



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
CAMPUS DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CECA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS - PPGPP



YOLANDA DE MELO DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Ralstonia solanacearum* NO
ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL**

Rio Largo – AL
2020

YOLANDA DE MELO DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Ralstonia solanacearum* NO
ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Campus de Engenharia e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Márcio Freire Silva
Coorientadora: Prof. Dr^a. Iraildes Pereira Assunção

Rio Largo – AL
2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana

- O48d Oliveira, Yolanda de Melo de.
Diversidade do complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* no estado de Alagoas, Brasil / Yolanda de Melo de Oliveira. – 2020.
- 57f.: il.
Orientador: Prof. Dr. Adriano Márcio Freire Silva.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Iraildes Pereira Assunção.
- Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas.) – Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2020.
- Inclui Bibliografia.
1. Murcha bacteriana. 2. R. pseudosolanacearum. 3. Sequevar. I. Título

CDU: 632(813.5)

Ao meu esposo **Ewerton Barros** e a minha filha **Lourdes Maria** que são a razão por todo meu esforço e dedicação, eles são o apoio e o incentivo que preciso para renovar minhas forças a cada dia. Sou muito grata a Deus pela minha família.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pela clareza das coisas e por ter guiado meus passos até aqui;

Aos meus queridos pais, Miranildes Brito e José Eronaldo pelo exemplo de vida e pelo apoio em todas as etapas da minha caminhada;

Aos meus irmãos por nossa união e por acreditarem em mim, em especial ao meu irmão Romário Melo por sempre estar ao meu lado e por ter me ensinado o significado do amor verdadeiro;

À minha cunhada Tamires Aquino por ter me dado a graça de ser tia da Maria Flor;

A minha sogra Maria Nadêmia, por todas orações e por ser tão presente em nossas vidas;

Aos professores Drs. Iraildes Pereira Assunção e Gaus Silvestre de Andrade Lima pela oportunidade e confiança;

À Universidade Federal de Alagoas, ao Campus de Engenharia e Ciências Agrárias e ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas por permitir a realização do mestrado;

Ao meu orientador, Prof^o Dr. Adriano Márcio Freire Silva, pela dedicação, confiança e ensinamentos fundamentais para a realização desse trabalho e construção do meu caráter profissional;

Ao técnico de Laboratório Samário Lino, por todo empenho e ajuda no desenvolvimento deste trabalho;

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, pelos ensinamentos que foram fundamentais para minha formação;

Aos Pós doutorando do Laboratório de Fitopatologia Molecular Dr. Mariote dos Santos por todo ensinamento, conselhos e por ter acreditado em mim; Dra. Mayra Ferro pela amizade e incentivo diário e Dr. Frederico Feijó por toda ajuda no desenvolvimento do meu trabalho.

Grata a todos vocês.

Às minhas companheiras de todos os dias, Lívia Chaves e Mayara Oliveira por se fazerem sempre presentes, quero que nossa amizade seja além da Universidade, vocês se tornaram parte da minha vida;

A todos do Laboratório de Fitopatologia Molecular pela amizade, por todo apoio, pela ótima convivência durante esses anos e pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste sonho.

RESUMO

A murcha bacteriana causada por espécies do complexo *Ralstonia solanacearum* é considerada uma das doenças mais destrutivas na agricultura mundial, devido à ampla distribuição geográfica, vasta gama de hospedeiros e difícil controle. O uso de variedades resistentes, principalmente porta-enxertos, é considerada uma medida eficiente de manejo da murcha bacteriana. No entanto, a quebra da resistência ocorre frequentemente devido à alta variabilidade genética e fenotípica encontrada dentro do complexo de espécies *R. solanacearum*. Diante disto, a diversidade genética de *Ralstonia solanacearum* (filotipo II) (55,3%) e *R. pseudosolanacearum* (filotipo I) (44,7%) foram analisados em um total de 103 isolados, obtidos de plantas sintomáticas de banana, berinjela, pimenta e tomate, nas mesorregiões do Agreste e Leste alagoano. Com base na genotipagem usando os marcadores REP, foi possível observar a presença de 11 linhas clonais dentre os 103 isolados analisados, destes, 22 isolados foram selecionados para o sequenciamento do gene *egl*. Na mesorregião do Agreste prevaleceu *R. solanacearum*, sendo detectada apenas isolados da sequevar IIA-6/35, que não amplificaram a banda de 220pb específica do sequevar 6 pelo Mmx-PCR. Na mesorregião Leste prevaleceu *R. pseudosolanacearum* (53,9%), sendo caracterizadas as sequevars I-17 e I-18. Vale salientar, que *R. solanacearum* também foi encontrada de forma significativa (46,1%) nesta mesorregião, sendo identificadas as sequevars IIA-36, IIA-41, IIA-53. Este é o primeiro trabalho que relata a diversidade do complexo de espécies *R. solanacearum* no estado de Alagoas, Região Nordeste, Brasil.

Palavras-chave: Murcha bacteriana; *R. pseudosolanacearum*; Sequevar.

ABSTRACT

The bacterial wilt caused by species of *Ralstonia solanacearum* complex is considered one of the most destructive diseases in world agriculture, due to its wide geographical distribution, extensive range of hosts and difficult control. The use of resistant varieties, mainly rootstocks, is considered an efficient measure to control of bacterial wilt. However, the breakdown of resistance occurs frequently due to the high genetic and phenotypic variability found within the *R. solanacearum* species complex. Therefore, the genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* (phylotype II) (55.3%) and *R. pseudosolanacearum* (phylotype I) (44.7%) were analyzed in a total of 103 isolates, obtained from symptomatic plants of banana, eggplant, pepper and tomato in the Agreste and Eastern mesoregions of the state of Alagoas, Brazil. Based on genotyping using REP markers, it was possible to observe the presence of 11 clonal lines among the 103 isolates analyzed, 22 of which were selected for sequencing of the *egl* gene. *R. solanacearum* prevailed in the Agreste mesoregion, where only isolates of sequevar IIA-6/35 were detected, which did not amplify the 220bp band specific to sequevar 6 by Mmx-PCR. *R. pseudosolanacearum* prevailed (53.9%) in the East mesoregion, with sequevars I-17 and I-18 being characterized. It is worth noting that *R. solanacearum* was also significantly found (46.1%) in this mesoregion, with the sequevars IIA-36, IIA-41, IIA-53 being identified. This is the first work that reports the diversity of the *R. solanacearum* species complex in the state of Alagoas, Northeast region, Brazil.

Keywords: Bacterial wilt; *R. pseudosolanacearum*; Sequevar.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) apresentando murcha generalizada; (B) Escurecimento dos vasos internos (xilema); (C) Teste do copo mostrando a exsudação bacteriana..... 15
- Figura 2.** (A) Murcha das folhas de bananeira; (B) Escurecimento dos vasos do xilema; (C) podridão seca dos frutos..... 17
- Figura 3.** Municípios do estado de Alagoas visitados no levantamento da murcha bacteriana em bananeira e solanáceas..... 46
- Figura 4.** Reconstrução filogenética baseada nas sequências parciais do gene da endoglucanase (*egl*) de haplótipos de *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* causadores de murcha bacteriana no Leste e Agreste do estado de Alagoas, Brasil..... 47
- Figura 5.** Reconstrução filogenética baseada nas sequências parciais do gene de reparo do DNA (*mutS*) de haplótipos de *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* causadores de murcha bacteriana no Leste e Agreste do estado de Alagoas, Brasil..... 48
- Figura 6.** Filotipo-Multiplex PCR (Pmx-PCR) dos isolados do complexo *Ralstonia solanacearum*..... 49
- Figura 7.** Moko-Multiplex PCR (Mmx-PCR) dos isolados do complexo *Ralstonia solanacearum*..... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> e <i>R. solanacearum</i> provenientes do estado de Alagoas, região Nordeste do Brasil.....	50
Tabela 2. Isolados de referência (Genbank) do complexo de espécies <i>Ralstonia solanacearum</i> utilizados neste estudo.....	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Murcha bacteriana.....	14
2.2 Moko da bananeira	16
2.3 Taxonomia e diversidade do complexo de espécies <i>Ralstonia solanacearum</i>	17
2.4 Epidemiologia	19
2.5 Manejo da murcha bacteriana	20
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
4 RESUMO	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1 Coleta e identificação dos isolados.....	31
5.2 Extração do DNA	31
5.3 Identificação de filotipo/espécie por Filotipo-multiplex PCR (Pmx-PCR).....	32
5.4 Identificação de sequevares associadas ao Moko por Moko-multiplex PCR (Mmx-PCR)	32
5.5 Genotipagem.....	33
5.6 Amplificação e sequenciamento parcial dos genes <i>egl</i> e <i>mutS</i>	33
5.7 Análises filogenéticas.....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1 Isolados bacterianos e identificação de filotipos/espécies/sequevares por Pmx-PCR e Mmx-PCR.....	35
6.2 Genotipagem.....	36
6.3 Análises filogenéticas dos genes <i>egl</i> e <i>mutS</i> e identificação das sequevares	36
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	46

1. INTRODUÇÃO GERAL

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. é considerada uma das doenças mais destrutivas na agricultura mundial, devido principalmente à ampla distribuição geográfica, difícil controle e vasta gama de hospedeiros (GENIN; DENNY, 2002). Dentre as 450 espécies de plantas hospedeiras afetadas, distribuídas em mais de 54 famílias botânicas (PRIOR et al., 2016), encontram-se membros de grande importância econômica, como tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), batateira (*Solanum tuberosum* L.) e Bananeira (*Musa* sp. L.) (LOPES; ROSSATO, 2018).

Para causar murcha em seus hospedeiros sintomáticos, *R. solanacearum* coloniza os vasos condutores de água e sais minerais (xilema), penetrando através de ferimentos nas raízes, causando a obstrução dos mesmos. Assim, o fluxo de seiva é bloqueado, impedindo o suprimento adequado de água e nutrientes à parte aérea da planta (HIKICHI et al., 2007; AMORIM et al., 2011). É possível observar o escurecimento dos vasos do xilema em decorrência do transporte de substâncias resultantes da oxidação de fenóis, que originam compostos do tipo melanina (LOPES, 2009).

Ralstonia solanacearum era dividida em cinco raças, com base na patogenicidade a diferentes hospedeiros (BUDDENHAGEN et al., 1962) e em seis biovars, de acordo com o perfil de utilização de diferentes açúcares e álcoois. Contudo, devido as grandes diferenças genéticas e fenotípicas encontradas entre os isolados, *R. solanacearum* foi considerada um complexo de espécies (FEGAN; PRIOR, 2005), o qual é definido como um grupo de isolados relacionados cujos membros individuais podem representar mais de uma espécie. Dentro deste complexo também estavam incluídas as espécies *Ralstonia syzigii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al., agente causal da “doença de Sumatra do cravo da Índia” de ocorrência em Java e Sumatra e ‘Blood disease bacterium’ (BDB) que ocorre na Indonésia (FEGAN; PRIOR, 2005).

Em 2005, Fegan e Prior propuseram um novo sistema de classificação que refletia a diversidade conhecida do complexo *R. solanacearum*, com base na análise filogenética de sequências da região espaçadora intergênica (ITS) do rDNA e dos genes Proteína regulatória *hrpB*, endoglucanase (*egl*) e DNA repair (*mutS*), distribuindo os isolados em quatro grupos monofiléticos denominados de filotipos. No filotipo I foram incluídos todos os isolados inicialmente oriundos da Ásia, no filotipo II os das Américas, no filotipo III os da África e

oceano Índico e no filotipo IV os da Indonésia (FEGAN; PRIOR, 2005). Dentro de cada filotipo foram determinados as sequevares, as quais são definidas com base no sequenciamento do gene da endoglucanase (*egl*) (FEGAN; PRIOR, 2005).

Mais recentemente, baseado na análise de sequência multilocus (MLSA) o complexo de espécies *R. solanacearum* foi subdividido em oito clados, sendo os filotipos I e III compostos por apenas um clado cada (1 e 6), o filotipo II formado por quatro clados (filotipo IIA: clados 2 e 3; filotipo IIB: clados 4 e 5) e o filotipo IV compreendido por dois clados (7 e 8). Vale salientar que os isolados de BDB e *R. syzygii* estão incluídos nos clados 7 e 8, respectivamente (WICKER et al., 2012).

Safni et al. (2014) propôs uma reclassificação do complexo de espécies *R. solanacearum* em três espécies, sendo *R. pseudosolanacearum* sp. n. Safni et al. constituída pelos isolados pertencentes aos filotipos I e III, *R. solanacearum* compreendida pelos isolados do filotipo II e *R. syzygii* pelos isolados do filotipo IV. É importante ressaltar que *R. syzygii* foi subdividida em três subespécies, sendo elas: *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov. Safni et al., *R. syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov. Safni et al. e *R. syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. Safni et al.

O Brasil representa um antigo centro de diversidade de *R. solanacearum* (Filotipo II), devido sua grande diversidade de plantas e extensão territorial, o que garante uma alta variabilidade genotípica a esta fitobactéria (SANTIAGO et al., 2017). Mesmo com uma grande quantidade de dados de sequências, compreender e explicar a extensão da diversidade e distribuição desse fitopatógeno, continua sendo uma tarefa desafiadora e extremamente importante para o controle genético da murcha bacteriana (WICKER et al., 2012).

O melhoramento para a resistência à murcha bacteriana é considerado uma medida eficiente de manejo. No entanto, a quebra da resistência ocorre frequentemente devido a alta variabilidade genética e fenotípica dentro do complexo de espécies *R. solanacearum* (TOUKAM et al., 2009). Sendo assim, o conhecimento da diversidade local destas fitobactérias é fundamental para a adequação de medidas de manejo ou para o desenvolvimento de novas estratégias baseadas na resistência de plantas. Diante disto, o objetivo deste estudo foi caracterizar a diversidade do complexo *R. solanacearum* nas mesorregiões do Leste e Agreste Alagoano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Murcha bacteriana

A murcha bacteriana causada por espécies do complexo *R. solanacearum*, apresenta distribuição mundial, sendo considerada uma das doenças mais destrutivas do mundo. O patógeno possui ampla gama de hospedeiros, podendo infectar aproximadamente 450 espécies de plantas distribuídas em 54 famílias botânicas distintas (GENIN; DENNY, 2002; WICKER et al., 2007; PRIOR et al., 2016). É uma das principais doenças das solanáceas, sendo um fator limitante à produção principalmente durante os verões chuvosos. A bactéria causadora da doença pode sobreviver no solo por muitos anos, inviabilizando o cultivo dos seus hospedeiros (LOPES, 2009). Os prejuízos causados pela murcha bacteriana podem chegar até 100%, principalmente quando ocorrem alta temperatura e pluviosidade (LOPES; DUVAL, 2007). Na cultura da batata a murcha bacteriana é considerada uma das doenças mais importantes, podendo levar a perdas de até 50% da produção quando não se utiliza batata-semente certificada (MARIANO et al., 2001).

A murcha bacteriana foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos da América, por Erwin F. Smith em 1896, em plantas de batata, tomate e berinjela (HAYWARD, 1994). No Brasil, os primeiros relatos desta doença foram em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e em batata, no estado do Rio Grande do Sul em 1922 (TAKATSU; LOPES, 1997), porém o primeiro registro oficial da doença no país, ocorreu no ano de 1976 no estado do Pará (TOKESHI; DUARTE, 1976). Em Alagoas *R. solanacearum* foi relatada pela primeira vez em 1987 no município de Igreja Nova, em plantações de banana causando o Moko da bananeira. No ano 2000 foi relatado um novo foco no mesmo município e até hoje, apesar das medidas de erradicação tomadas, novos focos da doença vêm sendo confirmados (ANDRADE et al., 2009).

Essa bactéria se aloja nos vasos condutores de água e sais minerais (xilema), onde se multiplica vigorosamente após a penetração através de ferimentos nas raízes, causando a obstrução dos mesmos devido ao acúmulo de exopolissacarídeos (EPS), que é considerado o principal fator de virulência desse patógeno. Assim o fluxo de seiva é bloqueado, impedindo o suprimento adequado de água e nutrientes a parte aérea da planta, ocasionando por conseguinte a murcha da mesma, começando pelo topo (HIKICHI et al., 2007; AMORIM et

al., 2011). O sintoma de murcha ocorre nas horas mais quentes do dia, podendo a planta se recuperar à noite, no entanto, com o passar do tempo, a murcha ocorre de forma irreversível (LOPES; ROSSATO, 2013) (Fig. 1A). Outros fatores que podem estar associados com a virulência são a motilidade pelos flagelos (KANG et al., 2002; TANS-KERSTEN et al., 2004) e secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares que degradam os tecidos vegetais, tais como: β -1,3-endoglucanase (*egl*), exoglucanase (*ChbA*), endopoligalacturonase (*PehA* o *PglA*), exopoligalacturonases (*PehB* e *PehC*) e pectinmetilesterase (*Pme*) (GABRIEL et al., 2006; LIU et al., 2005). Além dos fatores supracitados, também é de suma importância para o processo infeccioso o sistema de secreção tipo III (T3SS), codificado pelos genes *hrp* (GENIN; BOUCHER, 2004), atuando em conjunto com proteínas efetoras secretadas dentro da célula hospedeira, as quais alteram as funções das células e o sistema de defesa da planta (ALFANO; COLLMER, 2004).

Ao se fazer um corte transversal ou longitudinal no caule da planta, é possível observar o escurecimento dos vasos do xilema em decorrência ao transporte de substâncias resultantes da oxidação de fenóis, que originam compostos do tipo melanina (Fig. 1B). Um método rápido e prático para detecção dessa bactéria em campo é o teste do copo, onde um pequeno fragmento do tecido da planta com escurecimento, é colocado em contato com água. A presença do exsudado bacteriano indica colonização dos vasos do xilema (AMORIM et al., 2011) (Fig. 1C). Embora esses sintomas variem de acordo com o hospedeiro, isolado, condições ambientais e se manifestem em diferentes estágios de desenvolvimento da planta, a murcha bacteriana ocorre mais comumente durante o florescimento das mesmas (ELPHINSTONE, 2005; LOPES, 2009). Sintomas secundários associados à murcha bacteriana são raquitismo, epinastia foliar e emissão de raízes adventícias (ALVAREZ et al., 2010).

Figura 1: (A) Planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) apresentando murcha generalizada; (B) Escurecimento dos vasos internos (xilema); (C) Teste do copo mostrando a exsudação bacteriana.

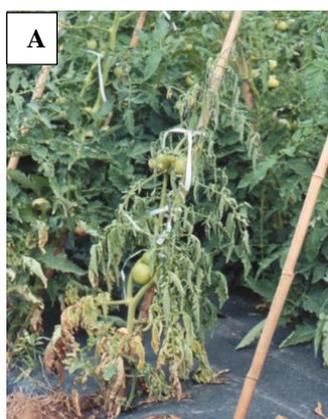


Foto: Carlos Lopes



Foto: Greecy M. R. Albuquerque



Foto: Embrapa hortaliças

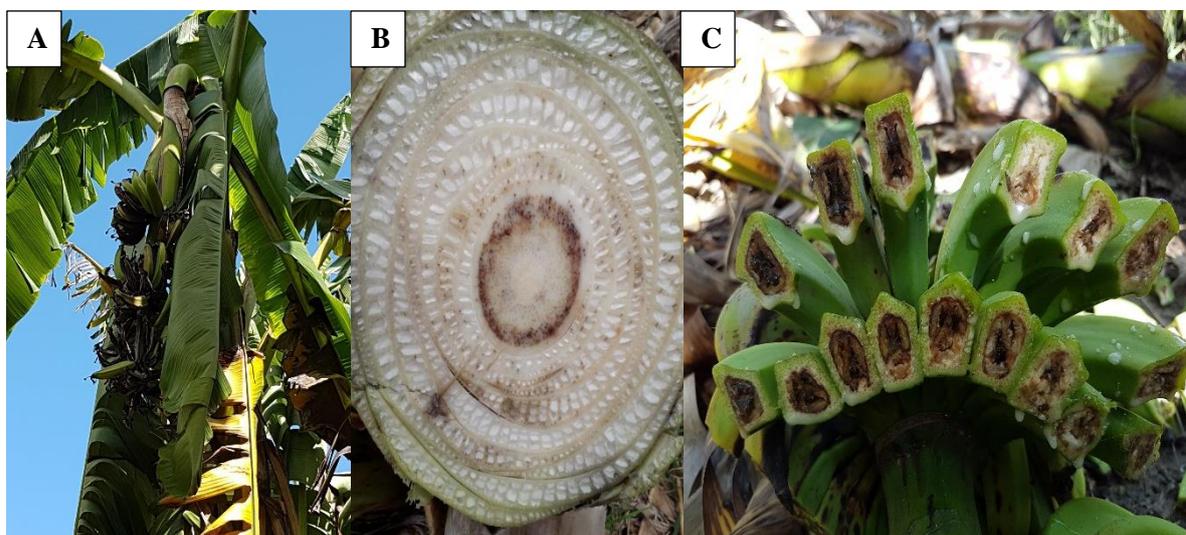
2.2 Moko da bananeira

Na cultura da banana (*Musa spp.*), a bactéria esta associada ao Moko da bananeira, sendo considerada uma praga quarentenária presente (A2) no Brasil, restrita aos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Pernambuco e Sergipe (MAPA – Instrução Normativa Nº 52 de 20/11/2007). Isolados causadores da doença são caracterizados como pertencentes à raça 2, biovar 1 (HAYWARD, 1994), filotipos IIA e IIB e sequevares IIA-6, IIA-24, IIA-41, IIA-53, IIB-3, IIB-4 e IIB-25 (FEGAN; PRIOR, 2006; CELLIER; PRIOR, 2010; ALBUQUERQUE et al., 2014).

Os primeiros relatos do Moko surgiram na Guiana por volta de 1840. No Brasil, o primeiro relato da doença foi no Território do Amapá. Em seguida novos focos da doença surgiram em outros estados do Norte e Nordeste do país (ZAMBOLIM et al., 2002; COELHO NETO et al., 2003). No Nordeste, o Moko já foi descrito nos estados da Paraíba, Ceará, Alagoas, Sergipe e Pernambuco (PONTES; FREIRE, 1972; TAKATSU, 2001; ANDRADE et al., 2009).

O sintoma típico do Moko da bananeira é a murcha das folhas, iniciando pelas centrais e evoluindo para as demais, estas folhas podem se curvar dorsalmente causando a quebra do pecíolo. As folhas mais velhas são as últimas a sucumbirem (Fig. 2A). A descoloração vascular dos vasos xilemáticos concentra-se no centro do pseudocaule (Fig. 2B). Os frutos apresentam deformação e podridão seca (Fig. 2C) (ALBUQUERQUE et al., 2014). No estado de Sergipe, região Nordeste do Brasil, ocorrem sintomas atípicos, com a infecção iniciando através da inflorescência, sendo transmitida por insetos visitantes de inflorescência de plantas infectadas e em contato com o exsudado bacteriano, dissemina-o para outras plantas, provocando sintomas como a podridão seca e o amadurecimento prematuro dos frutos. A bactéria se move em direção ao pseudocaule causando o escurecimento dos feixes vasculares, semelhante ao Bugtok que ocorre nas Filipinas (ALBUQUERQUE et al., 2014). Sintomas de escurecimento dos vasos também são observados nas ráquis, engaço e raramente no rizoma (GONDIM; CAVALCANTE, 2001).

Figura 2: (A) Murcha das folhas de bananeira; (B) Escurecimento dos vasos mais internos do xilema; (C) podridão seca dos frutos.



2.3 Taxonomia e diversidade do complexo de espécies *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum é uma bactéria Gram-negativa, pertencente ao domínio Bacteria, reino Procariotae, filo Proteobacteria, classe β -proteobacteria, família Burkholderiaceae (EUZÉBY, 2013), sendo considerada por Kado (2010) como pertencente a família Ralstoniaceae.

A nomenclatura de *R. solanacearum* tem sofrido grandes mudanças, sendo descrita pela primeira vez como *Bacillus solanacearum* (SMITH, 1896). Em seguida, essa bactéria foi classificada como *Bacterium solanacearum* (CHESTER, 1898), *Pseudomonas solanacearum* [(SMITH, 1896) SMITH, 1914], *Phytomonas solanacearum* [(SMITH, 1896) BERGEY et al., 1923], *Burkholderia solanacearum* [(SMITH, 1896) YABUUCHI et al., 1992] e por fim, incluída no gênero *Ralstonia* [(SMITH, 1896) comb. nov. YABUUCHI et al., 1995] com validação pública em 1996 (YABUUCHI et al., 1996). Devido as grandes diferenças genéticas e fenotípicas encontradas entre os isolados, *R. solanacearum* foi considerada um complexo de espécies (FEGAN; PRIOR, 2005). Gillings e Fahy foram quem primeiro atribuíram o termo “Complexo de espécies” a *R. solanacearum* (GILLINGS; FAHY, 1994), que incluíam também *Ralstonia syzigii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al., agente causal do mal de Sumatra do cravo da Índia em Java e Sumatra e o “Blood disease bacterium” (BDB), pois eram organismos intimamente relacionados a *R. solanacearum* e se enquadraram neste complexo (TAGHAVI et al., 1996; FEGAN; PRIOR, 2005).

Tradicionalmente *R. solanacearum* era dividida em cinco raças, com base na patogenicidade a diferentes hospedeiros (BUDDENHAGEN et al., 1962) e em seis biovars, de acordo com o perfil de utilização de diferentes açúcares (lactose, maltose, celobiose e trealose) e álcoois (manitol, sorbitol, dulcitol e inositol) (HAYWARD, 1964; HE et al., 1983). No entanto, esses termos estão em desuso, por não expressarem a real diversidade genética entre os isolados desse complexo (PINHEIRO et al., 2011).

Em 2005, Fegan e Prior propuseram um novo sistema de classificação com base na análise filogenética de sequências da região ITS do rDNA e dos genes *hrpB*, *egl* e *mutS*, distribuindo os isolados em quatro grandes grupos monofiléticos denominados de filotipos. No filotipo I foram incluídos todos os isolados inicialmente oriundos da Ásia, no filotipo II os das Américas, no filotipo III os da África e oceano Índico e no filotipo IV os da Indonésia (FEGAN; PRIOR, 2005).

Dentro de cada filotipo foram determinadas as sequevares, as quais são definidas com base no sequenciamento parcial do gene da endoglucanase. Por definição cada sequevar só pode ser considerada diferente, quando a divergência nucleotídica do gene *egl* for maior que 1% (FEGAN; PRIOR, 2005). Atualmente já foram descritas mais de 63 sequevares (SILVA, 2014).

Mais recentemente, baseado na análise de sequência multilocus (MLSA) o complexo de espécies *R. solanacearum* foi subdividido em oito clados, sendo os filotipos I e III compostos por apenas um clado cada (1 e 6), o filotipo II formado por quatro clados (filotipo IIA: clados 2 e 3; filotipo IIB: clados 4 e 5) e o filotipo IV compreendido por dois clados (7 e 8). Vale salientar que os isolados de BDB e *R. syzygii* estão incluídos nos clados 7 e 8, respectivamente (WICKER et al., 2012).

Safni et al. (2014) propôs uma reclassificação do complexo de espécies *R. solanacearum* em três espécies, sendo *R. pseudosolanacearum* sp. n. Safni et al. constituída pelos isolados pertencentes aos filotipos I e III, *R. solanacearum* compreendida pelos os isolados do filotipo II e *R. syzygii* pelos isolados do filotipo IV. É importante ressaltar que *R. syzygii* foi subdividida em três subespécies, sendo elas: *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov. Safni et al., *R. syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov. Safni et al. e *R. syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. Safni et al. Essa recente divisão do complexo também foi apoiada por Prior et al. (2016) que através do estudo do genoma e no perfil de proteoma de 29 e 73 isolados,

respectivamente, evidenciaram a diferenciação entre os isolados dos filotipos II e IV e a proximidade entre os isolados dos filotipos I e III.

Na América do Sul a diversidade de *R. solanacearum* foi estudada na Venezuela (GARCÍA et al., 1999), Colômbia (CARDOZO et al., 2009), Uruguai (SIRI et al., 2011), Guiana Francesa (DEBERDT et al., 2014), Brasil (PINHEIRO et al., 2011; SANTANA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012; GARCIA et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2014; SANTIAGO et al., 2014), Martinica (WICKER et al., 2007), Trinidad e Tobago (RAMSUBHAG et al., 2012) e Peru (GUTARRA et al., 2017).

Ralstonia spp. apresenta uma elevada diversidade de fenótipos e genótipos, adaptados a uma ampla gama de hospedeiros e condições climáticas. Eventos de mutação, migração, recombinação e seleção na população são responsáveis por gerar variabilidade nessas fitobactérias no Brasil, sendo a mutação o principal deles (SANTIAGO, 2017).

Em estudos da diversidade do complexo de espécie *R. solanacearum* no Brasil, foi possível observar a presença das sequevares (I-18, I-31, IIA-6, IIA-7, IIA-24, IIA-25, IIA-35, IIA-36, IIA-41, IIA-50, IIA-53, IIB-1, IIB-2, IIB-4, IIB-25, IIB-27, IIB-28, IIB-54, IIB-55, IIB-56 e IIB-57), sendo que a IIB-54 esta presente apenas no Sul do País (RODRIGUES et al., 2012; ALBUQUERQUE et al., 2014; SANTIAGO et al., 2017). Silva (2014) caracterizando a diversidade de *Ralstonia* sp. no estado de Pernambuco verificou a presença da sequevar I-17 no país e descreveu duas novas sequevares no filotipo IIA, ampliando a diversidade conhecida da bactéria no Brasil e no mundo.

O Brasil representa o centro de origem e diversidade de *R. solanacearum* (filotipo II), o que garante uma alta variabilidade genotípica a esta fitobactéria (SANTIAGO et al., 2017). Mesmo com uma grande quantidade de dados de sequências, compreender e explicar a extensão da diversidade e distribuição desses fitopatógenos continua sendo uma tarefa desafiadora e extremamente importante para o manejo da murcha bacteriana (WICKER et al., 2012).

2.4 Epidemiologia

Ralstonia solanacearum possui uma ampla gama de hospedeiros, sendo considerada uma bactéria endêmica em regiões tropicais e subtropicais, podendo sobreviver no solo saprofiticamente por vários anos (GENIN; BOUCHER, 2002). Após a percepção de moléculas sinais, contidas nos exsudatos radiculares, a bactéria se move em direção às raízes através de flagelos. A adesão às superfícies radiculares, bem como a colonização nas zonas de

alongamento da raiz, se dá através de pili e lipossacarídeos (ALVAREZ et al., 2010). A bactéria penetra através de ferimentos nas raízes do hospedeiro, ocasionados por insetos, nematoides, práticas culturais, ressecamento do solo e ferimentos naturais causados pelo alongamento das raízes e outros fatores ambientais (ALVAREZ et al., 2010).

Além de sobreviver por longos períodos no solo, esta bactéria também sobrevive na água, em restos culturais e nas raízes e rizosferas de plantas hospedeiras e invasoras (GRANADA; SEQUEIRA, 1983; SEQUEIRA, 1993; WENNEKER et al., 1999; MIRANDA et al., 2004; COUTINHO, 2005). Fatores abióticos como temperatura, pH, umidade e tipo de solo e bióticos, tais como, presença e atividade de organismos predadores, antagonistas e/ou competidores, influenciam na sobrevivência da bactéria no solo (VAN VEEN et al., 1997).

A ampla capacidade saprofítica desta fitobactéria decorre da grande versatilidade no uso de compostos orgânicos como fonte de energia, tais como açúcares, ácidos graxos e compostos aromáticos, além de possuir a habilidade de entrar em fase hipobiótica (GENIN; BOUCHER, 2002).

A disseminação à longa distância ocorre através do transporte de propágulos infectados de uma região para outra. Além disso, *R. solanacearum* pode sobreviver de forma latente em material de propagação, ocasionando a introdução deste patógeno em novas áreas (WICKER et al., 2012; SHUTT et al., 2018). A disseminação a curta distância é favorecida pela movimentação de solo nas práticas agrícolas, escoamento superficial da água de irrigação ou chuva, movimentação de máquinas agrícolas, bem como de pessoas e animais entre uma área contaminada e outra que ainda não possui foco da doença (SILVA, 2014).

Altas temperaturas e umidade do solo, favorecem a murcha bacteriana, por isso, a doença ocorre com maior intensidade nos plantios de verão chuvoso, já os plantios conduzidos sob baixas temperaturas podem escapar da doença, mesmo com a bactéria presente no solo (LOPES, 2009). Plantios sucessivos em áreas de cultivo protegido favorecem o incremento da incidência da doença, tendo em vista que tal prática favorece um aumento da população bacteriana no solo (LOPES, 2009).

2.5 Manejo da murcha bacteriana

Após o estabelecimento da doença no campo, seu manejo torna-se ainda mais complicado, nenhuma medida isolada é suficiente, sendo necessário a adoção do manejo integrado, observando as várias medidas preventivas e complementares de controle, evitando assim,

perdas significativas quando as condições ambientais forem favoráveis a doença (LOPES, 2009).

Algumas medidas preventivas podem ser adotadas como, por exemplo a escolha da área de plantio, evitando terrenos com histórico da doença, evitar terrenos de baixadas com solos muito argilosos e sujeitos ao encharcamento, já que o acúmulo de água favorece a sobrevivência da bactéria. Outra prática recomendada e altamente efetiva é a rotação de culturas por um período de dois a três anos com gramíneas. As principais medidas de manejo recomendadas são: Eliminação de plantas doentes, voluntárias e invasoras, evitar ferimentos causados por nematoides, insetos e implementos agrícolas e movimentação de pessoas, máquinas e implementos dentro da lavoura a partir do momento que forem detectados focos da doença. A solarização por dois a três meses reduz significativamente a população da bactéria no solo (LOPES, 2009; LOPES; QUEZADO SOARES, 1997).

O controle químico não é viável, pois a bactéria possui uma ampla gama de hospedeiros, alta variabilidade genética e capacidade de sobreviver no solo por longos períodos a grandes profundidades, além disso esses produtos são altamente prejudiciais ao homem e causam danos ao meio ambiente (LOPES, 1994). As pesquisas sobre o controle da murcha bacteriana através da utilização de produtos alternativos, em substituição aos convencionais, tem aumentado devido a essas consequências (VERZIGNASSI et al., 2003).

O método de controle mais efetivo e duradouro da murcha bacteriana é o uso de variedades resistentes, porém existem no mercado poucas cultivares comerciais de tomateiro resistente a doença, mesmo essa busca sendo prioridade nos programas de melhoramento (LOPES, 1994; WICKER et al., 2007). O melhoramento genético visando a obtenção de linhagens resistentes a isolados de *Ralstonia* spp. deve ser regional ou relacionado a condições climáticas (HAYWARD, 1992). No Brasil, esses estudos precisam incluir tanto isolados de *R. solanacearum* como de *R. pseudosolanacearum*, tendo em vista que ambas as espécies se encontram distribuídas por todo território nacional (GARCIA et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2016; SANTIAGO et al., 2017).

O melhoramento para a resistência à murcha bacteriana é considerado uma medida eficiente de controle. No entanto, a quebra da resistência ocorre frequentemente devido a alta variabilidade genética e fenotípica dentro do complexo de espécies *R. solanacearum* (TOUKAM et al., 2009). Por exemplo, linhagens de tomateiro consideradas resistentes à murcha bacteriana em uma determinada área geográfica, poderão ser suscetíveis em outra área

devido a variações das populações do patógeno ali existente. Portanto, a eficiência da resistência genética é altamente dependente da interação entre hospedeiro, patógeno e condições ambientais.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, G. M. R. et al. First Report of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* on *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n. 11, p. 2319-2319, 2016.
- ALBUQUERQUE, G. M. R. et al. Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II. **Phytopathology**, St. Paul, v. 104, n. 11, p. 1175-1182, 2014.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, n. 3, p. 385-414, 2004.
- ALVAREZ, B. E. G.; LOPEZ, M. M. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, v. 1, p. 267-279, 2010.
- AMORIM, L.; REZENDE, M. A. J.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Agronômica Ceres, v.1, 2011. 704 p.
- ANDRADE, F. W. R. et al. Ocorrência de doenças em bananeiras no Estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 305-309, 2009.
- BERGEY, D. H. (Ed.). **Manual of systematic bacteriology: the Proteobacteria**. 1 ed. New York, Springer-Verlag, v. 2, 1923. 442p.
- BUDDENHAGEN, I.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 52, p. 726, 1962.
- CARDOZO, C.; RODRÍGUEZ, P.; MARÍN M. Caracterización molecular del complejo de especies *Ralstonia solanacearum* en la zona bananera de Urabá. **Agronomía Colombiana**, v. 27, p. 203-210, 2009.
- CELLIER, G.; PRIOR, P. Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, n. 11, p. 1250-1261, 2010.
- COELHO NETO, R. A. et al. Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme, no Estado do Amazonas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 362-366, 2003.

COUTINHO, T. A. Introduction and prospectus on the survival of *Ralstonia solanacearum*. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. 2 ed. APS Press, St. Paul, p. 29-38, 2005.

DEBERDT, P. et al. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands knowledge of the “emerging ecotype”. **Phytopathology**, St. Paul, v. 104, n. 6, p. 586-596, 2014.

ELPHINSTONE, J. G. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex**. Saint Paul, APS Press, v. 1, p. 9-28, 2005.

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2013. Disponível em: < <http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>>. Acesso em: 05 Fev. 2020.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. 2 ed. APS Press, St. Paul, p. 449-461, 2005.

FEGAN, M.; PRIOR, P. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. **Australasian Plant Pathology**, Orange, v. 35, n. 1, p. 93-101, 2006.

GABRIEL, D. W. et al. Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 19, n. 1, p. 69-79, 2006.

GARCIA, A. L. et al. Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt bell pepper in the state of Pernambuco, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 95, n. 2, p. 237-245, 2013.

GARCÍA, R.; GARCÍA, A.; DELGADO, L. Distribucion, incidencia y variabilidad de *Ralstonia solanacearum*, agente causal de la marchitez bacteriana de la papa en el estado Mérida. **Bioagro**, v. 11, n. 1, p. 12-23, 1999.

GENIN, S.; BOUCHER, C. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, n. 1, p. 107-134, 2004.

GENIN, S.; BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 3, p. 111-118, 2002.

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

GONDIM, T. M. S.; CAVALCANTE, M. J. B. Como produzir banana. Rio Branco. **Embrapa Acre**, 2001. 31p. (Embrapa Acre. Documentos, 44).

- GRANADA, G. A.; SEQUEIRA, L. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. **Canadian Journal Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 433-440, 1983.
- HAYWARD, A. C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 27, n. 2, p. 265-277, 1964.
- HAYWARD, A. C. et al. Tropical variant of biovar 2 of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 608, 1992.
- HAYWARD, A. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.). **Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford, UK, CAB International, p. 9-24, 1994.
- HE, L. Y.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, v. 67, n. 12, p. 1357-1361, 1983.
- HIKICHI, Y. et al. Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 24, n. 1, p. 149-154, 2007.
- KADO, C. **Plant bacteriology**. St. Paul, APS Press, 2010. 336 p.
- KANG, Y. et al. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 46, n. 4, p. 427-437, 2002.
- LIU, H. et al. Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, n. 12, p. 1296-1305, 2005.
- LOPES, C. A. **Murcha Bacteriana ou Murchadeira** - Uma Inimiga do tomateiro em climas quentes. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2009. 8 p. (Circular Técnica, 67).
- LOPES, C. A. Situação da murcha bacteriana da batata no Brasil. In: LOPES, C. A.; ESPINOZA, N. R. (Eds.). **Enfermedades bacterianas de la Papa: Memorias del taller sobre enfermedades bacterianas de la Papa**. Lima: Centro Internacional de la Papa, p. 7-9, 1994.
- LOPES, C. A.; DUVAL, A. M. Q. Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças. In: ZAMBOLIM, L.; LOPES, C. A.; PICANÇO, M. C.; COSTA, H. (Eds.). **Manejo Integrado de Doenças e Pragas**. Viçosa, UFV, v. 1, p. 115-162, 2007.
- LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa-Serviço de Produção de Informação, 1997. 70 p.
- LOPES, C. A.; ROSSATO, M. **Diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro**. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2013. 10 p. (Circular Técnica, 92).
- LOPES, C. A.; ROSSATO, M. History and status of selected hosts of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex causing bacterial wilt in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

- MARIANO, R. L. R. et al. Diagnose e manejo de fitobacterioses de fitobacterioses de importância para o Nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. UFRPE, Recife, Imprensa Universitária, 2001. 368 p.
- MIRANDA, E. F. O.; TAKATSU, A.; UESUGI, C.H. Colonização de raízes de plantas daninhas cultivadas in vitro e em vasos por *Ralstonia solanacearum*, biovars 1, 2 e 3. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 121-127, 2004.
- PINHEIRO, C. R. et al. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto a filotipos e sequevares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 6, p. 593-602, 2011.
- PONTES, J. J.; FREIRE, F. O. C. “Moko Disease” da bananeira nos perímetros irrigados do Nordeste. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 5, n. 2, p. 191-195, 1972.
- PRIOR, P. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC Genomics**, London, v. 17, n. 1, p. 90, 2016.
- RAMSUBHAG, A. et al. Wide genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains affecting tomato in Trinidad, West Indies. **Plant Pathology**, Bari, v. 61, n. 5, p. 844-857, 2012.
- SAFNI, I. et al. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. e *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 64, n. 9, p. 3087-3103, 2014.
- SANTANA, B. G. et al. Diversity of Brazilian biovar 2 strains of *Ralstonia solanacearum*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 78, n. 3, p. 190-200, 2012.
- SANTIAGO, T. R. et al. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. **Plant Pathology**, Bari, v. 66, n. 3, p. 383-392, 2017.
- SEQUEIRA, L. Bacterial wilt: past, present, and future. In: Aciar Proceedings. **Australian Centre for International Agricultural Research**, p. 12-12, 1993.
- SHUTT, V. M. et al. Characterization of *Ralstonia* strains infecting tomato plants in South Africa. **Crop Protection**, v. 112, p. 56-62, 2018.
- SILVA, J. R. **Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões Norte e Nordeste do Brasil**. 2014. 48f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

SIRI, M. I.; SANABRIA, A.; PIANZZOLA, M. J. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. **Plant Disease**, St. Paul, v. 95, n. 10, p. 1292-1301, 2011.

SMITH, E. F. (Ed.). **Bacteria in relation to plant disease**. Washington, Carnegie Institution, v. 1, 1914. 309p.

SMITH, E. F. A bacterial disease of tomato, pepper, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.). **United States Department of Agriculture**: Division of Vegetable Physiology and Pathology. Bulletin, v. 12, n. 1, p. 1-28, 1896.

TAGHAVI, M. et al. 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 and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 46, n. 1, p. 10-15, 1996.

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

TAKATSU, A. Moko da bananeira no Brasil. In: Simpósio brasileiro de bananicultura. **FUNEP**, Jaboticabal, p. 439-452, 2001.

TANS-KERSTEN, J. K.; BROWN, D. Y.; ALLEN, C. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v. 17, n. 6, p. 686-695, 2004.

TOKESHI, H.; DUARTE, M. L. R. Moko da bananeira no território Federal do Amapá. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 2, n. 3, p. 224-229, 1976.

TOUKAM, G. M. S. et al. Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. **Plant Disease**, v. 93, n. 11, p. 1123-1130, 2009.

VAN VEEN, B. D. et al. Localization of brain electrical activity via linearly constrained minimum variance spatial filtering. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, New York, v. 44, n. 9, p. 867-880, 1997.

VERZIGNASSI, J.R.; VIDA, J.B.; TESSMANN D.J. Epidemia de mancha de corinespora em pepino “tipo japonês” sob cultivo protegido na Região Norte de Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 570-570, 2003.

WENNEKER, M. et al. *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**, v. 105, n. 3, p. 307-315, 1999.

WICKER, E. et al. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. **The ISME Journal**, v. 6, n. 5, p. 961-974, 2012.

WICKER, E. et al. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n. 21, p. 6790-6801, 2007.

YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E. et al. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995.

ZAMBOLIM, L. (Org.). **Manejo integrado de doenças e pragas: fruteiras tropicais**. Viçosa-MG, p. 279-352, 2002.

Diversidade do complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* no estado de Alagoas, Brasil

Yolanda de Melo de Oliveira¹; Iraildes Pereira Assunção¹; Gaus Silvestre de Andrade Lima¹; Samário Lino dos Santos¹; Lilia Costa Carvalhais²; Elineide Barbosa de Souza³; Adriano Márcio Freire Silva¹.

¹ Campus de Engenharia e Ciências Agrárias (CECA) – Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió - Alagoas;

² Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation, Center for Horticultural Science, Ecosciences Precinct, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia;

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia e Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife - Pernambuco.

Autor para correspondência: Adriano Márcio Freire Silva. E-mail: adrianomfsilva@yahoo.com.br

4 RESUMO

A diversidade genética de *Ralstonia solanacearum* (filotipo II) (55,3%) e *R. pseudosolanacearum* (filotipo I) (44,7%) foram analisados em um total de 103 isolados, obtidos de plantas sintomáticas de banana, berinjela, pimenta e tomate, nas mesorregiões do Agreste e Leste alagoano. Com base na genotipagem usando os marcadores REP foi possível observar a presença de 11 linhas clonais dentre os 103 isolados analisados, destes, 22 isolados foram selecionados para o sequenciamento parcial do gene *egl*. Na mesorregião do Agreste prevaleceu *R. solanacearum*, sendo detectada apenas isolados da sequevar IIA-6/35, que não amplificaram a banda de 220pb específica da sequevar 6 pelo Mmx-PCR. Na mesorregião Leste prevaleceu *R. pseudosolanacearum* (53,9%) sendo detectadas as sequevares I-17 e I-18. Vale salientar, que *R. solanacearum* também foi encontrada de forma significativa (46,1%)

nesta mesorregião, sendo identificadas as sequevares IIA-36, IIA-41, IIA-53. Este é o primeiro trabalho que relata a diversidade do complexo de espécies *R. solanacearum* no estado de Alagoas, Nordeste, Brasil.

Palavras-chave: Murcha bacteriana; *R. pseudosolanacearum*; Sequevar.

A murcha bacteriana causada por espécies do complexo *Ralstonia solanacearum*, apresenta uma distribuição mundial, sendo considerada uma das doenças mais destrutivas do mundo em solanáceas. O patógeno possui uma ampla gama de hospedeiro, podendo infectar aproximadamente 450 espécies de plantas distribuídas em 54 famílias botânicas distintas, entre monocotiledôneas e dicotiledôneas (Wicker et al., 2007).

A murcha bacteriana foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos da América, por Erwin F. Smith em 1896, em plantas de batata, tomate e berinjela (Hayward, 1994). No Brasil, os primeiros relatos de murcha bacteriana foram em tabaco e em batata, no estado do Rio Grande do Sul em 1922 (Takatsu; Lopes, 1997), porém o primeiro registro oficial da doença no país, ocorreu no ano de 1976 no estado do Pará (Tokeshi; Duarte, 1976). No estado de Alagoas, Região Nordeste do Brasil, *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. foi relatada pela primeira vez em 1987 no município de Igreja Nova em plantações de banana, causando o Moko da bananeira. No ano 2000 foi relatado um novo foco no mesmo município e apesar das medidas de erradicação adotadas, novos focos da doença vêm sendo confirmados (Andrade et al., 2009).

Devido as grandes diferenças genéticas e fenotípicas encontradas entre os isolados, *R. solanacearum* foi considerada um complexo de espécies (Fegan; Prior, 2005). Tradicionalmente é dividida em cinco raças, com base na patogenicidade a diferentes hospedeiros (Buddenhagen et al., 1962) e em seis biovares, de acordo com a capacidade de

utilizar diferentes açúcares e álcoois (Hayward, 1964). No entanto esses termos estão em desuso, por não expressarem a real diversidade genética entre os isolados desse complexo (Pinheiro et al., 2011).

Em 2005, Fegan e Prior propuseram um novo sistema de classificação com base na análise filogenética de sequências da região intergênica espaçadora (ITS) do rDNA e dos genes *hrpB*, endoglucanase (*egl*) e DNA repair (*mutS*), distribuindo os isolados em quatro grandes grupos denominados de filotipos. No filotipo I foram incluídos os isolados oriundos da Ásia, no filotipo II os das Américas, no filotipo III os da África e oceano Índico e no filotipo IV os da Indonésia (Fegan; Prior, 2005). Dentro de cada filotipo foram determinadas as sequevares, as quais são definidas com base no sequenciamento do gene da endoglucanase (*egl*). Por definição cada sequevar só pode ser considerada diferente, quando a divergência nucleotídica do gene *egl* for maior que 1% (Fegan; Prior, 2005). Atualmente já foram descritas mais de 63 sequevares (Silva, 2014).

Mais recentemente, baseado na análise de sequência multilocus (MLSA) o complexo de espécies *R. solanacearum* foi subdividido em oito clados, sendo os filotipos I e III compostos por apenas um clado cada, o filotipo II formado por quatro clados e o filotipo IV compreendido por dois clados (Wicker et al. 2012). Safni et al. (2014) propôs a reclassificação do complexo em três espécies independentes, sendo a espécie *R. pseudosolanacearum* sp. nov. Safni et al., constituída pelos isolados pertencentes aos filotipos I e III; *R. solanacearum* sp. nov. Safni et al., pelos isolados o filotipo II e *R. syzigii* sp. nov. Safni et al., pelos isolados do filotipo IV. Vale salientar, que *R. syzigii* foi ainda subdividida em três subespécies: *R. syzigii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov. Safni et al., *R. syzigii* subsp. *syzigii* subsp. nov. Safni et al. e *R. syzigii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. Safni et al.

O Brasil representa um antigo centro de diversidade de *R. solanacearum*, em geral, a alta variabilidade genética dessa bactéria já vem sendo relatada no país. No entanto, essas

pesquisas ainda são escassas e limitadas a algumas regiões e hospedeiros específicos, principalmente banana e batata (Santiago et al., 2016).

A alta variabilidade genética e fenotípica dentro do complexo de espécies *R. solanacearum* é um fator limitante para obtenção de variedades resistentes a murcha bacteriana no Brasil e no mundo. Sendo assim, o conhecimento da diversidade de populações de *R. solanacearum* é fundamental para a adequação de medidas de controle para o desenvolvimento de novas estratégias baseadas na resistência de germoplasma (Albuquerque, 2013). Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar a diversidade do complexo *R. solanacearum* nas mesorregiões do Leste e Agreste Alagoano.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleta e identificação dos isolados

Os isolados foram obtidos de tomate, berinjela, pimenta malagueta e banana, apresentando sintomas de murcha bacteriana, nos principais municípios produtores do estado de Alagoas, Brasil: Agreste Alagoano (Arapiraca, Taquarana e Limoeiro de Anadia) e Leste Alagoano (Capela, Igreja Nova, Maceió, Murici e Teotônio Vilela) (Fig. 3), no período de Janeiro de 2018 a Setembro de 2019. Os isolamentos foram realizados em meio TZC ou meio de Kelman (10g de peptona, 1g de caseína hidrolisada, 5g de glucose, 18g de ágar e 0,05g de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio), onde colônias virulentas de *R. solanacearum* apresentam aspecto mucoide, centro róseo e bordas irregulares de coloração branca (Kelman, 1954). Todos os isolados foram purificados e preservados em água destilada esterilizada (ADE) a temperatura ambiente.

5.2 Extração do DNA

O DNA genômico dos isolados foi extraído a partir da cultura pura da bactéria crescida em meio TZC a 30°C por 48h pelo protocolo de Ausubel et al., 2003. A integridade do DNA

foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% e a quantificação realizada em espectrofotômetro (Biowave, Cambridge, Reino Unido). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

5.3 Identificação de filotipo/espécie por Filotipo-multiplex PCR (Pmx-PCR)

A determinação dos filotipos/espécies foi realizada por meio do Pmx-PCR, utilizando os *primers* 759/760 os quais amplificam um fragmento específico para isolados do complexo de espécie *R. solanacearum* de 280pb (Opina et al., 1997) combinados com os *primers* da série Nmult gerados a partir da região ITS (Fegan; Prior, 2005), os quais amplificam fragmentos 144, 372, 91 e 213pb para os filotipos I, II, III e IV, respectivamente. As reações foram compostas pelo mix dos *primers* (1X), dNTP's (0,2 mM), tampão de reação 10X (1X), MgCl₂ (2 mM), DMSO (5%), Taq DNA Polimerase (1U) (Invitrogens, Carlsbad, EUA) e DNA (100 ng) e ajustadas com água ultrapura para um volume final de 25 µl. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 96°C por 10 min, 30 ciclos de 94°C por 30s, 59°C por 90s e 72°C por 90s e extensão final de 72°C por 20 min, realizada em termociclador Axygen MaxyGene Gradient (Fegan; Prior, 2005).

5.4 Identificação de sequevares associadas ao Moko por Moko-multiplex PCR (Mmx-PCR)

Para os isolados pertencentes ao filotipo II foi realizado o Mmx-PCR específico para identificação de sequevares associados ao Moko da bananeira. Para essa reação foram utilizados os pares de *primers* IS24F, IS24R; MUS20F, MUS20R; SI28F, SI28R e VC46F, VC46R que identificam as sequevares IIB-3 (400 pb), IIB-4 (351 pb), IIA-6 (220 pb) e IIA-24 (100 pb), respectivamente. As reações foram preparadas da mesma forma da Pmx-PCR. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 96°C por 10 min, 30 ciclos de 92°C por 15s, 59°C por 15s e 72°C por 30s e extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos de

PCR foram corados com SyBr Gold (Invitrogen™, Carlsbad, EUA), submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% (TAE 0,5 X) e visualizados em fotodocumentador El Logic 200 – Imaging System. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado com o marcador 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific, San Jose, EUA).

5.5 Genotipagem

O perfil genômico dos isolados foi obtido por meio de PCR, utilizando os primers REP (REPIR-I 5' IIIICGICGICATCIGGC 3' e REP2I 5' ICGICTTATGIGGCCTAC 3'). Com base nesses perfis foram determinadas as linhas clonais da população total e selecionados 22 isolados de *R. solanacearum* para o sequenciamento do gene *egl*. A reação foi composta por uma mistura contendo 2 µM de cada *primer*, dNTP's (0,1 mM), tampão de reação 10X (1X), MgCl₂ (1,5 mM), Taq DNA Polimerase (1U), DNA (50 ng) e ajustada para volume final de 25 µl com água ultrapura. As condições de amplificação consistiram de desnaturação inicial a 95°C por 7 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 44°C por 1 min e 65°C por 8 min e extensão final a 65°C por 15 min. Os produtos de PCR foram corados com SyBr Gold e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado com o marcador 1 kb Plus DNA ladder.

5.6 Amplificação e sequenciamento parcial dos genes *egl* e *mutS*

A amplificação dos fragmentos de aproximadamente 750pb dos genes *egl* e *mutS* foi realizada utilizando os *primers*: Endo-F (5'-ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3') e Endo-R (5'-GCGTTGCCCGGCACGAACACC-3') para o gene *egl* (Poussier et al., 2000) e mutSRsF1570 (5'-ACAGCGCCTTGAGCCGTACA-3') e mutSRsR1926 (5'GCTGATCACCGGCCCGAACAT-3') para *mutS* (Toukam et al., 2009). Para ambos os genes o mix da reação foi preparado utilizando 12,5 µl de Amplitaq Gold Master Mix (2X) (Thermo Scientific, San Jose, EUA), 0,4 µM de cada *primer*, 100 ng de DNA e água ultrapura

para volume final de 25µl (Albuquerque et al., 2014). As condições de amplificação das amostras pelo gene *egl* consistiram de desnaturação inicial a 96°C por 9 min; seguida de 30 ciclos (95°C por 1 min; 70°C por 1 min e 72°C por 2 min) e extensão final a 72°C por 10 min (Fegan; Prior, 2006). As condições de amplificação pelo gene *mutS* consistiram de desnaturação inicial a 96°C por 5 min; seguida de 35 ciclos (94°C por 1 min; 66°C por 1 min e 72°C por 90 s) e extensão final a 72°C por 5 min (Toukam et al., 2009). Os produtos da PCR foram corados com SyBr Gold, submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (TAE 0,5X) com o marcador 1 kb Plus DNA ladder para estimar o tamanho dos amplicons. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pela Macrogen (Seul, Coréia do Sul). Os isolados selecionados para o gene *egl* foram analisados por rede de haplótipos através do software DnaSP (versão 5.10.1; Universidade de Barcelona, Barcelona, Espanha), dos quais 14 isolados representativos dos haplótipos foram sequenciados para o gene *mutS*.

5.7 Análises filogenéticas

A análise dos cromatogramas gerados pelo sequenciamento dos genes *egl* e *mutS* e a montagem dos contigs foram realizadas utilizando o software Staden Package (versão 2.0; Medical Research Council, Cambridge, England) (Staden et al. 1998). As sequências de cada gene foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W contido no software MEGA (versão 5.0; MEGA, Tempe, Arizona) e manualmente ajustadas para obter máxima similaridade entre as sequências. As árvores filogenéticas foram construídas pelos seguintes métodos: a) Neighbor-Joining (NJ) (Saitou; Nei, 1987) utilizando o algoritmo de Jukes e Cantor com 1000 bootstrap, no software MEGA; b) Máxima Verossimilhança (ML) realizada pelo servidor web RaxML (<https://www.phylo.org/portal2/>), utilizando o modelo GTR + G, incluindo uma estimativa de sítios invariáveis para todas as análises. A filogenia de sequências de nucleotídeos foi inferida usando o modelo GAMMA AUTO, que permite que o RaxML determine automaticamente o modelo de substituição de nucleotídeos com melhor score

(Stamatakis, 2014). c) Inferência Bayesiana usando o modelo GTR+I+G para o gene *egl* e o modelo HKY+I para o gene *mutS*, utilizando o software Mrbayes (versão 3.2.2; NSF, EUA) (Ronquist; Huelsenbeck, 2003). As árvores filogenéticas foram geradas no portal Cipres e visualizadas no programa Figtree. A divergência nucleotídica entre as sequências do gene *egl* dos isolados foi calculada usando o P-DISTANCE no MEGA. As sequevares foram consideradas distintas quando os valores de divergência nucleotídica das sequências parciais de *egl* foram superiores a 1%. Sequências de referência dos genes *egl* e *mutS* representativas das sequevares descritas na literatura foram inseridas nas análises filogenéticas.

6. RESULTADOS

6.1 Isolados bacterianos e identificação de filotipos/espécies/sequevares por Pmx-PCR e Mmx-PCR

Um total de 103 isolados foram obtidos, sendo 27 de plantas sintomáticas de banana, três de berinjela, 31 de pimenta e 42 de tomate. Aproximadamente 76,7% dos isolados do complexo de espécies *R. solanacearum* foram provenientes da mesorregião do Leste alagoano e 23,3% foram da mesorregião Agreste. (Tab. 1). Nos municípios de Arapiraca e Limoeiro de Anadia não foi observado a murcha bacteriana.

A amplificação do fragmento de 280pb específico para *R. solanacearum* foi detectado em todos os isolados analisados. Cerca de 44,7% dos isolados foram identificados como pertencentes ao filotipo I que corresponde a *R. pseudosolanacearum* pela amplificação do fragmento de 144pb com os *primers* da série Nmult e 55,3% dos isolados como filotipo II, que corresponde a *R. solanacearum* pela amplificação do fragmento de 372pb (Fig. 6). *Ralstonia pseudosolanacearum* (53,9%) foi prevalente na mesorregião do Leste alagoano e *R. solanacearum* foi a única espécie detectada no Agreste. Neste trabalho será adotada a denominação *R. pseudosolanacearum* referindo-se aos isolados do filotipo I e *R.*

solanacearum aos isolados do filotipo II, seguindo a atual taxonomia do complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (Safni et al., 2014).

Nenhum dos isolados pertencentes a espécie *Ralstonia solanacearum* (filotipo II) amplificou fragmentos específicos a sequevares associadas ao Moko pelo Mmx-PCR.

6.2 Genotipagem

Com base na genotipagem foi possível determinar seis linhas clonais pertencentes a *R. solanacearum* e cinco a *R. pseudosolanacearum*. Com base nesta caracterização foram selecionados 22 isolados do complexo *R. solanacearum* para o sequenciamento do gene *egl*.

6.3 Análises filogenéticas dos genes *egl* e *mutS* e identificação das sequevares

A construção de uma rede de haplótipos com base nas sequências do gene *egl* permitiu caracterizar sete haplótipos, dos quais três foram encontrados em isolados de *R. pseudosolanacearum* (haplótipos 3 a 5) e quatro em *R. solanacearum* (haplótipos 1, 2, 6 e 7), foram escolhidos dois isolados de cada haplótipo para o sequenciamento do gene *mutS*.

A reconstrução filogenética dos isolados do complexo *R. solanacearum* e a determinação dos sequevares foi baseada nas sequências parciais do gene *egl*, utilizando sequências de referência depositadas no Genbank. As árvores de *egl* e *mutS* foram analisadas com as sequências parciais de 22 e 14 isolados sequenciados, respectivamente e comparados com 71 sequências de referência do gene *egl* e 42 do gene *mutS*. (Tab.2). As árvores filogenéticas para cada gene, determinadas por Neighbor-Joining, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana, apresentaram topologias e relacionamentos filogenéticos congruentes, sendo apresentada a árvore de Máxima Verossimilhança (Fig. 4 e 5). As árvores dos diferentes genes apresentaram concordância genealógica e relacionamento filogenético semelhante entre os isolados na determinação das sequevares, sendo observado algumas modificações.

A partir da análise filogenética do gene *egl* foi possível observar que os isolados de *R. pseudosolanacearum* foram separados em dois clusters, onde dois isolados se agruparam com a sequevar I-17 e seis com a sequevar I-18. A sequevar de *R. pseudosolanacearum* prevalente no Leste alagoano foi a I-18. Na mesorregião Agreste não foi detectada nenhuma sequevar desta espécie. Os isolados de *R. solanacearum* se agruparam dentro do filotipo IIA. Os indivíduos desta espécie foram identificados como pertencentes as sequevares IIA-36, IIA-6/35, IIA-41 e IIA-53. Todos os isolados associados ao Moko da bananeira foram identificados como IIA-53, dos quais três isolados (COUFAL0320, COUFAL0323 e COUFAL0404) foram obtidos de plantas jovens sintomáticas sem emissão da inflorescência.

Neste trabalho foi verificado que todos os isolados da sequevar 6/35 não amplificaram a banda de 220pb específica da sequevar IIA-6, pelo Mmx-PCR. Para esses isolados foi observado apenas a amplificação da banda de 280pb específica para o complexo de espécies *R. solanacearum* (Fig. 7). É importante ressaltar que os isolados da sequevar IIA-6/35 receberam esta denominação por apresentarem uma divergência nucleotídica de 0,2% com relação ao isolado de referência CFBP 2972 da sequevar 35 e 0,0% quando comparado ao isolado IBSBF 2661 da sequevar IIA-6.

Os isolados do complexo de espécies *R. solanacearum* representativos dos sete haplótipos (n=14) foram utilizados para o sequenciamento do gene *mutS*, com o objetivo de dar maior suporte a identificação das sequevares. Este conjunto de isolados foi constituído por: seis isolados de *R. pseudosolanacearum* (haplótipos 3, 4 e 5) e oito isolados de *R. solanacearum* (haplótipos 1, 2, 6 e 7).

A distribuição das sequevares do complexo *R. solanacearum* nas mesorregiões do estado de Alagoas reflete a diversidade destas fitobactérias. Na mesorregião do Agreste foi detectada apenas a sequevar IIA-6/35, em isolados provenientes de tomate. Por outro lado, na

mesorregião Leste foi observado uma maior diversidade, sendo caracterizadas as sequevares IIA-36, IIA-41, IIA-53, I-17 e I-18.

7. DISCUSSÃO

Acredita-se que o Brasil é o centro de origem e de diversidade de *R. solanacearum* (filotipo II), devido ao seu extenso território, com uma variedade de ecossistemas e alta diversidade de plantas, favorecendo a diversidade genotípica de microrganismos associados as plantas em geral (Santiago et al., 2016). Neste estudo, os isolados do complexo *R. solanacearum* foram obtidos de vários hospedeiros com sintomas de murcha bacteriana, das principais regiões produtoras do estado de Alagoas, principalmente de áreas cultivadas no leste alagoano. Como esperado, a população de isolados do complexo *R. solanacearum* foi altamente diversificada, incluindo sequevares das espécies *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*, com prevalência de *R. solanacearum*. Esta prevalência pode estar relacionada a origem desta espécie, que é nativa do Brasil (Wicker et al., 2012), ou ainda porque, a recente introdução de *R. pseudosolanacearum* no Brasil, não permitiu sua dispersão e estabelecimento em todos os municípios produtores das mesorregiões do Leste e Agreste alagoano. Em levantamento realizado na região Norte do país, também houve uma prevalência de *R. solanacearum* apresentando 67,8% do total de isolados amostrados (Coelho Neto et al., 2003). Segundo Santiago et al., (2016), apesar de *R. pseudosolanacearum* já ter sido detectada em vários estados do Brasil, a maioria dos isolados pertencem a *R. solanacearum*, sendo a porcentagem dessas espécies semelhante aos relatados em outros países da América Latina. Essas ocorrências em diferentes países estão associadas aos

mecanismos de dispersão utilizados por estas fitobactérias (Sanchez Perez et al., 2008; Ramsubhag et al., 2012).

Ainda que em menor prevalência este é o primeiro relato de *R. pseudosolanacearum* no estado de Alagoas, que muito provavelmente tenha sido proveniente do estado de Pernambuco. Segundo Garcia et al., (2013) ainda não está claro quando e como isolados desta fitobactéria foram introduzidos no Brasil. No entanto sabe-se que ocorreu uma imigração asiática significativa e que os agricultores japoneses foram estabelecidos em muitos estados em todo o Brasil, incluindo Pernambuco. Contudo, a transmissão por sementes não é considerada importante na dispersão das espécies do complexo *R. solanacearum*, embora existam relatos de transmissão de espécie deste complexo via sementes de tomate, berinjela e amendoim (Kelman et al., 1994; Momol et al., 2008).

Sabe-se que *R. solanacearum* possui dois sub-grupos (IIA e IIB). No presente trabalho foi detectado apenas isolados do sub-grupo IIA desta fitobactéria. Segundo Wicker et al., (2012) o sub-grupo IIA é altamente diverso, recombinogênico e expandido; enquanto o IIB tende a ser clonal. Ambos os sub-grupos de *R. solanacearum* são originários da América do Sul, porém já se encontram disperso por todo o mundo, provavelmente migraram através de banana, plantas ornamentais e tubérculos de batata infectados (Buddenhagen; Kelman, 1964; Milling et al., 2009).

Mesmo após a reclassificação do complexo *R. solanacearum*, em três espécies independentes, a diversidade genética das diferentes espécies deste complexo também pode ser avaliada pelo número e distribuição das sequevares de acordo com a região ou hospedeiro (Safni et al., 2014; Carstensen et al., 2016; Santiago et al., 2016; Stulberg; Huang, 2016).

Sequevar é um termo infrasubespecífico utilizado para classificar os isolados do complexo baseado na divergência nucleotídica do gene *egl* (Poussier et al., 2000; Fegan; Prior

2005). Para serem consideradas diferentes duas ou mais sequências precisam apresentar uma divergência nucleotídica >1% (Fegan; Prior, 2005). Isto porque, as análises filogenéticas e determinação das sequevares através do sequenciamento parcial do gene *egl*, são congruentes com os resultados de estudos de filogenia organismal e pangenômica do complexo de espécies *R. solanacearum* (Cook; Sequeira, 1994; Fegan; Prior, 2005, 2006; Toukam et al., 2009; Albuquerque et al., 2014, 2016; Santiago et al., 2016).

Uma grande diversidade em termos de sequevares foi encontrada no estado de Alagoas. Na mesorregião Agreste foi detectado apenas isolados da sequevar IIA-6/35, todos de plantas de tomate infectadas. A sequevar IIA-6 esta associada ao Moko da bananeira, enquanto a sequevar IIA-35 é patogênica apenas aos membros da família das solanáceas (Deberdt et al., 2014). Através Mmx-PCR foi possível observar que os isolados desta sequevar não amplificaram o fragmento de 220pb, específico para a sequevar IIA-6. Fato semelhante foi observado por Hong et al., (2012) que verificou que vários isolados obtidos de tomate na Flórida pertenciam a sequevar IIA-6/5. Além disso, esses isolados amplificavam uma banda de 167pb através do Mmx-PCR e possuíam a capacidade de colonizar sistemicamente plantas de bananeira e causar efeitos deletérios ao seu desenvolvimento.

Na mesorregião Leste do estado de Alagoas foi encontrado maior diversidade de sequevares e gama de hospedeiros, sendo detectadas as sequevares I-17 e I-18 em tomate e pimenta, IIA-36 em tomate, IIA-41 em tomate e berinjela e IIA-53 em bananeira. Em diferentes estados das regiões Norte e Nordeste do Brasil já foram relatadas a presença da sequevares I-17 e I-18 em uma ampla gama de hospedeiros da família solanácea (Santiago et al., 2016; Albuquerque et al., 2016).

As sequevares IIA-41 e IIA-36 já haviam sido identificadas nas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste do Brasil, associada a diferentes hospedeiros, principalmente a plantas de tomate e eucalipto (Fonseca et al., 2014; Santiago et al., 2016). A presença destas sequevares

no estado de Alagoas pode representar uma ameaça a crescente eucaliptocultura do estado. Segundo Alfenas et al., (2006) as perdas causadas pela murcha bacteriana em viveiros de eucalipto infectados chegam a aproximadamente US 2,7 milhões.

Segundo Albuquerque et al., (2014) *R. solanacearum* sequevar 53 é responsável por causar a síndrome Sergipe em bananeira, no Nordeste brasileiro. Esta síndrome caracteriza-se por apresentar sintomas atípicos de cacho com penetração da bactéria via flores masculinas, semelhante ao Bugtok nas Filipinas. Neste trabalho foi verificado que o Moko da bananeira no estado de Alagoas é causado por isolados da sequevar IIA-53 e que diferente do que ocorre em Sergipe, a penetração da bactéria também pode ocorrer por infecção via raízes e rizoma, pois alguns isolados foram obtidos de plantas murchas que ainda não haviam emitido a inflorescência.

Este é o primeiro trabalho que relata a diversidade do complexo de espécies *R. solanacearum* no estado de Alagoas. Os resultados aqui obtidos são de suma importância para a pesquisa e produtores locais, auxiliando nas medidas de manejo da murcha bacteriana e nos programas de melhoramento genético de plantas no referido estado.

8. CONCLUSÕES

A murcha bacteriana causada por isolados do complexo *Ralstonia solanacearum* ocorre nas mesorregiões do Leste e Agreste alagoano;

Ralstonia pseudosolanacearum é prevalente no Leste e *R. solanacearum* no Agreste;

No Leste alagoano estão presentes as sequevars I-17, I-18, IIA-36, IIA-41 e IIA-53, enquanto no Agreste apenas a sequevar IIA-6/35;

A única sequevar associada ao Moko da bananeira encontrada no estado de Alagoas foi a IIA-53;

A sequevar IIA-53 também é capaz de penetrar por ferimentos em raízes e rizoma e causar o Moko da bananeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, G. M. R. 2013. Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* raça 2. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Albuquerque, G. M. R., Santos, L. A., Felix, K. C. S., Rollemberg, C. L., Silva, A. M. F., Souza, E. B., Cellier, G. Prior, P., e Mariano, R. L. R. 2014. Moko disease causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II. *Phytopathology* 104:1175-82.
- Albuquerque, G. M. R., Silva, A. M. F., Silva, J. R., Gama, M. A. S., e Mariano, R. L. R. 2016. First Report of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* on *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* in Brazil. *Plant Disease* 100:2319.
- Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Sartorio, R. C., Binoti, D. H. B., Silva, R. R., Lau, D., Vanetti, C. A. 2006. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31: 357-366.
- Andrade, F. W. R., Amorim, E. P. R., Eloy, A. P., Rufino, M. J. 2009. Ocorrência de doenças em bananeiras no Estado de Alagoas. *Summa Phytopathologica* 35, 4:305-309.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 2003. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley e Sons. 4648p.
- Buddenhagen, I., Kelman, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review Phytopathology* 2:203-230.
- Buddenhagen, I., Sequeira, L., Kelman, A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726.
- Carstensen, G. D., Venter, S. N., Wingfield, M. J., e Coutinho, T. A. 2016. Two *Ralstonia* species associated with bacterial wilt of *Eucalyptus*. *Plant Pathology*. Online: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.12577/pdf>.
- Coelho Neto, R. A., Pereira, B. G., Noda, H., e 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.
- Cook, D., e Sequeira, L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. Pages 77-93 in: *Bacterial Wilt: The Disease and Its*

- Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*, vol 1. A. C. Hayward e G. L Hartman, eds. CAB International, Wallingford.
- Deberdt, P., Guyot, J., Coranson-Beaudu, R., Launay, J., Noreskal, M., Rivière, P., Vigné, F., Laplace, D., Lebreton, L., Wicker, E. 2014. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands knowledge of the “emerging ecotype”. *Phytopathology* 104:586-596.
- Fegan, M., e Prior, P. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilt of banana. *Australas. Plant Pathology* 35:93-101.
- Fegan, M., e Prior, P., 2005. How complex is the ‘*Ralstonia solanacearum* species complex’? Pages 449-461 in: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*, vol. 1. C. Allen, P. Prior e A.C. Hayward, eds. APS, St Paul.
- Fonseca, N. R., Guimarães, L. M. S., Hermenegildo, P. S., Teixeira, R. U., Lopes, C. A., Alfenas, A. C. 2014. Molecular characterization of *Ralstonia solanacearum* infecting *Eucalyptus* spp. in Brazil. *Forest Pathology* 44: 107-16.
- Garcia, A. L. et al. 2013. Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt bell pepper in the state of Pernambuco, Brazil. *Journal of Plant Pathology* 95: 237-245.
- Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27:265-277.
- Hayward, A. C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. Pages: 9-24 in: *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. A. C. Hayward, G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford.
- Hong, J. C., Norman, D. J., Reed, D. L., Momol, M. T., Jones, J. B. 2012. Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the southeastern United States. *Phytopathology* 102:924-936.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.
- Kelman, A.; Hartman, G. L.; Hayward, A. C. 1994. Introduction. In: Hayward, A. C.; Hartman, G. L. (Eds.). *Bacterial wilt the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford: CAB International. 1-7.
- Milling, A., Meng, F. H., Denny, T. P., Allen C. 2009. Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Phytopathology* 99:1127–1134.

- Momol, T., Pradhanang, P., Lopes, C. A. 2008. Bacterial wilt of pepper. Retrieved dec 10, 2010, from EDIS, University of Florida IFAS Extension. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Opina, N., Tavner, F., Holloway, G., Timmis, J. N. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia-Pacific Journal of Molecular and Biotechnology* 5:19-33.
- Pinheiro, C. R., Amorim, J. A. E., Diniz, L. E. C., Silva, A. M. F., Talamini, V., Júnior, M. T. S. 2011. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto a filotipos e sequevares. *Brasília. Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46:593-602.
- Poussier, S., Trigalet-Demery D., Vanderwalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J. Trigalet, A. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR R-RFLP of the 474 *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146:1679-1692.
- Ramsubhag, A., Lawrence, D., Cassie, D., Fraser, R., Umaharan, P., Prio, P., Wicker, E. 2012. Wide genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains affecting tomato in Trinidad, West Indies. *Plant Pathology* 61:844-57.
- Ronquist, F., Huelsenbeck J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., Kappler, U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. e *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 64:3087-3103.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sanchez Perez, A., Meija, L., Fegan, M., Allen, C. 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathology* 57:320-331.

- Santiago, T. R., Lopes, C. A., Caetano-Anolles, G. Mizubuti, E. S. G. 2016. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. Plant Pathol. Online: <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12586>.
- Silva, J. R. 2014. Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 48f.
- Staden, R., Beal, K. F., Bonfield, J. K. 1998. The Staden package. Pages: 115-130 in: Bioinformatics methods and protocols, vol. 1. S. Misener, e S. A. Krawetz, eds. Humana, New York.
- Stamatakis, A. 2014. RaxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies Bioinformatics 30: 1312-1313.
- Stulberg, M. J., Huang, Q. 2016. A computer program for fast and easy typing of a partial endoglucanase gene sequence into genospecies and sequevars 1&2 of the *Ralstonia solanacearum* species complex. Journal of Microbiological Methods 123:101-107.
- Takatsu, A., Lopes, C. A. 1997. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. Brasília. Horticultura Brasileira 15:170-177.
- Tokeshi, H., Duarte, M. L. R. 1976. Moko da bananeira no território Federal do Amapá. Summa Phytopathologica 3:224-229.
- Toukam, G. M. S., Cellier, G., Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C., Prior, P. 2009. Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. Plant Disease 93:1123-1130.
- Wicker, E., Lefeuvre, P., de Cambiaire, J. C., Lemaire, C., Poussier, S., Prior, P. 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. The ISME Journal 6:961-74.
- Wicker, E. et al. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. Applied and Environmental Microbiology 73: 6790-6801.

ANEXOS



Fig. 3. Municípios do estado de Alagoas visitados no levantamento da murcha bacteriana em bananeira e solanáceas.

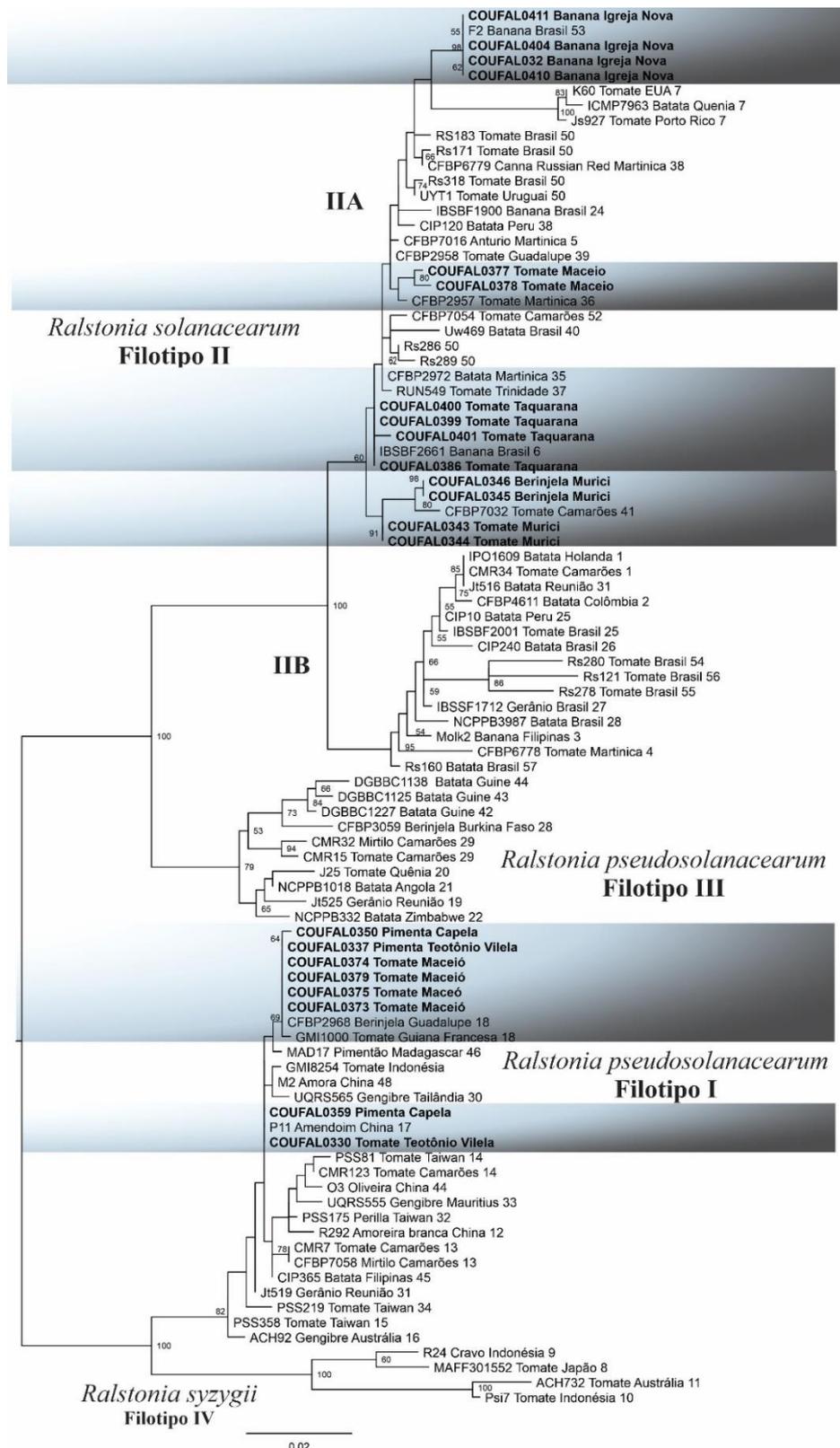


Fig. 4. Reconstrução filogenética baseada nas sequências parciais do gene da endoglucanase (*egl*) de haplótipos de *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* causadores de murcha bacteriana no Leste e Agreste do estado de Alagoas, Brasil, pelo método de Máxima Verossimilhança realizada pelo servidor web RaxML (<https://www.phylo.org/portal2/>). A filogenia de sequências de nucleotídeos foi inferida usando o modelo GAMMA AUTO, que permite que o RaxML determine automaticamente o modelo de substituição de nucleotídeos com melhor score (Stamatakis 2014).

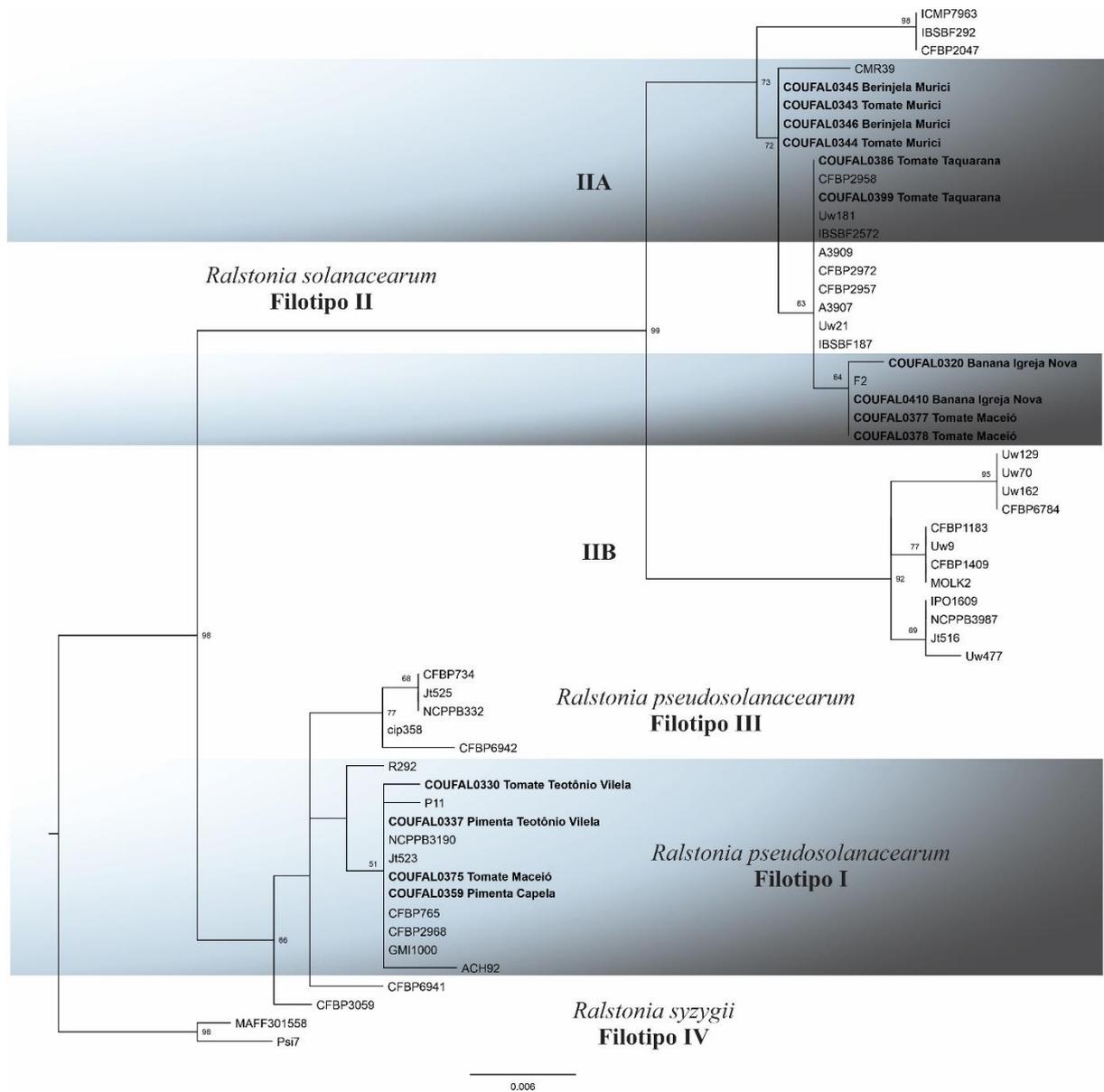


Fig. 5. Reconstrução filogenética baseada nas sequências parciais do gene de reparo do DNA (*mutS*) de haplótipos de *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* causadores de murcha bacteriana no Leste e Agreste do estado de Alagoas, Brasil, pelo método de Máxima Verossimilhança realizada pelo servidor web RaxML (<https://www.phylo.org/portal2/>). A filogenia de sequências de nucleotídeos foi inferida usando o modelo GAMMA AUTO, que permite que o RaxML determine automaticamente o modelo de substituição de nucleotídeos com melhor score (Stamatakis 2014).

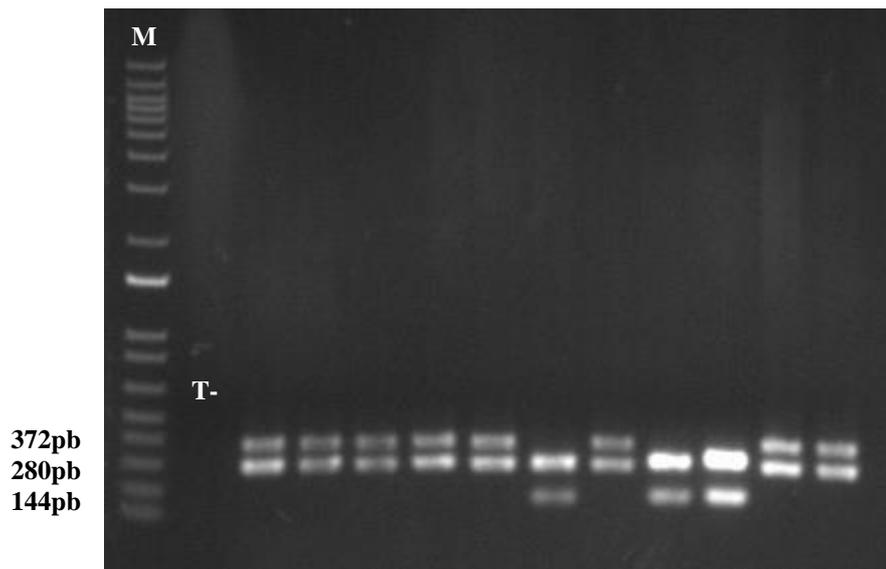


Fig. 6. Filitipo-Multiplex PCR (Pmx-PCR) dos isolados do complexo *Ralstonia solanacearum*. Linha (M) – Marcador 1kb ladder; Linha (T-) – Controle negativo; Linhas 2 a 6, 8, 11 e 12 – Amplificação dos isolados pertencentes ao filotipo II (*R. solanacearum*) com bandas de 280 e 372pb; Linhas 7,9 e 10 - Amplificação dos isolados pertencentes ao filotipo I (*R. pseudosolanacearum*) com bandas de 280 e 144pb.

Fig. 7. Moko-Multiplex PCR (Mmx-PCR). Linha (M) – Marcador 1kb ladder; Linha (T-) – Controle negativo; Linha 2 – Isolado BD1109, pertencente a sequevar IIA-6 (Controle positivo); Linhas 3 a 6 – isolados designados nesse estudo como pertencentes a sequevar IIA-6/35.

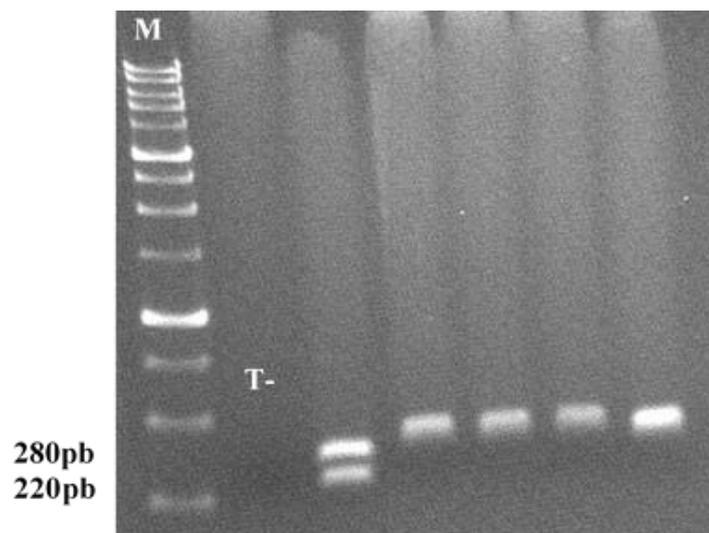


Tabela 1. Isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* provenientes do estado de Alagoas, região Nordeste do Brasil

Isolado	Espécie	Mesorregião	Município	Hospedeiro	Filotipo-Sequevar^a
COUFAL 0330	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Teotônio Vilela	Tomate	I-17
COUFAL 0331	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Teotônio Vilela	Tomate	I-17
COUFAL 0332	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Teotônio Vilela	Tomate	I-17
COUFAL 0334	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Teotônio Vilela	Tomate	I-17
COUFAL 0353	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-17
COUFAL 0356	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-17
COUFAL 0357	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-17
COUFAL 0358	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-17
COUFAL 0359	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-17
COUFAL 0361	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-17
COUFAL 0369	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-17
COUFAL 0370	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-17
COUFAL 0325	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0326	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0327	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0328	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Teotônio Vilela	Tomate	I-18
COUFAL 0329	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Teotônio Vilela	Tomate	I-18
COUFAL 0333	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Teotônio Vilela	Tomate	I-18
COUFAL 0335	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Teotônio Vilela	Tomate	I-18
COUFAL 0336	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Teotônio Vilela	Pimenta	I-18
COUFAL 0337	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Teotônio Vilela	Pimenta	I-18
COUFAL 0338	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Teotônio Vilela	Pimenta	I-18
COUFAL 0339	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Teotônio Vilela	Pimenta	I-18
COUFAL 0348	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0349	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0350	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0351	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18

Continuação Tabela 1.

Isolado	Espécie	Mesorregião	Município	Hospedeiro	Filotipo-Sequevar ^a
COUFAL 0352	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0354	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0355	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0360	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0362	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0363	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0364	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0365	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0366	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0367	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0371	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0372	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Capela	Pimenta	I-18
COUFAL 0373	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Maceió	Tomate	I-18
COUFAL 0374	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Maceió	Tomate	I-18
COUFAL 0375	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Maceió	Tomate	I-18
COUFAL 0376	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Maceió	Tomate	I-18
COUFAL 0379	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Leste alagoano	Maceió	Tomate	I-18
COUFAL 0377	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Maceió	Tomate	IIA-36
COUFAL 0378	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Maceió	Tomate	IIA-36
COUFAL 0380	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0381	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0382	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0383	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0384	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0385	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0386	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0387	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35

Continuação Tabela 1.

Isolado	Espécie	Mesorregião	Município	Hospedeiro	Filotipo-Sequevar^a
COUFAL 0388	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0389	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0390	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0391	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0392	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0393	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0394	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0395	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0396	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0397	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0398	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0399	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0400	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0401	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0402	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0403	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agreste alagoano	Taquarana	Tomate	IIA-6/35
COUFAL 0346	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Murici	Berinjela	IIA-41
COUFAL 0347	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Murici	Berinjela	IIA-41
COUFAL 0342	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Murici	Tomate	IIA-41
COUFAL 0343	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Murici	Tomate	IIA-41
COUFAL 0344	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Murici	Tomate	IIA-41
COUFAL 0345	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Murici	Berinjela	IIA-41
COUFAL 0340	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0341	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0320	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0321	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0322	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53

Continuação Tabela 1.

Isolado	Espécie	Mesorregião	Município	Hospedeiro	Filotipo-Sequevar ^a
COUFAL 0323	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0324	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0404	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0405	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0406	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0407	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0408	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0409	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0410	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0411	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0412	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0413	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0414	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0415	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0416	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0417	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0418	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0419	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0420	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0421	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0422	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53
COUFAL 0423	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Leste alagoano	Igreja Nova	Banana	IIA-53

^a Sequevars determinadas pelo relacionamento filogenético de sequências parciais do gene *egl* pelo método de Máxima Verossimilhança realizada pelo servidor web RaxML (<https://www.phylo.org/portal2/>).

Tabela 2. Isolados de referência (Genbank) do complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* utilizados neste estudo

Isolado	Hospedeiro	Origem	Nome alternativo	Filotipo-Sequevar	<i>egl</i> Genbank	<i>mutS</i> Genbank
A3909	Helicônia	Hawaii	RUN9	IIA-6	EF371812	AY756753
ACH732	Tomate	Austrália	-	IV-11	GQ907150	AY756743
ACH92	Gengibre	Austrália	-	I-16	AF295254	AY756764
ANT24	Antúrio	Trinidade	-	IIB-51	AF371831	EF371875
CFBP2957	Tomate	Martinica	-	IIA-36	AF295265	EF371845
CFBP2958	Tomate	Guadalupe	-	IIA-39	AF295266	AY756806
CFBP2968	Berinjela	Guadalupe	-	I-18	EF371806	AY756800.1
CFBP2972	Batata	Martinica	-	IIA-35	AF295264	AY756807
CFBP3059	Berinjela	Burkina Faso	-	III-28	AF295270	AY756766
CFBP4611	Batata	Colômbia	-	IIB-2	GU294981	ND
CFBP6778	Tomate	Martinica	-	IIB-4	EF371816	EF371851
CFBP6779	Canna Russian Red	Martinica (FWI)	ANT1741	IIA-38	EF371835.1	EF371872
CFBP6783	Helicônia	Martinica	-	IIB-4NPB	EF371852	EF371852
CFBP7016	Antúrio	Martinica	ANT78	IIA-5	EF371826	EF371860
CFBP7032	Tomate	Camarões	CMR39	IIA-41	EF439726	EF439803
CFBP7054	Tomate	Camarões	CMR121	IIA-52	EF439725	EF439800
CFBP7058	Mirtilo	Camarões	CMR134	I-13	EF439740	EF439794
CIP10	Batata	Peru	UW477	IIB-25	AF295260	AY756821
CIP120	Batata	Peru	-	IIA-38	GQ907152	AY756774
CIP240	Batata	Brasil	-	IIB-26	EF647739	JF702714
CIP365	Batata	Filipinas	-	I-45	GQ907151	AY756787
CIP418	Amendoim	Indonésia	MOH6	IIB-3	GU295005	AY756809
CMR123	Tomate	Camarões	-	I-14	EF439737.1	EF439778.1
CMR15	Tomate	Camarões	CFBP6941	III-29	EF439743	JF702729
CMR32	Mirtilo	Camarões	CFBP6942	III-29	EF439749	EF439773
CMR34	Tomate	Camarões	-	IIB-1	EF439750	EF439810

Continuação Tabela 2.

Isolado	Hospedeiro	Origem	Nome alternativo	Filotipo-Sequevar	<i>egl</i> Genbank	<i>mutS</i> Genbank
CMR39	Tomate	Camarões	-	IIA-41	EF439726	EF439803
CMR66	Huckleberry	Camarões	RUN166	III-49	EF439729	EF439783
CMR7	Tomate	Camarões	-	I-13	EF439744	JF702730
DGBBC1125	Batata	Guine	-	III-43	GU295008	KU255889.1
DGBBC1138	Batata	Guine	-	III-44	GU295009	KU255883.1
DGBBC1227	Batata	Guine	-	III-42	GU295011	KU255884.1
F2	Banana	Brasil	-	IIA-53	KF875426	KF896801
GMI1000	Tomate	Guiana Francesa	-	I-18	AF295251	AY756804
GMI8044	Banana	Grenada	RUN585	IIA-6	GU295013	JF702718
GMI8254	Tomate	Indonésia	-	I-47	GU295014	JF702719.1
IBSBF1900	Banana	Brasil	-	IIA-24	EF371839	EF371871
IBSBF2001	Tomate	Brasil	-	IIB-25	GU295017	ND
IBSBF2661	Banana	Brasil	-	IIA-6	KF875432	ND
IBSSF1712	Gerânio	Brasil	-	IIB-27	EF371833	EF371869
ICMP7963	Batata	Quênia	-	IIB-7	AF295263	AY756776
IPO1609	Batata	Holanda	-	IIB-1	EF371814	EF371849
J25	Tomate	Quênia	-	III-20	AF295279	AY756810
JS927	Tomate	Porto Rico	-	IIB-7	GU295027	ND
JT516	Batata	Reunião	-	IIB-31	AF295258	AY756783
JT519	Gerânio	Reunião	-	I-31	GU295032	JF702713
JT525	Gerânio	Reunião	-	III-19	AF295272	AY756786
JT656					ND	AY756811.1
K60	Tomate	EUA	-	IIB-7	EF192970.1	AY756799.1
M2	Amora	China	-	I-48	FJ561067	ND
MAD17	Pimentão	Madagascar	-	I-46	GU295040	ND
MAFF301552	Tomate	Japão	-	IV-8	GU295042	ND
MOLK2	Banana	Filipinas	-	IIB-3	EF371841	EF371848

Continuação Tabela 2.

Isolado	Hospedeiro	Origem	Nome alternativo	Filotipo-Sequevar	<i>egl</i> Genbank	<i>mutS</i> Genbank
NCPPB1018	Batata	Angola	-	III-21	AF295271	AY756772
NCPPB332	Batata	Zimbabwe	-	III-22	AF295276	AY756760
NCPPB3987	Batata	Brasil	-	IIB-28	AF295261	AY756785
O3	Oliveira	China	-	I-44	FJ561069	JF702706
P11	Amendoim	China	-	I-17	FJ561068	JF702705
PSi7	Tomate	Indonésia	-	IV-10	EF371804	AY756752
PSS175	Perilla	Taiwan	-	I-32	KF913847	EU407349.1
PSS219	Tomate	Taiwan	-	I-34	FJ561167	JF702700
PSS358	Tomate	Taiwan	-	I-15	EU407298	JF702699
PSS81	Tomate	Taiwan	-	I-14	FJ561066	JF702701
R24	Cravo	Indonésia	-	IV-9	JF702321	JF702735
R292	Amoreira branca	China	-	I-12	AF295255	AY756801
RS121	Tomate	Brasil	-	IIB-56	KT630068	ND
RS160	Batata	Brasil	-	IIB-57	KT630004	KU663534.1
RS171	Tomate	Brasil	-	IIA-50	KT629874	ND
RS183	Tomate	Brasil	-	IIA-50	KT629880	ND
RS278	Tomate	Brasil	-	IIB-55	KT630060	ND
RS280	Tomate	Brasil	-	IIB-54	KT630013	ND
RS286		Brasil	-	IIA-50	KY848664.1	ND
RS289		Brasil	-	IIA-50	KT629938.1	ND
RS318	Tomate	Brasil	-	IIA-50	KT629930	ND
RUN549	Tomate	Trinidade	RF38	IIA-37	JF702309	JF702716
T1-UY	Tomate	Uruguai	RUN448	IIA-50	GU295049	JF702712
UQRS555	Gengibre	Mauritius	-	I-33	KF913848	ND
UQRS565	Gengibre	Tailândia	-	I-30	KF913846	ND
UW163	Plátano	Peru	-	IIB-4	GU295052	AY756779
UW181	Banana	Venezuela	RUN454	IIA-6	GU295053	AY756754

Continuação Tabela 2.

Isolado	Hospedeiro	Origem	Nome alternativo	Filotipo-Sequevar	<i>egl</i> Genbank	<i>mutS</i> Genbank
UW469	Batata	Brasil	CIP239	IIA-40	DQ657612	AY756808
UW477	Batata	Peru	-	IIB-25	AF295260.1	AY756821.1
UYT1	Tomate	Urugai	-	IIA-50	GU295049	JF702712

ND: Sequência não disponível no Genbank.