | 27% | 7% |
| 10^2 | 7% | 7% | 0% |
| 10^0 | 0% | 0% | 0% |

^aMédia de cinco repetições por nível de infestação

Tabela 5.7 - Análise de variância sobre os factores hospedeiro (*Solanum nigrum* e *Solanum dulcamara*) e concentração de inóculo (10^8 , 10^5 , 10^4 ufc.g⁻¹ solo ou ufc.mL⁻¹ água) no desenvolvimento radicular.

| VARIAÇÃO | GL | SQD | QM | Fs | p | Significância |
|---------------|----|-----------|-----------|--------|---------|---------------|
| Entre grupos | 8 | 32470,956 | 4058,870 | 10,612 | 0,00000 | *** |
| A=hospedeiro | 2 | 3859,164 | 1929,582 | 5,045 | 0,01171 | * |
| B=Conc. Inoc. | 2 | 21345,444 | 10672,722 | 27,904 | 0,00000 | *** |
| AxB | 4 | 7266,348 | 1816,587 | 4,749 | 0,00351 | ** |
| Erro | 36 | 13769,352 | 382,482 | | | |

GL – graus de liberdade; SQD – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; Fs – F calculado; p – erro; F tab – F tabelado; NS – não significativo; * - significativo para $\alpha=0,05$; ** - significativo para $\alpha=0,01$; *** - significativo para $\alpha=0,001$.

Níveis de infestação dos diferentes substratos de 10^4 ufc não pareciam afectar de forma notória o desenvolvimento radicular das plantas, à excepção das plantas de *S. dulcamara* instaladas no solo (Tabela 5.8). Efectivamente, cerca de 27% destas plantas apresentavam ainda o desenvolvimento do sistema radicular afectado, enquanto para os restantes casos essa anomalia só se verificava em 7% das plantas. Parece assim que o sistema radicular de *S. nigrum* será menos afectado que o de *S. dulcamara*, especialmente se esta se encontrar instalada no solo (Tabela 5.6).

5.4.1.3 | Colonização dos vasos xilémicos

Na presença de necrose dos feixes vasculares das duas espécies espontâneas estudadas foi sempre possível proceder à recuperação de *R. solanacearum*, por isolamento efectuado a partir dos tecidos vegetais daquela região das plantas, e confirmar a identidade do organismo isolado utilizando os métodos de diagnóstico já referidos. Estes resultados permitiram confirmar a colonização sistémica destas espécies, consideradas então como hospedeiros verdadeiros, capazes de funcionar como reservatórios e hospedeiros alternativos para sobrevivência deste organismo, entre ciclos culturais dos hospedeiros cultivados, conforme já constatado no Capítulo 3.

No que diz respeito à colonização dos feixes vasculares, com formação de necroses internas em plantas de *S. dulcamara* instaladas na água, uma análise prévia de variância mostrou resultados de F significativos para os locais do caule, mas não para o nível de infestação do substrato, e a inexistência de interacção entre os factores analisados (Tabela 5.9). Procedeu-se a uma comparação múltipla *a posteriori* das médias de cada grupo, utilizando o teste de Tukey (HSD).

Tabela 5.8 – Presença de desenvolvimento radicular anómalo em plantas de *Solanum nigrum* (Sn) e *Solanum dulcamara* (Sd) expostas a diferentes níveis de infestação do solo (s) e da água (a) (10^8 , 10^6 , 10^4 ufc.g⁻¹ e ufc.mL⁻¹, respectivamente). Comparação múltipla do número médio de plantas com desenvolvimento anómalo obtida pelo teste de Tukey (HSD). $q^*(0,05, 36,9)=4,669$.

| | Sn s 10 ⁴ | Sd a 10 ⁴ | Sd s 10 ⁴ | Sd a 10 ⁶ | Sn s 10 ⁸ | Sn s 10 ⁶ | Sd s 10 ⁶ | Sd s 10 ⁸ | Sd a 10 ⁸ |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Sn s 10 ⁴ | 0,00 | | | | | | | | |
| Sd a 10 ⁴ | 0,00 | 0,00 | | | | | | | |
| Sd s 10 ⁴ | 2,41 | 2,41 | 0,00 | | | | | | |
| Sd a 10 ⁶ | 2,41 | 2,41 | 0,00 | 0,00 | | | | | |
| Sn s 10 ⁸ | 3,31 | 3,31 | 0,91 | 0,91 | 0,00 | | | | |
| Sn s 10 ⁶ | 4,57 | 4,57 | 2,16 | 2,16 | 1,26 | 0,00 | | | |
| Sd s 10 ⁶ | 5,37 | 5,37 | 2,96 | 2,96 | 2,06 | 0,80 | 0,00 | | |
| Sd s 10 ⁸ | 7,88 | 7,88 | 5,47 | 5,47 | 4,57 | 3,31 | 2,51 | 0,00 | |
| Sd a 10 ⁸ | 9,49 | 9,49 | 7,08 | 7,08 | 6,17 | 4,92 | 4,12 | 1,61 | 0,00 |

Tabela 5.9 - Análise de variância sobre os factores local do caule de *Solanum dulcamara* e concentração de inóculo no substrato água (10^8 , 10^6 e 10^4 ufc.mL⁻¹), na colonização dos vasos xilémicos por *Ralstonia solanacearum*.

| VARIAÇÃO | GL | SQD | QM | Fs | p | Significância |
|---------------------|----|-----------|-----------|--------|---------|---------------|
| Entre grupos | 8 | 33488,640 | 4186,080 | 5,866 | 0,00008 | *** |
| A= Zona caule | 2 | 28774,224 | 14387,112 | 20,160 | 0,00000 | *** |
| B= Nível infestação | 2 | 2305,692 | 1152,846 | 1,615 | 0,21288 | NS |
| AxB | 4 | 2408,724 | 602,181 | 0,844 | 0,50671 | NS |
| Erro | 36 | 25690,932 | 713,637 | | | |

GL – grau de liberdade; SQD – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; Fs – F calculado; p – erro; F tab – F tabelado; NS – não significativo; *** - significativo para $\alpha=0,001$.

Nas condições de ensaio, *S. dulcamara* mostrou-se particularmente susceptível desenvolvendo sintomas internos de doença com necrose dos feixes vasculares, resultante da colonização por *R. solanacearum*, atingindo um nível de incidência de 100% para elevadas concentrações deste organismo na água (10^8 ufc.mL⁻¹). Verificou-se também que para este substrato, o número de plantas apresentando sintomas internos de doença é significativamente diferente junto à raiz e até 5 cm de altura, onde se mostrou muito elevado desde que a concentração da população bacteriana na água não fosse inferior a 10^6 ufc.mL⁻¹. Este número mostrou-se ainda significativamente superior para níveis de infestação até 10^4 ufc.mL⁻¹ imediatamente acima da raiz (0 cm). Inversamente, o número de plantas apresentando sintomas foi significativamente inferior para menores densidades populacionais e/ou para distâncias da raiz superiores a 5 cm. Efectivamente, mostrou-se indiferente a observação visual destes sintomas em plantas expostas a níveis menos elevados de infestação, os quais são pouco perceptíveis aos 15 cm (Tabela 5.10). Revelou-se assim, particularmente adequado proceder ao isolamento de *R. solanacearum* em plantas de *S. dulcamara*, com as raízes imersas em água, imediatamente acima da região radicular.

Tabela 5.10 – Presença de necrose dos feixes vasculares em plantas de *Solanum dulcamara* expostas a diferentes níveis de infestação de água (10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 , 10^0 ufc.mL⁻¹). Comparação múltipla do número médio de plantas com sintomas aos 0, 5 e 15 cm contados a partir da raiz obtida pelo teste de Tukey (HSD). $q^*_{(0,05, 40,15)}=5,106$.

| | 10 ⁰ 15 | 10 ⁰ 5 | 10 ² 15 | 10 ⁴ 15 | 10 ⁸ 15 | 10 ² 5 | 10 ⁰ 0 | 10 ⁶ 15 | 10 ² 0 | 10 ⁴ 5 | 10 ⁴ 0 | 10 ⁶ 5 | 10 ⁸ 5 | 10 ⁶ 0 | 10 ⁸ 0 |
|--------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 10 ⁰ 15 | 0,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 ⁰ 5 | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | | | | | | |
| 10 ² 15 | 0,72 | 0,72 | 0,00 | | | | | | | | | | | | |
| 10 ⁴ 15 | 0,72 | 0,72 | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | | | | |
| 10 ⁸ 15 | 1,43 | 1,43 | 0,72 | 0,72 | 0,00 | | | | | | | | | | |
| 10 ² 5 | 1,83 | 1,83 | 1,11 | 1,11 | 0,40 | 0,00 | | | | | | | | | |
| 10 ⁰ 0 | 2,55 | 2,55 | 1,83 | 1,83 | 1,11 | 0,72 | 0,00 | | | | | | | | |
| 10 ⁶ 15 | 2,87 | 2,87 | 2,15 | 2,15 | 1,43 | 1,04 | 0,32 | 0,00 | | | | | | | |
| 10 ² 0 | 3,98 | 3,98 | 3,26 | 3,26 | 2,55 | 2,15 | 1,43 | 1,11 | 0,00 | | | | | | |
| 10 ⁴ 5 | 4,77 | 4,77 | 4,06 | 4,06 | 3,34 | 2,94 | 2,23 | 1,91 | 0,79 | 0,00 | | | | | |
| 10 ⁴ 0 | 7,00 | 7,00 | 6,28 | 6,28 | 5,56 | 5,17 | 4,45 | 4,13 | 3,02 | 2,23 | 0,00 | | | | |
| 10 ⁶ 5 | 7,18 | 7,18 | 6,46 | 6,46 | 5,74 | 5,35 | 4,63 | 4,31 | 3,19 | 2,40 | 0,18 | 0,00 | | | |
| 10 ⁸ 5 | 7,72 | 7,72 | 7,00 | 7,00 | 6,28 | 5,89 | 5,17 | 4,85 | 3,73 | 2,94 | 0,72 | 0,54 | 0,00 | | |
| 10 ⁶ 0 | 8,43 | 8,43 | 7,72 | 7,72 | 7,00 | 6,60 | 5,89 | 5,57 | 4,45 | 3,66 | 1,43 | 1,26 | 0,72 | 0,00 | |
| 10 ⁸ 0 | 9,15 | 9,15 | 8,43 | 8,43 | 7,72 | 7,32 | 6,60 | 6,28 | 5,17 | 4,38 | 2,15 | 1,97 | 1,43 | 0,72 | 0,00 |

Quando as plantas se encontravam no solo, a incidência da doença para elevados níveis populacionais de *R. solanacearum*, mostrava-se inferior, com cerca de 73,7% das plantas evidenciando necrose dos feixes vasculares junto à raiz. As plantas expostas ao nível mais elevado de infestação apresentam valores médios destes sintomas significativamente superiores às restantes plantas até uma distância de 5 cm da raiz (Tabela 5.11). Não se verificaram diferenças significativas na expressão dos sintomas para distâncias iguais ou superiores, quando os níveis de infestação do solo eram inferiores a 10^6 ufc.g⁻¹, ou seja, para níveis populacionais 100 vezes superiores aos observados para o substrato água. Existem assim factores associados a este substrato, que condicionam a interacção deste organismo fitopatogénico com o hospedeiro, afectando o processo infeccioso, os quais poderão possuir uma origem ambiental ou biótica. Tanto as características físico-químicas, como a flora autóctone deste solo não foram objecto de estudo deste trabalho, pelo que não se poderão retirar conclusões acerca da sua natureza. Mostra-se assim o interesse em proceder ao isolamento do patogéneo imediatamente acima da região radicular, sendo a fidedignidade do diagnóstico francamente condicionada pelo local de amostragem das plantas.

A análise de variância para determinação do efeito do binómio hospedeiro-substrato para *S. nigrum* e *S. dulcamara* expostos a diferentes níveis de infestação do solo, e, solo e água, respectivamente, no que diz respeito à presença de sintomas internos ao nível da raiz, permitiu verificar que, apesar de *S. dulcamara* apresentar, nestas condições, maiores níveis de morbilidade, não existem, contudo, diferenças significativas ($\chi^2=3,150$; $p=0,2070$) entre os vários binómios para o nível de infestação mais elevado.

Tabela 5.11 – Presença de necrose dos feixes vasculares em plantas de *Solanum dulcamara* expostas a diferentes níveis de infestação do solo (10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 , 10^0 ufc.g⁻¹). Comparação múltipla do número médio de plantas com sintomas aos 0, 5 e 15 cm contados a partir da raiz obtida pelo teste de Tukey (HSD). $q^*(_{0,05, 40,15})=5,106$.

| | 10^0 15 | 10^2 15 | 10^4 15 | 10^6 15 | 10^0 5 | 10^8 15 | 10^2 5 | 10^4 5 | 10^6 5 | 10^0 0 | 10^2 0 | 10^4 0 | 10^6 0 | 10^8 5 | 10^8 0 |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 10^0 15 | 0,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| 10^2 15 | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | | | | | | |
| 10^4 15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | | | | | |
| 10^6 15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | | | | |
| 10^0 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | | | |
| 10^8 15 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,00 | | | | | | | | | |
| 10^2 5 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | |
| 10^4 5 | 2,04 | 2,04 | 2,04 | 2,04 | 2,04 | 1,46 | 1,46 | 0,00 | | | | | | | |
| 10^6 5 | 3,81 | 3,81 | 3,81 | 3,81 | 3,81 | 3,24 | 3,24 | 1,78 | 0,00 | | | | | | |
| 10^0 0 | 4,39 | 4,39 | 4,39 | 4,39 | 4,39 | 3,81 | 3,81 | 2,35 | 0,57 | 0,00 | | | | | |
| 10^2 0 | 4,70 | 4,70 | 4,70 | 4,70 | 4,70 | 4,13 | 4,13 | 2,67 | 0,89 | 0,32 | 0,00 | | | | |
| 10^4 0 | 4,96 | 4,96 | 4,96 | 4,96 | 4,96 | 4,39 | 4,39 | 2,92 | 1,15 | 0,57 | 0,26 | 0,00 | | | |
| 10^6 0 | 5,28 | 5,28 | 5,28 | 5,28 | 5,28 | 4,70 | 4,70 | 3,24 | 1,46 | 0,89 | 0,57 | 0,32 | 0,00 | | |
| 10^8 5 | 5,28 | 5,28 | 5,28 | 5,28 | 5,28 | 4,70 | 4,70 | 3,24 | 1,46 | 0,89 | 0,57 | 0,32 | 0,00 | 0,00 | |
| 10^8 0 | 5,85 | 5,85 | 5,85 | 5,85 | 5,85 | 5,28 | 5,28 | 3,81 | 2,04 | 1,46 | 1,15 | 0,89 | 0,57 | 0,57 | 0,00 |

Tabela 5.12 –Análise de variância sobre os factores binómio hospedeiro-substrato e concentração de inóculo (10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 , 10^0 ufc), na colonização dos vasos xilémicos por *Ralstonia solanacearum*.

| VARIAÇÃO | GL | SQD | QM | Fs | p | Significância |
|------------------|----|-----------|----------|-------|---------|---------------|
| Entre grupos | 14 | 45365,445 | 3240,389 | 4,436 | 0,00010 | *** |
| A=hosp-subs | 2 | 6131,294 | 3065,647 | 4,197 | 0,02215 | * |
| B= Conc. Inóculo | 4 | 27166,605 | 6791,651 | 9,298 | 0,00002 | *** |
| AxB | 8 | 12067,546 | 1508,443 | 2,065 | 0,06282 | NS |
| Erro | 40 | 29218,710 | 730,468 | | | |

GL – graus de liberdade; SQD – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; Fs – F calculado; p – erro; F tab – F tabelado; NS – não significativo; * - significativo para $\alpha=0,05$; *** - significativo para $\alpha=0,001$.

A comparação múltipla do valor médio de feixes afectados para cada espécie e substrato, realizada com recurso ao teste de Tukey, demonstra a existência de diferenças significativas para concentrações de inóculo iguais ou inferiores a 10^4 ufc.g⁻¹ de solo (Tabela 5.13).

S. nigrum apresenta um número médio de plantas com necrose dos feixes vasculares ao nível da raiz que se mostra significativamente superior para níveis de infestação do solo compreendidos entre 10^8 e 10^6 ufc.g⁻¹ (87%). Em solo menos infestado, esse número reduz-se para zero (10^0 ufc.g⁻¹) a 40% (10^4 ufc.g⁻¹).

O estudo comparativo das várias modalidades do binómio hospedeiro-substrato demonstrou que *S. dulcamara*-água permitia uma colonização interna dos feixes vasculares, por *R. solanacearum*, significativamente superior aos outros binómios até níveis de infestação da ordem dos 10^4 ufc.mL⁻¹. No caso de *S. dulcamara* no solo poderão surgir algumas dúvidas, uma vez que níveis de infestação de 10^4 ufc.g⁻¹ parecem originar mais sintomas

relativamente ao solo 100 vezes mais infestado. No caso de *S. nigrum*, a expressão de sintomas internos ocorre de forma significativamente mais intensa para níveis de infestação de 10^6 ufc.g⁻¹. Novamente a natureza do substrato parece condicionar também a manifestação deste tipo de sintomas para as diferentes espécies espontâneas.

Tabela 5.13 – Presença de necrose dos feixes vasculares junto à raiz de plantas de *Solanum nigrum* (Sn) e *Solanum dulcamara* (Sd) expostas a diferentes níveis de infestação do solo (s) e água (a). Comparação múltipla obtida pelo teste de Tukey (HSD). Presença de diferenças significativas para $q^*(0,05, 40,15)=5,106$.

| | Sn 10 ⁰ | Sn 10 ² | Sd a 10 ⁰ | Sn 10 ⁴ | Sd a 10 ² | Sd s 10 ⁶ | Sd s 10 ⁰ | Sd s 10 ² | Sd s 10 ⁴ | Sd a 10 ⁴ | Sd s 10 ⁸ | Sn 10 ⁶ | Sn 10 ⁸ | Sd a 10 ⁶ | Sd a 10 ⁸ |
|----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| Sn 10 ⁰ | 0,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| Sn 10 ² | 1,75 | 0,00 | | | | | | | | | | | | | |
| Sd a 10 ⁰ | 2,07 | 0,32 | 0,00 | | | | | | | | | | | | |
| Sn 10 ⁴ | 3,24 | 1,49 | 1,17 | 0,00 | | | | | | | | | | | |
| Sd a 10 ² | 3,24 | 1,49 | 1,17 | 0,00 | 0,00 | | | | | | | | | | |
| Sd s 10 ⁶ | 4,47 | 2,72 | 2,39 | 1,23 | 1,23 | 0,00 | | | | | | | | | |
| Sd s 10 ⁰ | 4,79 | 3,04 | 2,72 | 1,55 | 1,55 | 0,32 | 0,00 | | | | | | | | |
| Sd s 10 ² | 5,05 | 3,30 | 2,98 | 1,81 | 1,81 | 0,58 | 0,26 | 0,00 | | | | | | | |
| Sd s 10 ⁴ | 5,37 | 3,62 | 3,30 | 2,13 | 2,13 | 0,91 | 0,58 | 0,32 | 0,00 | | | | | | |
| Sd a 10 ⁴ | 5,70 | 3,94 | 3,62 | 2,46 | 2,46 | 1,23 | 0,91 | 0,64 | 0,32 | 0,00 | | | | | |
| Sd s 10 ⁸ | 5,96 | 4,21 | 3,88 | 2,72 | 2,72 | 1,49 | 1,17 | 0,91 | 0,58 | 0,26 | 0,00 | | | | |
| Sn 10 ⁶ | 6,28 | 4,53 | 4,21 | 3,04 | 3,04 | 1,81 | 1,49 | 1,23 | 0,91 | 0,58 | 0,32 | 0,00 | | | |
| Sn 10 ⁸ | 6,28 | 4,53 | 4,21 | 3,04 | 3,04 | 1,81 | 1,49 | 1,23 | 0,91 | 0,58 | 0,32 | 0,00 | 0,00 | | |
| Sd a 10 ⁶ | 6,86 | 5,11 | 4,79 | 3,62 | 3,62 | 2,39 | 2,07 | 1,81 | 1,49 | 1,17 | 0,91 | 0,58 | 0,58 | 0,00 | |
| Sd a 10 ⁸ | 7,45 | 5,70 | 5,37 | 4,21 | 4,21 | 2,98 | 2,66 | 2,39 | 2,07 | 1,75 | 1,49 | 1,17 | 1,17 | 0,58 | 0,00 |

A frequência relativa dos vários tipos de sintomas de doença contabilizados nos diferentes hospedeiros para o conjunto dos vários níveis de infestação é apresentada resumidamente na Tabela 5. 14. Tendo em conta que, à excepção de um único caso, foi sempre possível isolar *R. solanacearum* a partir dos órgãos evidenciando sintomas de doença, poder-se-á facilmente constatar que a região dos feixes vasculares imediatamente acima da raiz, será o local da planta que informará mais fidedignamente acerca da presença, e da colonização sistémica desta espécie de hospedeiros alternativos. Enquanto no caso de *S. nigrum* não existem diferenças entre a frequência em que ocorre colonização vascular e sintomas de murchidão, em *S. dulcamara* parece existir uma assimetria, reflectindo a presença de necroses uma maior correlação com a presença de doença. Por outro lado, a atrofia do sistema radicular parece não ser um indicador fiável relativamente à colonização por *R. solanacearum* apresentando frequências relativas inferiores à existência real de doença. Efectivamente, muitas espécies de plantas espontâneas são portadoras assintomáticas de doença mostrando sintomas externos pouco evidentes. São assim muitas vezes considerados como mais resistentes ou tolerantes a *R. solanacearum* que muitas espécies solanáceas cultivadas.

Tabela 5.14 – Frequência relativa do número total de plantas evidenciando diferentes tipos de sintomas de doença causada por *Ralstonia solanacearum*, biovar 2/raça 3, para os vários binômios hospedeiro-substrato (%).

| Sintomas | <i>Solanum nigrum</i> | <i>Solanum dulcamara</i> | <i>Solanum dulcamara</i> |
|---------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| | solo | solo | água |
| Murchidão foliar | 46,00 | 39,00 | 40,00 |
| Redução sistema radicular | 20,00 | 36,68 | 29,36 |
| Necrose feixes vasculares | 46,80 | 69,00 | 68,00 |

5.4.2 | Sobrevivência e dinâmica das populações de *Ralstonia solanacearum*

5.4.2.1 | Efeito do hospedeiro sobre as populações do solo

As amostras de solo colhidas da rizosfera das plantas hospedeiras e das testemunhas (ausência de hospedeiro), com diferentes níveis de infestação, aos 7, 21 e 35 dias de ensaio, permitiram avaliar o efeito promotor ou depressivo do hospedeiro na dinâmica das populações de *R. solanacearum*.

A relação entre as concentrações de inóculo utilizadas na infestação das amostras de solo e as concentrações de células bacterianas recuperadas inicialmente do solo, parecem reflectir uma perda de viabilidade de cerca de 100 vezes (Figura 5.1). Estes resultados poderão indicar também uma passagem das células de *R. solanacearum* ao estado VBNC, não detectado pelos métodos de diagnóstico utilizados.

Na ausência de hospedeiro, é claro o efeito depressivo que o solo possui sobre as populações de *R. solanacearum*, o qual pareceu agravar-se sobretudo após a primeira semana de ensaio e até aos 21 dias, para os níveis de infestação superiores. Entre a terceira e a quinta semana de ensaio, parece ter ocorrido alguma recuperação da população deste organismo para níveis de infestação mais baixos.

A quantificação de *R. solanacearum* do solo com *S. dulcamara* após uma semana de ensaio permitiu a recuperação de 1000 vezes menos células bacterianas por grama de solo, relativamente ao nível de infestação inicial (Figura 5.2). Entre a primeira e a terceira semana do ensaio, *R. solanacearum* parece ter mantido um nível populacional reduzido nessa ordem de grandeza independentemente do nível de infestação do solo. As alterações da população bacteriana do solo parecem, neste caso, ter ocorrido especialmente a partir da terceira semana, com um aumento progressivo das densidades populacionais para níveis de infestação inicial superiores a 10^5 ufc.g⁻¹. Para o nível mais elevado de infestação, *R. solanacearum* parece conseguir colonizar com algum sucesso a rizosfera de *S. dulcamara*, atingindo densidades populacionais próximas das iniciais. Abaixo deste limiar o seu comportamento parece ter sido inverso.

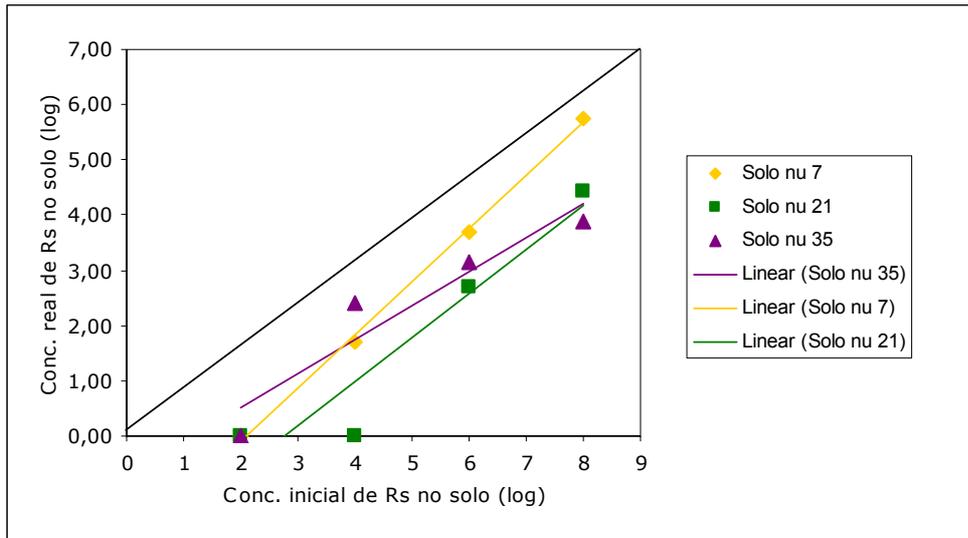


Figura 5.1 – Sobrevivência de *Ralstonia solanacearum* em solo artificialmente infestado com diferentes concentrações do patógeno, na ausência de plantas hospedeiras 7, 21 e 35 dias após inoculação.

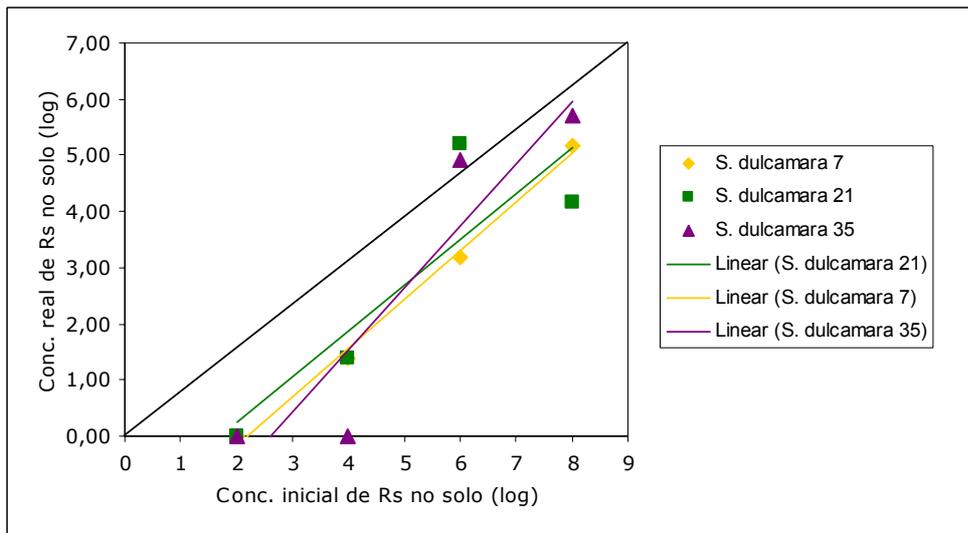


Figura 5.2 – Sobrevivência de *Ralstonia solanacearum* em solo artificialmente infestado com diferentes concentrações do patógeno, na presença de *Solanum dulcamara*, 7, 21 e 35 dias após inoculação.

A presença de *S. nigrum* no solo, contrariamente ao observado no solo sem hospedeiros, ou na presença de *S. dulcamara* parece promover a sobrevivência de *R. solanacearum* (Figura 5.3). Na realidade, passado um período inicial, em que ocorre, à semelhança dos outros casos, um decréscimo da população, talvez decorrente da adaptação das células bacterianas ao novo ambiente mais "stressante" criado pelo solo, *R. solanacearum* desenvolve a capacidade de colonização da rizosfera, especialmente para baixos níveis de infestação do solo. Este aumento da densidade populacional é particularmente notório para uma densidade populacional inicial de 10^2 ufc.g⁻¹, atingindo uma ordem de grandeza 100 vezes superior aos 21 dias. Para níveis de infestação superiores a 10^4 ufc.g⁻¹ essa diferença torna-se menos

evidente, sendo praticamente nula para o nível mais elevado (10^8 ufc.g⁻¹). Entre a terceira e a quinta semana parece alcançar-se um equilíbrio atingindo a população densidades populacionais próximas dos níveis de infestação iniciais.

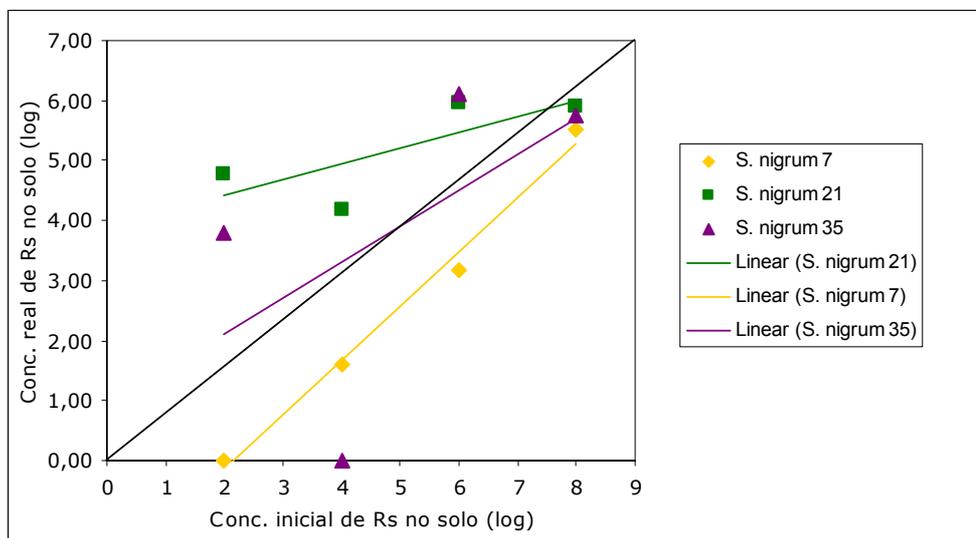


Figura 5.3 – Sobrevivência de *Ralstonia solanacearum* em solo artificialmente infestado com diferentes concentrações do patógeno, na presença de *Solanum nigrum* 7, 21 e 35 dias após inoculação.

Os resultados observados para a dinâmica populacional de *R. solanacearum* parecem ser condicionados de forma diferenciada com o decorrer do tempo. Efectivamente, no final da primeira semana de ensaio, as variações observadas são significativamente atribuíveis ao nível de infestação do solo e não ao hospedeiro (Tabela 5.15).

Tabela 5.15 – Análise de variância para determinação da influência dos factores hospedeiro e concentração de inóculo no solo (10^8 a 10^2 ufc.mL⁻¹) 7 dias após o estabelecimento do ensaio na manutenção de populações de *Ralstonia solanacearum*.

| VARIAÇÃO | GL | SQD | QM | Fs | p | Significância |
|---------------|----|--------|--------|---------|----------|---------------|
| A=Hospedeiro | 2 | 0,241 | 0,120 | 5,112 | 0,050585 | NS |
| B=Conc. Inoc. | 3 | 50,118 | 16,706 | 709,532 | 0,000000 | *** |
| Residual | 6 | 0,141 | 0,024 | | | |

GL – graus de liberdade; SQD – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; Fs – F calculado; p – erro; F tab – F tabelado; NS – não significativo; *** - significativo para $\alpha=0,001$.

Após este período inicial de adaptação da população bacteriana aos novos ambientes, condicionados ou não pela presença de espécies hospedeiras, o factor hospedeiro passa a ter um efeito significativo sobre as populações de *R. solanacearum* (Tabela 5.16), observando-se as divergências presentes aos 21 dias nas Figuras 5.1 a 5.3.

Tabela 5.16 – Análise de variância para determinação da influência dos factores hospedeiro e concentração de inóculo no solo (10^8 a 10^2 ufc.mL⁻¹) 21 dias após o estabelecimento do ensaio na manutenção de populações de *Ralstonia solanacearum*.

| VARIAÇÃO | GL | SQD | QM | Fs | p | Significância |
|----------------|----|--------|--------|-------|------------|---------------|
| A= Hospedeiro | 2 | 25,085 | 12,543 | 5,254 | 0,04800859 | * |
| B= Conc. Inoc. | 3 | 19,703 | 6,568 | 2,751 | 0,13473772 | NS |
| Residual | 6 | 14,323 | 2,387 | | | |

GL – graus de liberdade; SQD – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; Fs – F calculado; p – erro; F tab – F tabelado; NS – não significativo; * - significativo para $\alpha=0,05$; *** - significativo para $\alpha=0,001$.

Entre os 21 e os 35 dias as populações bacterianas parecem ter atingido um novo equilíbrio onde o factor hospedeiro e nível de infestação deixam de possuir uma influência significativa sobre a sua sobrevivência nas condições de ensaio (Tabela 5.17).

Tabela 5.17 – Análise de variância para determinação da influência dos factores hospedeiro e concentração de inóculo no solo (10^8 a 10^2 ufc.mL⁻¹) 35 dias após o estabelecimento do ensaio na manutenção de populações de *Ralstonia solanacearum*.

| VARIAÇÃO | GL | SQD | QM | Fs | p | Significância |
|---------------|----|--------|-------|-------|------------|---------------|
| A=Hospedeiro | 2 | 18,798 | 9,399 | 3,872 | 0,08321547 | NS |
| B=Conc. Inoc. | 3 | 25,505 | 8,502 | 3,502 | 0,08950972 | NS |
| Residual | 6 | 14,566 | 2,428 | | | |

GL – graus de liberdade; SQD – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; Fs – F calculado; p – erro; F tab – F tabelado; NS – não significativo.

5.4.2.2 | Efeito de *Solanum dulcamara* sobre a população de *Ralstonia solanacearum* na água

No que respeita à sobrevivência de *R. solanacearum* no substrato água e na presença da espécie espontânea *S. dulcamara*, a avaliação dos níveis da população bacteriana relativamente aos níveis de infestação inicial, para temperaturas semelhantes à que se encontra exposta em Portugal, no período Primavera-Verão, revela que para níveis de infestação mais baixos o hospedeiro contribui favoravelmente para a manutenção e promove até o crescimento populacional. Resultados inversos observam-se para níveis de infestação elevados onde parece ocorrer um decréscimo progressivo da concentração de *R. solanacearum* que poderá variar entre 100 e 1000 vezes (Figura 5.4). Este comportamento levará ao estabelecimento de um nível populacional de equilíbrio na área de influência da rizosfera de *S. dulcamara*.

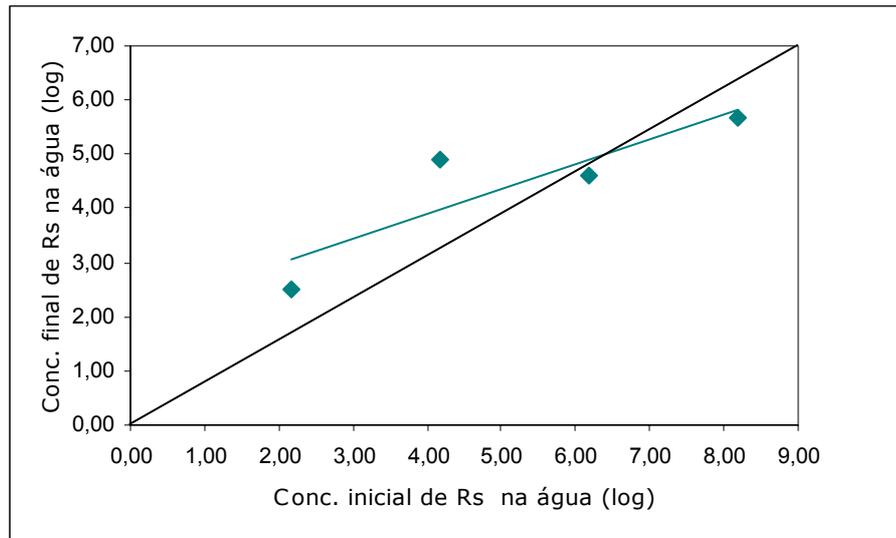


Figura 5.4 – Sobrevivência de *Ralstonia solanacearum* em água infestada com diferentes concentrações do patógeno, na presença de *Solanum dulcamara*. Relação entre a população inicial e a população real após 35 dias de ensaio.

5.5 | Discussão e Conclusões

O contributo de *S. dulcamara* na sobrevivência e dispersão de *R. solanacearum* tem vindo a ser avaliado em alguns países da Europa Ocidental, nomeadamente na Holanda e Reino Unido. Existem também algumas referências a *S. nigrum* como hospedeiro alternativo preferencial nos países da Europa mediterrânica, embora o seu papel como hospedeiro alternativo não tenha, até agora, sido alvo de estudos mais aprofundados.

Os resultados obtidos no Capítulo 3 sobre a incidência de *R. solanacearum* em plantas de *S. nigrum* apontam para a sua prevalência nesta espécie espontânea relativamente a outras, algumas pertencentes à família *Solanaceae*, geralmente consideradas capazes de favorecer a sobrevivência deste organismo como *D. stramonium*.

Miranda *et al.* (2004) procederam ao estudo da colonização de diferentes espécies de plantas espontâneas por isolados dos biovars 1, 2 e 3 de *R. solanacearum* tendo verificado que as estirpes dos diferentes biovars colonizavam de forma significativamente diferente as raízes das diferentes espécies vegetais. Os níveis de colonização mais elevados foram obtidos por estirpes dos biovars 1 e 3, inversamente ao verificado para estirpes do biovar 2. A identificação muito recente de focos de doença do pus ou mal murcho causados por estirpes do biovar 1 (Cruz *et al.*, 2007) não permitiu que fossem integradas neste estudo, a fim de se verificar a sua capacidade de infectar e colonizar estas espécies espontâneas, tão comuns no nosso país. Encontram-se actualmente a decorrer inoculações experimentais noutras

espécies vegetais, dado o largo espectro de potenciais hospedeiros que estas estirpes parecem possuir.

O estudo comparativo das duas espécies hospedeiras, *S. dulcamara* e *S. nigrum*, revela que possuem um potencial muito semelhante como suporte à manutenção e dispersão de *R. solanacearum*. Assim, a expressão dos sintomas evidenciados pela parte aérea das duas espécies dependerá essencialmente da densidade da população bacteriana presente, podendo *S. dulcamara* mostrar-se mais susceptível para baixos níveis de infestação no solo relativamente a *S. nigrum*. Por outro lado, o substrato em que as plantas de *S. dulcamara* se encontram parece também não influenciar a presença de flacidez ou murchidão foliar.

O sistema radicular parece não constituir um bom indicador relativamente à presença de doença, embora *R. solanacearum* colonize a rizosfera de ambas as espécies hospedeiras, sendo a atrofia da sistema radicular um dos aspectos menos frequentes nas plantas doentes de ambas as espécies. O sistema radicular de *S. dulcamara* parece ser, no entanto, significativamente mais afectado que o de *S. nigrum*, especialmente na presença de elevadas densidades populacionais deste organismo na água.

O sistema vascular de ambas as espécies parece ser o que mais fidedignamente reflecte a presença de doença e de verdadeira infecção sistémica, permitindo classificar as duas espécies como verdadeiros hospedeiros de *R. solanacearum*. Neste caso a colonização é particularmente evidente imediatamente acima da raiz, para as duas espécies, e independentemente do nível de infestação. Neste local torna-se particularmente visível a necrose dos feixes vasculares, resultante da obstrução dos feixes vasculares por gomas e tiloses, o qual se revelou também o local preferencial para proceder ao isolamento de *R. solanacearum*.

Nas condições de ensaio, os dois hospedeiros comportaram-se assim de forma muito idêntica, na presença de elevadas concentrações de inóculo. Estes resultados mostram que o contributo de *S. dulcamara*, na manutenção deste organismo, poderá ser superior ao evidenciado em condições naturais (Capítulo 3). Tem-se verificado contudo a frequente associação entre a presença de plantas de *S. dulcamara* infectadas e grande parte dos aproveitamentos hidro-agrícolas com águas superficiais contaminadas.

A ausência de hospedeiro não será condutiva à manutenção de *R. solanacearum* no solo, originando, nas condições de ensaio, uma quebra da densidade populacional que poderá atingir, após um mês, 10^4 ufc.g⁻¹. O efeito do hospedeiro revela-se neste caso muito distinto para as duas espécies em causa, mostrando-se *S. nigrum* claramente favorável à manutenção e proliferação desta população bacteriana na sua rizosfera. A sua manutenção em campos, mesmo que associada a rotações em períodos de quarentena, torna-se por isso grave. Acresce-se ainda o facto desta infestante, na presença de condições favoráveis, poder atingir uma maior longevidade, tornando-se bienal, e de ser uma espécie espontânea muito abundante na flora autóctone, e particularmente frequente em campos de produção de culturas solanáceas. Os níveis populacionais de *R. solanacearum* mantidos por esta espécie hospedeira não devem assim ser negligenciados aquando da implantação de culturas

solanáceas, parecendo ser suficientes para desencadear níveis de infecção importantes, ao contrário do referido por Van Vaerenberg *et al.* (2006).

A presença de *S. dulcamara* associada à água parece promover também a manutenção e crescimento da população de *R. solanacearum*, sobretudo para os níveis de infestação mais baixos, parecendo estar dependente da densidade populacional, ou seja do nível de confinamento da população, na presença de temperaturas óptimas à sua manutenção.

Constata-se assim a presença de infecção sistémica em ambas as espécies, bem como a colonização epifítica da sua rizosfera. As variações relativamente aos limiares populacionais para os quais estas espécies espontâneas possuem a capacidade de manter *R. solanacearum* são mais ou menos evidentes e poderão depender do substrato em que se encontram. Elphinstone *et al.* (1998) verificaram também que enquanto populações de *R. solanacearum* na ordem dos 10^5 ufc por planta eram suficientes para infectar plantas de *S. tuberosum* em condições experimentais, já no caso de *S. dulcamara* os níveis populacionais teriam de ser 10 vezes superiores (10^6 ufc). No entanto, verificou-se que *S. dulcamara* possui a capacidade de funcionar como hospedeiro alternativo de *R. solanacearum* mesmo quando não possui as raízes imersas na água.

Elphinstone *et al.* (2006) referem que nos países da Europa Ocidental foi possível erradicar *R. solanacearum* dos sistemas de produção agrícolas, mas que essa erradicação será particularmente difícil ao nível dos ecossistemas. A possibilidade, agora bem evidente, de manutenção de *R. solanacearum* não só em *S. dulcamara* mas também em *S. nigrum*, presente nos campos agrícolas, revela dificuldades acrescidas ao controlo e erradicação deste organismo em Portugal. Parece assim existir uma necessidade urgente de aplicar medidas semelhantes às já implementadas noutros países da Europa, com a destruição de plantas de *S. dulcamara* previamente sinalizadas, bem como proceder à destruição de infestantes, incluindo *S. nigrum*, de campos infestados, e ainda, aplicar medidas restritivas, impedindo a utilização de águas superficiais contaminadas na rega de culturas solanáceas e não solanáceas. A utilização de material de propagação vegetativa isento não será nunca suficiente, como estratégia isolada no controlo e erradicação de *R. solanacearum* à semelhança do que já foi constatado por outros autores (Pradhanang & Momol, 2001).

5.6 | Referências Bibliográficas

- Alvarez B, Biosca EG & López MM. 2006. River water biota affecting *Ralstonia solanacearum* survival: characterization of specific bacteriophages and its potential use for biocontrol in irrigation water. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Botelho da Costa, J. (1995) *Caracterização e constituição do solo*. 5ªed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 527 pp.
- Costa SB, Fonseca MEN, Lopes CA, Ferreira MASV & Boiteux LS. 2006. Genetic and phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* isolates from the Brazilian Amazon Region. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Cruz L, Sousa Santos M, Costa A & Carrinho H. 2001. Present status of *Ralstonia solanacearum* in Portugal. In: *Congress Proceedings 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*. Academic Publishing, Andalus, p. 252-254.
- Cruz L, Quirino F, Eloy M & Carrinho H. 2007. *Ralstonia solanacearum* Biovar 1 Associated With a New Outbreak Of Bacterial Wilt Disease In Portugal. In: *5º Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia. Livro de Resumos, 2*. Coimbra, Portugal.
- Dittapongtich V & Surat S. 2003. Detection of *Ralstonia solanacearum* in soil and weeds from commercial tomato fields using immunocapture and polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*. **151**:239-246.
- Dongfang Z, Yujun T & Zeyong X. 1994. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in Peanut Seeds. *Bacterial Wilt Newsletter*. **10**:8-9.
- Elbaz M, Kodja H & Luisetti J. 2005. Plant Host is Inducing Diversity within *Ralstonia solanacearum* strains. *Acta Horticulturae*. **695**:137-144.
- Elphinstone JG, Parkinson NM, Tomlinson DL, Bew J & Stanford H. 2006. Ecology and management of the *Ralstonia solanacearum* phylotype II, sequevar 1 strain, pandemic on potato. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Elphinstone JG, Stanford HM & Stead DE. 1998. Survival and transmission of *Ralstonia solanacearum* in aquatic plants of *Solanum dulcamara* and associated surface water in England. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **28**:93-94.
- Gillings MR & Fahy P. 1994. Genomic fingerprinting towards a Unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In: Hayward AC and Hartman GL (eds) *Bacterial wilt: The Disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford. p. 95-112.
- Granada GA & Sequeira L. 1983 Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere and plant roots. *Canadian Journal of Microbiology* **29**:433-440.
- Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **29**:65-87.
- Hayward AC. 1994a. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. A.C. Hayward & G.L. Hartman (Eds.). CAB International, Wallingford, p. 9-24.
- Hayward AC. 1994b. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum*. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. A.C. Hayward & G.L. Hartman (Eds.). CAB International, Wallingford, p. 123-135.
- Hong J, Ji P, Momol MT, Olson SM & Jones JB. 2006. Association of *Ralstonia solanacearum* in irrigation ponds and on semi-aquatic weeds in North Florida. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Huang Q. 2006. Identification of ornamental plant species susceptible to *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Janse JD & Schans J. 1998. Experiences with the diagnosis and epidemiology of bacterial brown rot (*Ralstonia solanacearum*) in the Netherlands. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **28**:65-67.
- Janse JD, Goossens E, A. van Beuningen E, Gaisch K & Tjou Tam Sin NNA. 2006. *Begonia elatior*, a new host for *Ralstonia solanacearum* race 1, biovar 1 In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.

- Janse JD, van den Beld, Elphinstone J, Simpkins S, Tijou-Tam-Sin LNA & van Varenbergh J. 2005. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* Biovar2, Race 3 in *Pelargonium zonale* Cuttings from Kenya. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 510 pp..
- Ji P, Allen C, Sanchez-Perez A, Yao J, Elphinstone JG, Jones JB & Momol MT. 2006. Novel diversity and diagnostic challenges associated with *Ralstonia solanacearum* strains in Florida. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Kelman A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. A literature review and bibliography. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin* **99**:1-194.
- Lopes C, Poltronieri LS & Poltronieri MC. 2002. New Hosts of *Ralstonia solanacearum* in the Brazilian Amazon. *Bacterial Wilt Newsletter*. **17**:2-3.
- Lopes C, Poltronieri LS, Albuquerque FC & Trindade DR. 1998. *Piper hispidinervium*, a New Host of Bacterial Wilt. *Bacterial Wilt Newsletter*. **15**:4.
- Manso. PJA. 2004. *Ralstonia solanacearum*: infestantes como potenciais agentes de reposição de inóculo. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronômica. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 131 pp.
- Martins OM, Nabizadeh-Ardekani F & Rudolph K. 2005. Seed from infected Tomato Plants Appear to be Free from Contamination by *Ralstonia solanacearum* When tested by PCR or Microbiological Assays. In: Allen C, Prior P & Hayward AC (eds). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 510 pp..
- Miranda EFO, Takatsu A & Uesugi CH. 2004. Colonização de Raízes de Plantas Daninhas Cultivadas *in vitro* e em Vasos por *Ralstonia solanacearum*, Biovars 1, 2 e 3. *Fitopatologia Brasileira*. **29**:121-127.
- Norman DJ, Yuen JMF & Mangravita-Novo A. 2006. Susceptibility of Geranium Cultivars to Bacterial Wilt. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Pradhanang PM, Momol MT. 2001. Survival of *Ralstonia solanacearum* in soil under irrigated rice culture and aquatic weeds. *Journal of Phytopathology* **149**:707-711.
- Quezado-Soares MA & Lopes CA. 1994. Bacterial wilt of two weed species of the family Labiatae, incited by *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsletter*. **11**:6.
- Sá G & Vasconcelos T. 1981 Influência da temperatura e da luz na germinação do *Solanum nigrum* L. sp. *nigrum*. DGPPA e CBAA.UTL.
- Samaddar KR, Chakraborty M & Kanjilal S. 1998. Identification of the race of *Pseudomonas solanacearum* causing wilt of solanaceous vegetables in West Bengal and its survival. *Journal of Mycopathological Research*. **36**:51-58. (Abstract)
- Sequeira L. 1985. Bacterial wilt: Past, present and future. In: Persley GJ (ed) *Proceedings of an International workshop on bacterial wilt diseases in Asia and South Pacific*. PCARRD, Los Banos, Philippines. ACIAR Proceedings Nº 13. p. 13-21.
- Smith JJ, Offord LC, Kibata GN,, Murimi ZK, Trigalet A & Saddler GS. 1998. The development of a biological control agent against *Ralstonia solanacearum* race 3 in Kenya. In: Prior P, Allen C and Elphinstone J (eds) *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*. Guadeloupe, France. 447 pp..
- Stevens P & Van Elsas JD. 2006. Deletion of a Putative Genomic Island in a Dutch *Ralstonia solanacearum* bittersweet strain. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Sumithra KU, Krishnappa M, Vasanth TK, Shetty HS, Mortensen CN & Mathur SB. 2000. Seed-borne nature of *Ralstonia solanacearum* in eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars in India. *Seed Science and Technology*. **28**:291-299.
- Tusiime, G., Adipatla, E., Opio, F., Bhagsari, A.S. (1998) Weeds as latent hosts of *Ralstonia solanacearum* in highland Uganda: implications to development of an integrated control package for bacterial wilt. In: *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects. Reports of the Second International Bacterial Wilt Symposium*, P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone (eds). Berlin, Springer, p. 413-419.
- União Europeia. 2006. Directiva 2006/63/CE da Comissão de 14 de Julho de 2006 que altera os anexos II a VII da Directiva 98/57/CE do Conselho relativa ao controlo de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. *Jornal Oficial da União Europeia* L 206 de 27/07/2006, 36-106.

- Van Vaerenbergh J, De Paepe B, Hoedekie A & Tahzima R. 2006. Persistence and infectivity of *Ralstonia solanacearum* R3bv2 in weeds and crop rotations on a potato farm using contaminated river water In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Wenneker, M., Verdel, M.S.W., Groeneveld, R.M.W., Kempenaar, C., van Beuninger, A.R., Janse, J.D. (1999) *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: first report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology* **105**:307-315.
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian E, Guilbaud C & Prior P. 2005. Emerging Strains of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies): A case study for Epidemiology of Bacterial Wilt. *Acta Horticulturae* **695**:145-152.
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian E, Guilbaud C, Fegan M & Prior P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* doi:10.1128/AEM.00841-07.
- Winfield MO, van der Graaf P, Reid A, Saddler GS & Bryan GJ. 2006. Genetic diversity in *Solanum dulcamara* populations along Scottish rivers. In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium. Programme and Abstracts Book*. York, UK.
- Zar JH. 1998. Biostatistical analysis. 3rd Edition. Prentice-Hall International Editions. London, UK. 662 pp..
- Zhang YX, Hua JY & He LY. 1993. Effect of infected groundnut seeds on transmission of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* **9**:9-10.

A complexidade fenética e filogenética de *Ralstonia solanacearum* torna difícil a compreensão do comportamento epidemiológico das estirpes identificadas em determinado local, bem como o seu controlo através de mecanismos de melhoramento genético clássico ou por via da obtenção de transgénicos. A sequenciação completa do genoma de algumas estirpes com características distintas e a criação de um novo sistema classificativo baseado em características genómicas, permitiu recentemente alcançar enormes progressos no que respeita ao conhecimento da epidemiologia deste organismo de quarentena. A sua dispersão a nível mundial, a vasta gama de hospedeiros que possui, e a magnitude dos prejuízos sócio-económicos que provoca, originou também uma grande proliferação de estudos efectuados por equipas multidisciplinares em todos os continentes.

Os principais resultados deste trabalho de doutoramento permitem tirar conclusões acerca do diagnóstico, introduções, presença, diversidade e epidemiologia da doença do pus ou mal murcho causada pelo complexo de espécies de *R. solanacearum* em Portugal.

O método de aglutinação em lâmina revelou-se uma excelente ferramenta como método rápido de rastreio de *R. solanacearum*, tanto em pleno campo como em laboratório. É ainda um método pouco exigente em termos de consumíveis e dos equipamentos necessários, bem como do nível de especialização dos operadores.

A análise global dos resultados obtidos para as diferentes matrizes e métodos de diagnóstico reflecte a existência de diferenças significativas entre amostras bióticas e ambientais, no que diz respeito à sensibilidade dos métodos empregues. Parece assim verificar-se a necessidade de otimizar ainda o desempenho de alguns destes procedimentos e, caso isso não seja possível, tentar implementar alguns métodos mais recentes, promovendo a sua adaptação às condições da rotina laboratorial. Em termos de especificidade, que na generalidade se mostra elevada, parecem não existir diferenças significativas para estes dois tipos de matrizes.

No que diz respeito aos métodos de diagnóstico utilizados na confirmação e/ou caracterização de isolados de *R. solanacearum*, tendo em conta a recente alteração da realidade epidemiológica, com a identificação de estirpes do biovar 1 em Portugal continental, será compulsivo proceder à sua utilização para a generalidade das amostras onde foi detectado e identificado este organismo. Neste âmbito, a determinação do biovar, de utilização mais ou menos expedita, deverá ser realizada e, em presença de resultados diferentes dos esperados, convirá recorrer a métodos de 'fingerprinting' genómico, que se mostram de execução algo mais complexa.

No que se refere à epidemiologia da doença do pus ou mal murcho em Portugal, esta poderá ser, de certo modo, condicionada pelas características edafo-climáticas prevalentes, e pelos sistemas de produção agrícolas existentes. Deste modo podem-se retirar algumas conclusões relativamente às especificidades da sobrevivência e disseminação de *R. solanacearum* em Portugal.

Assim, os factores que mais parecem contribuir para a manutenção e disseminação de *R. solanacearum* são aqueles onde a sua incidência mais se faz notar, nomeadamente, a cultura do tomateiro, as águas superficiais contaminadas das áreas de regadio, o solo, os hospedeiros alternativos, os efluentes das indústrias de transformação, e por último, com menor importância, a cultura da batateira.

R. solanacearum está estabelecida nos cursos de água dos principais aproveitamentos hidroagrícolas em Portugal encontrando-se, portanto, amplamente dispersa em termos geográficos, e com níveis de incidência que se têm vindo a agravar. Nestes ecossistemas é possível recuperar este organismo a partir de águas superficiais entre os meses de Março e Novembro, sendo prevalente no mês de Abril em relação aos restantes meses do ano, e daí decorrendo um risco acrescido de utilização destas águas em áreas de regadio de culturas solanáceas. Estes factos parecem encontrar-se relacionados com as temperaturas das águas, sendo maior a prevalência de *R. solanacearum* quando as temperaturas se apresentam mais amenas (15-20°C). Acima dos 22°C o risco de utilizar águas superficiais parece decrescer. O facto de a temperatura destas águas se situar acima dos 13°C durante a maior parte do ano, e deste organismo se manter presente e activo, para a generalidade das áreas contaminadas, entre a Primavera e o Outono, traduz-se na inexistência de diferenças significativas no que diz respeito ao risco de contaminação de culturas solanáceas de Primavera-Verão vs. Outono-Inverno.

A presença, nestas áreas, de *Solanum dulcamara*, planta rípicola espontânea e hospedeira de *R. solanacearum*, contribui para a sua manutenção e dispersão, embora o seu contributo pareça ser menos importante do que aquele que lhe é atribuído noutros países da Europa ocidental.

As influências climáticas atlânticas próprias das regiões do litoral centro e norte, de clima mais ameno, favorecem a manutenção e dispersão de *R. solanacearum* nas bacias hidrográficas. Por outro lado, as características climáticas de influência mediterrânica nas áreas irrigadas mais a sul, com maiores amplitudes térmicas, parecem condicionar de forma perceptível este veículo de transmissão, tornando-o menos eficiente.

Também em Portugal, a existência de sistemas de produção agrícolas baseados na monocultura de solanáceas (batateira e tomateiro) permitirá um aporte e uma manutenção mais prolongada de populações de *R. solanacearum* nas águas superficiais por lixiviação a partir daquelas culturas, se infectadas. Por outro lado, e dada a sua elevada prevalência nestas águas, a falta de limpeza da vegetação existente nos sistemas de valas de rega tem contribuído para a manutenção deste organismo na ausência de hospedeiros cultivados.

A contaminação das culturas solanáceas batateira e tomateiro tem ocorrido sobretudo pelo uso de águas infestadas na sua irrigação, mas a contribuição das duas espécies para a manutenção e dispersão de *R. solanacearum* é muito diferente. Efectivamente a doença mostra ser rara, quer em tubérculos de batateira destinados ao consumo, quer em lotes propostos para certificação de batata-semente, onde tem apresentado uma incidência nula nos últimos anos.

No que diz respeito à contaminação de campos de batateira para produção de tubérculos destinados ao consumo, é notória a sua prevalência em áreas de regadio com águas superficiais invariavelmente infestadas. Já no caso do tomateiro a doença mostra-se mais frequente e pode atingir níveis de incidência de 90%, em campos de produção de tomate para transformação industrial. A progressão da doença, nesta situação, parece depender sobretudo do nível de infestação do solo, progredindo quase linearmente até à fase de maturação dos frutos, altura em que a taxa de progresso começa a decrescer, por ser afectada pelo nível de incidência que a doença atingiu e pela capacidade de sustentação do ecossistema.

Um aspecto da maior importância refere-se ao facto de nas condições climáticas prevalentes em Portugal, e ao contrário do que se passa noutros países da Europa, ocorrerem condições favoráveis à expressão dos sintomas da doença nos hospedeiros cultivados, que só se tornam visíveis em estados fenológicos dos hospedeiros mais avançados. Existem também algumas 'nuances', sobretudo no que diz respeito à menor proliferação da produção de exsudado bacteriano, para a maior parte dos hospedeiros, em virtude de a humidade relativa do ar, por ser inferior, vir a condicionar essa produção.

A ausência de hospedeiros cultivados por períodos mais ou menos longos produz um efeito depressivo na progressão da incidência da doença, atrasando o aparecimento dos primeiros sintomas e reduzindo os níveis de incidência da doença, que em situações particulares poderá ser maior ou menor, com implicações na manutenção, dispersão e erradicação de *R. solanacearum*.

As plantas espontâneas têm também um papel fundamental na manutenção deste organismo entre nós, tanto aquelas já identificadas como hospedeiros alternativos como outras ainda não descritas noutros países, e cujo contributo como reservatórios de *R. solanacearum* parece ser distinto, e dependente da sua predominância nas nossas condições climáticas.

Efectivamente *S. nigrum* parece possuir uma importância acrescida na sobrevivência deste organismo relativamente a *S. dulcamara*, mais importante nos países do norte da Europa, e a sua presença constituirá por isso um risco acrescido para a sua manutenção. Deve salientar-se também o papel primordial que as 'zorras' parecem desempenhar na sobrevivência de *R. solanacearum*. Outras espécies espontâneas que poderão albergar *R. solanacearum* são *Capsella rubeolla*, *Chenopodium album*, *Cynodum dactylon*, *Datura stramonium*, *Polygonum arenastrum*, *Portulaca oleracea*, *Senecio vulgaris*, *Solanum sublobatum* e *Urtica urens*. Também a espécie cultivada *Citrullus lanatus* (melancia) pode constituir um hospedeiro alternativo na manutenção deste agente fitopatogénico. Nem

sempre estas plantas apresentam sintomas da doença, comportando-se como hospedeiros assintomáticos, por comportarem baixos níveis populacionais, que dão origem a infecções latentes, e sobrevivendo até ao próximo ciclo cultural do hospedeiro cultivado.

A bactéria sobrevive no solo por períodos de um ano, nas condições climáticas prevaletentes em Portugal, mas poderão existir dúvidas relativamente à duração desse período pelo elevado contraste das características edafoclimáticas existentes no litoral norte ou no interior do Alentejo. Solos com textura fina e um teor de cálcio mais elevado parecem favorecer a progressão da doença, mas existem outros factores como a orografia, o pH e as amplitudes térmicas, muito distintos nestas áreas, que serão também condicionantes a considerar. A reduzida progressão da doença parece ser explicada, em alguns casos, pelo pH particularmente ácido dos solos de certas áreas em que este fenómeno se observa.

No solo inicia-se e encerra-se o ciclo epidemiológico de *R. solanacearum* em Portugal, com a contaminação inicial dos solos por tubérculos infectados e/ou águas superficiais contaminadas, pela sua manutenção em hospedeiros cultivados e alternativos ou na rizosfera de plantas não hospedeiras, que se comportam como um reservatório e, finalmente, pelo seu contributo como veículo de dispersão deste organismo através do seu próprio esvaziamento, como consequência do processo de lixiviação ou do fluxo lateral de águas de drenagem.

A colheita de frutos e tubérculos com infecções latentes e destinados ao processamento industrial parece ser também responsável, no nosso país, de forma mais ou menos notória, pela contaminação de águas e de campos, através do seu contributo como veículo de *R. solanacearum* em efluentes líquidos e sólidos não sujeitos a qualquer tratamento prévio, ou a tratamentos pouco eficientes. Embora algumas unidades industriais possuam estações de tratamento de resíduos mais sofisticadas, existem outras, de cariz mais artesanal, onde este risco potencial continua a subsistir.

O estudo polifásico apresentado neste trabalho permitiu caracterizar de forma coerente as populações de *R. solanacearum* presentes em Portugal.

A utilização de métodos fenotípicos e genotípicos no estudo de uma colecção de isolados revelou a capacidade diferenciada de proceder à caracterização deste organismo para níveis taxonómicos diferentes, elegendo os mais adequados para resposta a objectivos distintos.

Os métodos utilizados na tipificação e discriminação de características fenotípicas, como a determinação do perfil bioquímico do biovar e dos perfis de proteínas celulares totais (SDS-PAGE), produziram uma clara diferenciação das estirpes portuguesas a nível infra-subespecífico, nomeadamente na diferenciação de grupos infra-biovar subfenótipo e grupo RFLP.

A determinação do biovar produz resultados fidedignos para extrapolação de características epidemiológicas dos isolados, de grande utilidade em laboratórios de análise. Já a análise de proteínas por SDS-PAGE permitiu alguma diferenciação entre estirpes do sub-fenótipo 2A, revelando um certo nível de variabilidade destas estirpes que só poderá, no entanto, ser

determinado por análise numérica de perfis, menos adequada em termos de rotina.

A caracterização genotípica por MSP-PCR permitiu discriminar as estirpes nacionais e estrangeiras do biovar 2, sub-fenótipo A, não diferenciando contudo a estirpe Colombiana pertencente a um grupo RFLP distinto. Foi assim possível eleger um perfil tipo, para caracterização de isolados deste grupo. Foi igualmente possível identificar perfis discriminantes para estirpes de outros biovares e organismos relacionados permitindo, num período de tempo reduzido, caracterizar de forma precisa estirpes suspeitas de *R. solanacearum*. A menor complexidade dos perfis permite também a sua fácil visualização. Verificou-se igualmente alguma capacidade deste método em estudos de diversidade, uma vez que conduziu à detecção de variabilidade nos isolados desta colecção, permitindo inferir sobre a presença de uma única estirpe para isolados agrupados em 'microclusters' como elevados níveis de similaridade. Detectou-se igualmente alguma associação com a origem geográfica ou a matriz.

Os métodos de rep-PCR, com recurso à utilização de lisados em substituição de DNA purificado, apresentaram níveis de reprodutibilidade muito variáveis que resultaram da utilização deste processo de execução simplificado. Constituíram contudo métodos de tipificação e discriminação muito adequados à identificação e determinação de variabilidade infra-específica, revelando a presença de perfis e de grupos bem definidos para identificação dos diferentes biovares e sub-fenótipos do biovar 2. A utilização do 'primer' ERIC 2 pareceu evidenciar de forma mais clara a diversidade inerente à colecção de isolados, gerando maior número de grupos distribuídos de modo também mais uniforme.

A distribuição dos isolados em função da matriz e da origem geográfica ao longo dos dendrogramas gerados pelos diferentes métodos de 'fingerprinting' permitiu, igualmente, gerar hipóteses de natureza epidemiológica acerca do contributo da batata-semente com infecções latentes, produzida na região de Trás-os-Montes, e do seu papel na dispersão de estirpes do biovar 2, subfenótipo A (nhr), em simultâneo com a recorrência da doença a partir de material de propagação vegetativa importado.

A existência da doença desde 1995 na província de Castilla-Leon em Espanha, região produtora de batata-semente (parte dela destinada a Portugal), em áreas de regadio servidas pelas bacias hidrográficas dos rios Tâmega e Douro (com origem naquele país), cujas águas superficiais, em Portugal, regam campos de batata-semente, corroboram esta hipótese. Efectivamente, é notório o elevado nível de similaridade dos isolados obtidos de batata-semente de Trás-os-Montes e dos isolados obtidos de campos destinados ao consumo, por exemplo, do aproveitamento hidro-agrícola de Cela no ano de 1999. É ainda evidente a semelhança dos isolados de águas superficiais de rega de Trás-os-Montes obtidos nas imediações da fronteira do rio Tâmega, naquele ano, com os anteriormente referidos.

De notar que entre 1995, ano em que se verificou a recorrência da doença em Portugal e vários países da Europa (incluindo Espanha), e 1999, não se procedeu a uma monitorização exaustiva da doença. Apenas após 1999, com a implementação do "Plano de Luta contra *Ralstonia solanacearum*", se identificaram as principais áreas de risco em Portugal.

Confirmando-se esta hipótese teriam ocorrido, até finais do século 20, cerca de pelo menos três eventos ligados a introduções de *R. solanacearum* em Portugal.

A introdução de estirpes do biovar 1 (bhr) num passado recente, e a sua utilização conjunta com outras estirpes nhr supracitadas num estudo de caracterização a nível filogenético, permitiu esclarecer a localização epidemiológica a nível mundial das estirpes portuguesas de *R. solanacearum*. A árvore filogenética global permitiu incluir os isolados portugueses no filotipo II, distribuindo-se pelo 'subcluster' A os isolados classificados como pertencendo ao biovar 2, e incluindo-se no 'subcluster' B aqueles pertencentes ao biovar 1. Este acontecimento criou um quadro epidemiológico novo, para a realidade portuguesa, na medida em que estas estirpes possuem largo espectro de hospedeiros (bhr), portanto menos limitado que as estirpes do biovar 2, onde o hospedeiro primário parece ser a família *Solanaceae*.

Os isolados portugueses bhr agrupam claramente com isolados obtidos de *Musa* sp. com origem no Brasil, e os sintomas evidenciados pelas plantas em pleno campo, possuindo um fraco desenvolvimento e ampla clorose das folhas basais, é concordante com as descrições constantes da bibliografia sobre estudos da doença "Moko".

Parecem assim existir pelo menos duas populações de *R. solanacearum* claramente distintas em Portugal, uma constituída por estirpes do biovar 1, e a segunda por estirpes do biovar 2. A população do biovar 2 resultará de diferentes introduções com uma origem clonal, apresentando um nível de variabilidade indicativo da ocorrência de um processo de microevolução, condicionado certamente pelas condições climáticas e específicas dos nichos ecológicos e sistemas culturais onde este organismo se encontra disperso.

O processo evolutivo de adaptação das estirpes do biovar 2 parece ter obtido sucesso, dada a implantação e endemicidade da doença em Portugal. No que diz respeito às estirpes bhr, além de mais versáteis quanto à gama de potenciais hospedeiros, possuem excelente adaptação a temperaturas superiores àquelas presentes nos climas temperados, as quais prevalecem durante uma parte significativa do ano em Portugal.

Os resultados relativos à caracterização destes isolados encontram-se registados numa base de dados construída em ACCESS (Microsoft, Califórnia, EUA), contendo dados relativos às estirpes de *R. solanacearum* da Colecção Portuguesa de Bactérias Fitopatogénicas (CPBF), constituída por campos que permitiram reunir toda a informação disponível relativamente a isolados de *R. solanacearum* obtidos em Portugal a partir de 1995 através de consultas fitossanitárias, bem como de outros provenientes de amostras de diferentes matrizes colhidas no âmbito de 'Plano de Luta Contra *Ralstonia solanacearum*', entre 1999 e 2007. Nela se incluíram também outros isolados da mesma espécie e de espécies ou géneros relacionados com origem em colecções de referência estrangeiras. Este banco de dados possui campos referentes a informações sobre a origem geográfica das diferentes estirpes (país, região, Concelho), ano de obtenção, obtentor, classificação específica e infra-específica, número que detém na colecção de referência original e noutras colecções de referência (em se tratando de estirpes de origens diferentes), matriz de origem

(hospedeiro/ambiental), e dados de rastreabilidade relativamente à amostra que lhe deu origem, permitindo efectuar essa verificação noutras bases de dados dos serviços responsáveis pela colheita de amostras.

Os dados de interesse disponíveis constantes daquela base de dados foram gravados em formato XLM e exportados para o programa informático BioNumerics (Applied Maths) onde se criou uma nova base de dados e se adicionaram também, para cada isolado, dados de caracterização fenotípica clássica (morfologia das colónias, biovar), perfis de proteínas celulares totais por SDS-PAGE e perfis de 'fingerprinting' genómico (M13-PCR, ERIC2-PCR, BOXA1R-PCR, FAFLP). Esta base de dados permitirá ter acesso rápido a uma série de parâmetros tipificantes do complexo *R. solanacearum* em Portugal e, por comparação, inferir acerca das características de novas estirpes em estudo.

O contributo de *Solanum dulcamara* na sobrevivência e dispersão de *R. solanacearum* tem vindo a ser avaliado em alguns países da Europa Ocidental, nomeadamente na Holanda e Reino Unido. Existem também algumas referências a *Solanum nigrum* como hospedeiro alternativo preferencial nos países da Europa mediterrânica, embora o seu papel como hospedeiro alternativo não tenha, até agora, sido alvo de estudos mais aprofundados.

O estudo comparativo das duas espécies hospedeiras revela que possuem um potencial muito semelhante como suporte à manutenção e dispersão de *R. solanacearum*. Assim, a expressão dos sintomas evidenciados pela parte aérea das duas espécies dependerá essencialmente da densidade da população bacteriana presente, podendo *S. dulcamara* mostrar-se mais susceptível para baixos níveis de infestação no solo relativamente a *S. nigrum*. Por outro lado, o substrato em que as plantas de *S. dulcamara* se encontram parece também não influenciar a expressão de sintomas como flacidez ou murchidão foliar.

O sistema radicular parece não constituir um bom indicador relativamente à presença da doença, embora *R. solanacearum* colonize a rizosfera de ambas as espécies hospedeiras, sendo a atrofia do sistema radicular um dos aspectos menos frequentes nas plantas doentes de ambas as espécies. O sistema radicular de *S. dulcamara* parece ser, no entanto, significativamente mais afectado que o de *S. nigrum*, especialmente na presença de elevadas densidades populacionais deste organismo na água.

O sistema vascular de ambas as espécies parece ser o que mais fidedignamente reflecte a presença de doença, e de verdadeira infecção sistémica, permitindo classificar as duas espécies como verdadeiros hospedeiros de *R. solanacearum*. Neste caso a colonização é particularmente evidente imediatamente acima da raiz, para as duas espécies, e independentemente do nível de infestação. Neste local torna-se particularmente visível a necrose dos feixes vasculares, resultante da obstrução dos feixes vasculares por gomas e tiloses, o qual se revelou também o local preferencial para proceder ao isolamento de *R. solanacearum*.

Nas condições de ensaio, os dois hospedeiros comportaram-se assim de forma muito idêntica, na presença de elevadas concentrações de inóculo. Estes resultados mostram que o contributo de *S. dulcamara*, na manutenção deste organismo, poderá ser superior ao evidenciado em condições naturais (Capítulo 3). Além deste aspecto, tem-se verificado também a frequente associação entre a presença de plantas de *S. dulcamara* infectadas e de águas superficiais contaminadas em grande parte dos aproveitamentos hidro-agrícolas Portugueses.

A ausência de hospedeiro não será condutiva à manutenção de *R. solanacearum* no solo, originando, nas condições de ensaio, uma quebra da densidade populacional que poderá atingir, após um mês, 10^4 ufc.g⁻¹. O efeito do hospedeiro revela-se neste caso muito distinto para as duas espécies em causa, mostrando-se *S. nigrum* claramente favorável à manutenção e proliferação desta população bacteriana na sua rizosfera. A sua manutenção em campos, mesmo que associada a rotações em períodos de quarentena, torna-se por isso grave. Acresce ainda o facto desta infestante, na presença de condições favoráveis, poder atingir uma maior longevidade, tornando-se bienal, e de ser uma espécie espontânea muito abundante na flora autóctone, e particularmente frequente em campos de produção de culturas solanáceas. Os níveis populacionais de *R. solanacearum* mantidos por esta espécie hospedeira não devem, assim, ser negligenciados aquando da implantação de culturas solanáceas, parecendo ser suficientes para desencadear níveis de infecção importantes, ao contrário do referido por Van Vaerenberg *et al.* (2006).

A presença de *S. dulcamara* associada à água parece promover também a manutenção e crescimento da população de *R. solanacearum*, sobretudo para os níveis de infestação mais baixos, parecendo estar dependente da densidade populacional, ou seja do nível de confinamento da população, na presença de temperaturas óptimas à sua manutenção.

Constata-se assim a presença de infecção sistémica em ambas as espécies, bem como a colonização epifítica do seu rizoplano. As variações relativamente aos limiares populacionais para os quais estas espécies espontâneas possuem a capacidade de manter *R. solanacearum* são mais ou menos evidentes e poderão depender do substrato em que se encontram. Elphinstone *et al.* (1998) verificaram também que, enquanto populações de *R. solanacearum* na ordem dos 10^5 ufc por planta eram suficientes para infectar plantas de *S. tuberosum* em condições experimentais, já no caso de *S. dulcamara* os níveis populacionais teriam de ser 10 vezes superiores (10^6 ufc). No entanto, verificou-se que *S. dulcamara* possui a capacidade de funcionar como hospedeiro alternativo de *R. solanacearum* mesmo quando não possui as raízes imersas na água.

Elphinstone *et al.* (2006) referem que nos países da Europa Ocidental foi possível erradicar *R. solanacearum* dos sistemas de produção agrícolas, mas que essa erradicação será particularmente difícil ao nível dos ecossistemas. A possibilidade, agora bem evidente, de manutenção de *R. solanacearum* não só em *S. dulcamara* mas também em *S. nigrum*, presente nos campos agrícolas, revela dificuldades acrescidas ao controlo e erradicação deste organismo em Portugal. Parece assim existir uma necessidade urgente de aplicar

medidas semelhantes às já implementadas noutros países da Europa, com a destruição de plantas de *S. dulcamara* previamente sinalizadas, bem como proceder à destruição de infestantes, incluindo *S. nigrum*, de campos infestados, e ainda, aplicar medidas restritivas, impedindo a utilização de águas superficiais contaminadas na rega de culturas solanáceas e não solanáceas. A utilização de material de propagação vegetativa isento não será nunca suficiente, como estratégia isolada no controlo e erradicação de *R. solanacearum* à semelhança do que já foi constatado por outros autores (Pradhanang & Momol, 2001).

Os conhecimentos adquiridos no âmbito do trabalho anteriormente descrito lançam sobre nós a consciência de que haverá a necessidade futura de proceder a algumas modificações no 'Programa Nacional de Prospecção de *R. solanacearum*' que, até agora, tem vindo a ser executado anualmente. Estes conhecimentos poderão contribuir, de alguma forma, para que as medidas inerentes ao controlo e erradicação do agente causal da doença do pus ou mal murcho decorrentes da aplicação do 'Plano de Luta Contra *R. solanacearum*' se possam tornar mais eficazes. Neste sentido, procede-se ao balanço do trabalho efectuado e propõem-se algumas medidas que visam tornar mais eficazes as acções de política fitossanitária a implementar, apoiadas em conhecimentos técnico-científicos obtidos pela aplicação dos meios de diagnóstico.

Os trabalhos laboratoriais inseridos no 'Plano de Luta Contra *R. solanacearum*' tiveram início no ano de 1999. À data, o estado da arte relativamente aos meios de diagnóstico disponíveis descritos na legislação existente (União Europeia, 1998), nomeadamente a inexistência de métodos biomoleculares validados aplicados à rotina laboratorial, era condicionante importante do processo. Por outro lado, a estrutura funcional do laboratório teve de se adaptar a uma nova realidade que solicitava um esforço acrescido tanto no que diz respeito ao número de amostras a processar, como aos novos procedimentos de diagnóstico que obrigavam a uma logística mais elaborada. Referem-se, em particular, a necessidade de dispor de grandes volumes de soluções fosfatadas e de meios de cultura gerais e semiselectivos, plantas indicadoras (tomateiro e beringela) em estado fenológico adequado à expressão de sintomas da doença, câmaras para produção dessas plantas e para incubação de plantas inoculadas nas condições requeridas, meios humanos em número e com formação adequada ao processamento inicial de amostras, sobretudo no que se refere à remoção de hilos dos tubérculos.

Outro aspecto condicionante diz respeito à experiência dos técnicos superiores face ao conhecimento de *R. solanacearum*. Esta traduzia-se apenas no processamento de amostras de tubérculos de batateira, pelo que houve a necessidade de aprofundar conhecimentos ao nível da morfologia das colónias, comportamento das células bacterianas em meio de cultura, níveis de infecção esperados, expressão de sintomas em plantas indicadoras e adequabilidade dos diferentes meios de diagnóstico às diversas matrizes que passaram a ser prospectadas.

Paralelamente, a participação do corpo técnico do Laboratório de Bacteriologia nos trabalhos

do Projecto da União Europeia SMT-4-CT97-2179, entre 1997 e 2000, permitiu juntar experiências distintas que foram capitalizadas ao nível da sensibilidade e especificidade do resultado final do diagnóstico obtido para as diferentes matrizes. A validação dos ensaios laboratoriais, incluindo reagentes, materiais de referência e procedimentos, por uma rede europeia de laboratórios oficiais pertencentes a 10 países distintos, levou à implementação na rotina do laboratório dos esquemas de rastreio, identificação e confirmação adoptados nos 'ringtests' finais do projecto, posteriormente propostos para alteração da legislação da União Europeia, e que deverão ser seguidos após transposição para a legislação nacional da nova Directiva 2006/63/CE (União Europeia, 2006).

Durante o período de execução do supracitado 'Plano de Luta Contra *R. solanacearum*' em diferentes hospedeiros e substratos, foi também notória a existência de limitações financeiras, logísticas e humanas que condicionaram o processo de forma variável ao longo dos anos. Citam-se entre outras:

1. a reduzida disponibilidade de meios humanos nas várias regiões (inspectores fitossanitários), tornando por vezes difícil respeitar o número e periodicidade de entrega de amostras previamente estipulado para o ano em causa;
2. a reduzida disponibilidade de meios logísticos, nomeadamente de viaturas e combustível para as deslocações dos inspectores aos locais de colheita;
3. a falta de formação adequada de alguns inspectores fitossanitários de modo a possuírem sensibilidade e uma atitude empenhada no referido processo;
4. a localização geográfica de algumas regiões, como por exemplo, do aproveitamento hidroagrícola do Tâmega, importante região produtora de batata-semente, onde se tornou difícil a colheita de águas superficiais devido à distância, à falta de meios humanos e à necessidade de processar as amostras desta matriz num curto espaço de tempo;
5. a falta de meios humanos com formação intermédia no laboratório, realizando trabalho de grande importância (preparação de soluções, meios de cultura e organização de material indispensável ao processamento das amostras), para apoio aos técnicos superiores, o qual condicionou, nos últimos anos, o número total de amostras processadas.

A análise da totalidade dos dados obtidos entre 1999 e 2006 mostra também aspectos de outra natureza, igualmente importantes, na medida em que poderão ter condicionado ou retardado o conhecimento da situação real face à presença de *R. solanacearum* no país, nomeadamente a integração da informação transmitida pelos conhecimentos técnicos e científicos adquiridos por via laboratorial. Efectivamente, os resultados da execução anual deste programa deveriam ser sujeitos a uma análise de risco mais elaborada que se viesse a reflectir no número e qualidade das amostras a processar laboratorialmente em anos posteriores, conforme estabelecido na legislação (União Europeia, 1998). Este balanço

deveria, quanto a nós, ser efectuada por uma equipa multidisciplinar constituída por técnicos da área da inspecção fitossanitária e da área laboratorial, de modo a avaliar os resultados da execução dos trabalhos em determinado ano ou período, a efectuar um levantamento das medidas a adoptar no campo e a planear e focalizar o trabalho futuro por região e matriz, de modo a monitorizar o resultado efectivo das medidas de erradicação instituídas para cada uma das áreas de produção de culturas solanáceas abrangidas pelo 'Plano de Luta Contra *Ralstonia solanacearum*'.

Decorrente desta lacuna, deparamo-nos com algumas situações já anteriormente referidas, como a falta de adequabilidade do esforço de trabalho, exigido face aos escassos meios humanos e logísticos, ao conhecimento da realidade. Efectivamente, o número de amostras analisado e o número de casos positivos para as diferentes matrizes prospectadas revela uma inversão do que seria esperado face aos níveis de incidência da doença nas mesmas. Como consequência deste enviesamento, o conteúdo informativo retirado das prospecções realizadas poderá ser reduzido, condicionando o conhecimento da realidade. Um exemplo deste facto é o elevado esforço que tem sido posto no controlo e análise de amostras de tubérculos de batateira provenientes da UE onde a incidência da doença tem sido nula e que, indispensável por se tratar muitas vezes de material de propagação vegetativa, já é controlado obrigatoriamente no país de origem. Inversamente, a análise de plantas provenientes de campos de produção destinados ao consumo, situados e regados muitas vezes com águas superficiais de vários aproveitamentos hidroagrícolas, é exíguo. Na verdade a incidência da doença em campos de batateira é dramaticamente inferior à incidência em campos de tomateiro e o número de amostras de plantas igualmente muito inferior, o que mostra alguma incongruência e não reflecte certamente a realidade, por se tratarem de culturas igualmente susceptíveis, cultivadas em geral nas mesmas regiões e regadas com as mesmas águas.

Dado não se ter verificado no presente grandes alterações face à situação inicial (2005-2006 vs 1999-2000), para a generalidade das matrizes em estudo, as medidas a tomar com vista ao controlo e erradicação de *R. solanacearum* deverão ser reavaliadas. O ponto de partida será certamente diferente, pois conhecemos hoje o contributo dos factores de risco mais importantes para a manutenção e dispersão da doença nas condições edafoclimáticas prevaletentes no país. Sabemos que a bactéria possui uma ampla dispersão em termos geográficos, afectando as principais áreas de produção de culturas solanáceas, não se verificando, à excepção de Trás-os-Montes, uma regressão no número de focos de infecção.

Por outro lado, trata-se de um organismo com um riquíssimo arsenal genético que o torna capaz de resistir a condições adversas, como seja a ausência de hospedeiros cultivados, procurando com sucesso os meios alternativos de sobrevivência. Quebrar os elos de ligação entre os vários intervenientes do seu ciclo biológico, criando um desequilíbrio desfavorável à sua manutenção, parece ser o passo mais importante num futuro próximo.

Neste sentido impõe-se verificar a situação real através de uma monitorização dos factores de risco conhecidos como preponderantes, nomeadamente:

1. Tornando mais exaustiva a colheita de amostras de águas superficiais nos vários perímetros de rega durante os meses de Março a Outubro. Dado que uma vez detectada no início da Primavera, a infestação se mantém geralmente até final do Verão, e que em Abril ocorre um 'boom', aumentando os níveis de incidência de forma dramática, preconiza-se a colheita de amostras em três datas distintas, nomeadamente em Abril, Julho e Outubro.
2. Averiguando a presença e procedendo à destruição de plantas de *Solanum dulcamara*, infectadas, presentes nesses mesmos aproveitamentos. Por outro lado, de forma a reduzir o impacto ambiental decorrente deste processo, nomeadamente no que diz respeito à redução da biodiversidade desta espécie vegetal, à semelhança das acções realizadas noutros países da Europa (Elphinstone *et al.*, 2006), preconiza-se proceder faseadamente, efectuando monitorizações paralelas relativamente à infestação das águas, à presença de plantas desta espécie infectadas, bem como à avaliação da sua biodiversidade por técnicas biomoleculares de 'fingerprinting'.
3. Dando uma maior atenção à inspecção visual de campos de batateira e tomateiro e aumentando o número de amostras colhidas aleatoriamente nas fases de floração e de início da frutificação, independentemente da presença de sintomas, desde que esses campos se situem em áreas de influência de aproveitamentos hidroagrícolas onde se tem vindo a detectar a presença de águas superficiais contaminadas.
4. Mantendo o controlo das amostras de tubérculos de batateira, em particular da produção nacional destinada à propagação e ao consumo, com ênfase em lotes produzidos naquelas áreas. No que diz respeito aos lotes de tubérculos provenientes da UE e importados de países terceiros deverá manter-se também uma fiscalização com particular incidência naqueles provenientes de países com condições climáticas menos favoráveis à proliferação de níveis populacionais superiores, podendo albergar populações latentes não detectáveis através dos ensaios laboratoriais de rastreio correntemente utilizados nesses países.
5. Fiscalizando a destruição de plantas espontâneas (especialmente 'zorras' e *Solanum nigrum*) nas parcelas em regime de quarentena.
6. Realizando acções de divulgação e sensibilização dos agricultores em colaboração com associações de classe, na medida em que se verifica a existência de um certo desconhecimento relativamente à natureza, manutenção e prejuízos causados pela doença, transmitindo informações sobre a importância das medidas culturais e de higiene tão necessárias ao seu controlo.
7. Monitorizando de forma exaustiva a bacia hidrográfica do rio Tâmega, de modo a verificar a sua situação relativamente à erradicação de *R. solanacearum*. O facto de não surgirem amostras de tubérculos de batata-semente propostos para certificação

e de batata-consumo produzidas nesta região positivas relativamente à presença deste organismo desde 2001, poderá ser um indício de que efectivamente se procedeu à erradicação. Contudo, é premente voltar a monitorizar as águas superficiais em toda a extensão desta bacia fluvial. Seria, neste caso, também compulsivo proceder a uma análise do risco de reintrodução deste organismo de quarentena utilizando sistemas de informação georeferenciada através de simulação espacial estocástica e tomar medidas urgentes de controlo descritas num plano de contingência específico (Madden & Hughes, 1995; Rafoss, 2003; IPPC, 2005).

8. Monitorizando o aproveitamento hidro-agrícola do Baixo-Mondego em toda a sua extensão, averiguando a presença de diferentes populações de *Ralstonia solanacearum*, pertencentes aos biovars 1 e 2, dado apresentarem uma gama de hospedeiros e períodos de sobrevivência distintos.

A mais recente introdução de estirpes brh do flotipo II, subcluster B, pertencentes ao biovar I, introduz também uma nova realidade epidemiológica ainda imprevisível. Dado tratar-se de um acontecimento até agora confinado a determinada área do aproveitamento hidroagrícola do Baixo Mondego, e que parece não afectar outras áreas daquele ecossistema, bem como noutras matrizes que suportam a manutenção de *R. solanacearum*, nomeadamente as águas superficiais; tendo ainda em conta que as estirpes deste grupo parecem possuir uma gama de temperaturas óptimas mais elevada que as estirpes do biovar 2, subfenótipo A, revela-se urgente a implementação de novas medidas fitossanitárias:

1. Implementação de medidas de quarentena aos campos afectados e contíguos, por um período superior ao estipulado para estirpes do biovar 2, com interdição do cultivo de qualquer cultura e remoção e destruição periódica de plantas espontâneas e zorras;
2. Desinfecção de toda a maquinaria agrícola que tenha sido utilizada nos campos identificados com plantas doentes, bem como dos armazéns que possam ter albergado essa maquinaria e de todos os contentores para armazenamento de tubérculos;
3. Implementação de medidas de higiene, com desinfecção de maquinaria e do calçado e roupas dos trabalhadores agrícolas que tenham a necessidade de se deslocar àqueles campos durante o período de quarentena;
4. Monitorização intensiva deste perímetro agrícola em toda a sua extensão com colheita de amostras de material vegetal com particular incidência em culturas solanáceas e viveiros de plantas ornamentais e florestais, solos dos campos infectados e contíguos, e águas superficiais de condutas de irrigação e de valas de lexiviamento daqueles campos.

Esta nova realidade epidemiológica requer igualmente a realização de novos estudos relacionados com:

1. Avaliação laboratorial de novos métodos de detecção de *R. solanacearum* nas matrizes (solo e efluentes de indústrias) onde os ensaios laboratoriais actualmente preconizados não atingem os limiares de fiabilidade já alcançados para outras matrizes, averiguando a sua adaptabilidade à rotina para posterior monitorização da sobrevivência deste organismo e reavaliação do seu contributo como factores de risco na manutenção e dispersão da doença em Portugal.
2. Estudo de métodos biomoleculares para detecção directa (v. g. DGGE (electroforese em gel de gradiente desnaturante), para detecção de *R. solanacearum* biovar 1 na matriz solo, bem como noutras matrizes para as quais os métodos de diagnóstico referidos em 1 se venham a revelar menos adequados.
3. Determinação do potencial de dispersão das estirpes do biovar 1.
4. Estabelecimento de novos factores de risco, nomeadamente de novas espécies cultivadas e de hospedeiros alternativos, que possam funcionar como reservatórios e potenciar a manutenção e estabelecimento da população pertencente ao biovar 1.
5. Continuação do estudo do perfil de virulência dos isolados do biovar 1 obtidos em 2007, bem como de novos isolados deste fenótipo que se possam vir a obter, através de uma caracterização biomolecular de base filogenética.
6. Ensaio de patogenicidade em novas espécies de interesse agrícola presentes na região do baixo Mondego, e pertencentes a outras famílias botânicas, em condições de confinamento ambiental próximas das naturais.

| Anexo

Colecção de isolados de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (1995) obtidos em Portugal utilizados em estudos fenéticos e filogenéticos.

| ID-original | Género/Espécie | Biovar | Matriz | País | Local | Concelho | Ano | Obtentor | SDS-PAGE | MSP-PCR | BOX-PCR | ERIC-PCR | FAFLP | Filogenia |
|-------------|-------------------------------|--------|--------------------------------|----------|------------------|-----------|------|--------------|----------|---------|---------|----------|-------|-----------|
| CPBF 473 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Montijo | Montijo | 1997 | L. Henriques | • | | • | | | |
| CPBF 568 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | P. Varzim | P. Varzim | 1995 | L. Henriques | • | | • | | | • |
| CPBF 646 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | V. Frades | Nazaré | 1998 | L. Cruz | | • | • | | • | |
| CPBF 648 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Mora | Mora | 1998 | M. Eloy | | • | • | | • | |
| CPBF 674 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 1 | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | M. Campo | Coimbra | 2007 | M. Eloy | • | | • | | • | |
| CPBF 712 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | V. Frades | Nazaré | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 713 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum nigrum</i> | Portugal | V. Frades | Nazaré | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 714 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum nigrum</i> | Portugal | Mora | Mora | 1999 | L. Henriques | • | | • | | • | |
| CPBF 715 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | V. Frades | Nazaré | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 716 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | V. Frades | Nazaré | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 724 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Couço | Coruche | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 742 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | S. Grandes | Montijo | 1999 | M. Eloy | • | • | • | | • | |
| CPBF 747 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cadafaz | C. Beira | 1999 | M. Eloy | • | • | • | | • | |
| CPBF 750 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | M. Quinta | Benavente | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 752 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | H. Montinho | Montijo | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 757 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Furadouro | Mora | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 758 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | M. Quinta | Benavente | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 759 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | H. Montinho | Montijo | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 761 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água de irrigação | Portugal | A. Gameiro | Mora | 1999 | L. Cruz | • | • | • | | • | |
| CPBF 762 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | Barosa | Pombal | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 763 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | Caranguejeira | Leiria | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 767 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | M. Quinta | Benavente | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 770 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | H. Pavões | Coruche | 1999 | M. Eloy | • | | • | | • | |
| CPBF 772 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | F. Salvaterra | S. Magos | 1999 | M. Eloy | • | | • | | • | |
| CPBF 774 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | H. Espadaneira | Canha | 1999 | M. Eloy | • | | • | | • | |
| CPBF 776 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | C. Bragança | V. Novas | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 779 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | M. Quinta | Benavente | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 780 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Rib. Canha | Canha | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 782 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | R. Caranguejeira | Leiria | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 784 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Montreal | Leiria | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 785 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | Barosa | Pombal | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |
| CPBF 787 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | R. Areia | Nazaré | 1999 | M. Eloy | • | | • | | • | |
| CPBF 788 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Chaves | Chaves | 1999 | M. Eloy | • | | • | | • | |
| CPBF 789 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | Á. Belas | Coruche | 1999 | L. Cruz | • | | • | | • | |

| ID-original | Género/Espécie | Biovar | Matriz | País | Local | Concelho | Ano | Obtentor | SDS-PAGE | MSP-PCR | BOX-PCR | ERIC-PCR | FAFLP | Filogenia |
|-------------|-------------------------------|--------|--------------------------------|----------|------------------|------------|------|----------|----------|---------|---------|----------|-------|-----------|
| CPBF 793 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Resíduo Industrial | Portugal | Mora | Mora | 1999 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 803 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | H. Espadaneira | Canha | 1999 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 805 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Rib. Canha | Canha | 1999 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 829 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Montalegre | Montalegre | 1999 | M. Eloy | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 831 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Montalegre | Montalegre | 1999 | M. Eloy | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 832 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Datura stramonium</i> | Portugal | H. Espadaneira | Montijo | 1999 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 833 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Portulaca oleracea</i> | Portugal | H. Espadaneira | Montijo | 1999 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 834 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Montalegre | Montalegre | 1999 | M. Eloy | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 835 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Montalegre | Montalegre | 1999 | M. Eloy | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 836 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Montalegre | Montalegre | 1999 | M. Eloy | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 837 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 | N. Lyons | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 838 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 | N. Lyons | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 839 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 | N. Lyons | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 840 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 | N. Lyons | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 845 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 | N. Lyons | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 846 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | H. Espadaneira | Montijo | 1999 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 847 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | H. Espadaneira | Montijo | 1999 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 848 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | H. Espadaneira | Montijo | 1999 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 849 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 | M. Eloy | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 850 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 1999 | M. Eloy | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 851 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Bragança | Bragança | 1999 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 856 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | R. Caranguejeira | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 861 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Furadouro | Mora | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 869 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | A. Tâmega | Chaves | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 870 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Rio Areia | Nazaré | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 872 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Tâmega 2 | Chaves | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 873 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Veiga | Chaves | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 874 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum nigrum</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 875 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 877 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Senecio vulgaris</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 878 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Urtica urens</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 879 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 2000 | M. Eloy | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 880 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | Cela | Alcobaça | 2000 | M. Eloy | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 881 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Solo | Portugal | Muge | Coruche | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 882 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | M. Quinta | Benavente | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 883 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | A. Tâmega | Chaves | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |

| ID-original | Género/Espécie | Biovar | Matriz | País | Local | Concelho | Ano | Obtentor | SDS-PAGE | MSP-PCR | BOX-PCR | ERIC-PCR | FAFLP | Filogenia |
|-------------|-------------------------------|--------|--------------------------------|----------|-------------------|----------|------|-------------|----------|---------|---------|----------|-------|-----------|
| CPBF 884 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água de irrigação | Portugal | Tâmega 2 | Chaves | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 885 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Azabuxo | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 886 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | P. Gândara | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 887 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Pousos | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 894 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Azabuxo | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 895 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Rib. Carnugejeira | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 897 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Montreal | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 899 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | P. Gândara | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 900 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Pousos | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 903 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Campinos | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 904 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Campinos | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 908 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | R. Areia | Nazaré | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 909 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Rib. Caldeias | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 913 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Azabuxo | Leiria | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 914 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Muge | Coruche | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 915 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Polygonum areanastrum</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 916 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum nigrum</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 917 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Resíduo industrial | Portugal | Palmela | Palmela | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 918' | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum dulcamara</i> | Portugal | P. Montante | Alcobaça | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 920 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum nigrum</i> | Portugal | Muge | Coruche | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 921 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | Póvoa | Alcobaça | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 922 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | P. Montante | Alcobaça | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 923 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | C. Areia | Alcobaça | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 925 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | R. Alcoa | Alcobaça | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 929 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | Água superficial | Portugal | R. Areia | Nazaré | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 933 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | V. Frades | Nazaré | 2000 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| CPBF 1192 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 1 | <i>Solanum tuberosum</i> | Portugal | S. Martinho | Coimbra | 2007 | L. Cruz | • | • | • | • | • | • |
| PD 1941 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2A | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Portugal | - | - | 1960 | M. Oliveira | • | • | • | • | • | • |

