



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**  
*PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO*



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**Diversidade e estrutura de populações de *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko nos estados do Amazonas e Sergipe e sequenciamento completo de isolados da sequevar IIA-53**

**Jéssica Rodrigues da Silva**

**Recife – PE  
2018**

**JÉSSICA RODRIGUES DA SILVA**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Ralstonia solanacearum*  
ECOTIPO MOKO NOS ESTADOS DO AMAZONAS E DE SERGIPE E  
SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE ISOLADOS DA SEQUEVAR IIA-53**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título Doutor em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa de Lima Ramos Mariano

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elineide Barbosa de Souza

Coorientador: Dr. Adriano Márcio Freire Silva

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO - 2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586d Silva, Jéssica Rodrigues da.  
Diversidade e estrutura de populações de *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko nos estados do Amazonas e Sergipe e sequenciamento completo de isolados da sequevar IIA-53 / Jéssica Rodrigues da Silva. – Recife, 2018.  
81 f.: il.

Orientador(a): Rosa de Lima Ramos Mariano.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2018.  
Inclui referências.

1. Endoglucanase 2. Genética populacional 3. Genes efetores  
I. Mariano, Rosa de Lima Ramos, orient. II. Título

CDD 632

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Ralstonia solanacearum*  
ECOTIPO MOKO NOS ESTADOS DO AMAZONAS E DE SERGIPE E  
SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE ISOLADOS DA SEQUEVAR IIA-53**

**JÉSSICA RODRIGUES DA SILVA**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 28/02/2018

**ORIENTADORA:**

---

Profa. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE)

**EXAMINADORES:**

---

Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra (IPA)

---

Profa. Dra. Kedma Maria Silva Pinto (UFRPE - UAG)

---

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE)

---

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

**RECIFE - PE  
FEVEREIRO - 2018**

*A Deus, por ter concedido todo amor,  
paciência e fé.*

*Aos meus pais José Aduino da Silva  
Júnior e Luzanira Rodrigues da Silva, e  
meus irmãos, Thaysa e Gabriel pelo  
imenso amor, carinho e apoio em todas as  
etapas da minha vida.*

*A minha orientadora Rosa de Lima  
Ramos Mariano pela confiança e  
paciência durante esses anos.*

**DEDICO**

*Aos meus dois amores, meu filho  
Júlio César e meu esposo  
Marcondes, pelo incentivo,  
compreensão e por sempre  
estarem ao meu lado.*

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar o fôlego de vida e forças para que eu pudesse alcançar mais uma vitória, além de tornar meus dias mais agradáveis nos momentos difíceis;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade da realização do curso de Doutorado em Fitopatologia, aos professores e funcionários;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado;

À Profa. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano pela excelente orientação, ensinamentos, apoio, confiança, conselhos e além de tudo, muita paciência durante esses seis anos de mestrado e doutorado;

À Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza pela orientação, atenção e incentivo durante a execução desta tese;

Ao Dr. Adriano Márcio Freire da Silva pelos ensinamentos e sugestões que foram fundamentais para a compreensão desse estudo;

À Dra. Rosalee Coelho Neto pela parceria e atenção;

À Dra. Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque pelo exemplo de competência, profissionalismo e pela grande ajuda para a finalização desse trabalho;

Aos técnicos do INPA sr. Luiz (Tirico), sra. Marilene e aos técnicos do IDAM pela ajuda nas coletas;

Às minhas amigas Edilaine, Ana Karolina, Alessandra e Ana Dulce pela ajuda, amizade e por estarem sempre ao meu lado, compartilhando cada momento;

À equipe do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) pela companhia e ajuda nos trabalhos;

Enfim, agradeço a todos que participaram dessa jornada, cujo apoio, incentivo e torcida foram fundamentais para a minha vitória.

## SUMÁRIO

página

RESUMO GERAL.....	vii
GENERAL ABSTRACT.....	viii
DIVERSIDADE E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE <i>Ralstonia solanacearum</i> ECOTIPO MOKO NOS ESTADOS DO AMAZONAS E DE SERGIPE E SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE ISOLADOS DA SEQUEVAR IIA-53 .....	10
Capítulo I-INTRODUÇÃO GERAL .....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25
Capítulo II- ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE <i>Ralstonia solanacearum</i> ECOTIPO MOKO NOS ESTADOS DO AMAZONAS E DE SERGIPE .....	33
Resumo .....	33
Introdução .....	35
Material e métodos .....	37
Resultados.....	40
Discussão .....	42
Literatura citada.....	46
Capítulo III- GENOMA COMPLETO DOS ISOLADOS IBSBF 2570 E CCRMSFC DE <i>Ralstonia solanacearum</i> ECOTIPO MOKO SEQUEVAR IIA-53 DO BRASIL .....	65
Resumo .....	65
Introdução.....	65
Material e métodos .....	67
Resultados.....	69
Conclusões.....	71
Referências .....	72
CONCLUSÕES GERAIS .....	81

## RESUMO GERAL

O Moko da bananeira, causado pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, é uma das principais doenças da cultura, na região amazônica do Brasil (região Norte), sendo fator limitante à produção. Adicionalmente no estado de Sergipe (região Nordeste), ocorre um grupo de isolados pertencentes à sequevar IIA-53 (endêmica) que causam a “Síndrome Sergipe” do Moko da bananeira. Diante disso, os objetivos desse trabalho foram (i) avaliar a diversidade genética do complexo *R. solanacearum* no estado do Amazonas e (ii) analisar a estrutura de populações de isolados de *R. solanacearum* nos estados do Amazonas e de Sergipe; e (iii) analisar o genoma de isolados de *R. solanacearum* ecotipo moko, sequevar IIA-53, agente causal da síndrome Sergipe. Foram obtidos 47 isolados de *R. solanacearum* ecotipo Moko do estado do Amazonas (região Norte) todos pertencentes ao filotipo II e a análise filogenética do gene *egl* revelou a presença das sequevars IIA-24 e IIA-4, representando 91,5% e 8,5% da população, respectivamente. Na análise da estrutura genética de populações de *R. solanacearum*, ecotipo Moko, o primeiro estudo compreendeu três subpopulações baseadas na combinação entre a localização geográfica e classificação climática. O segundo estudo compreendeu duas subpopulações do Amazonas, baseadas nos ecossistemas de plantio, terra firme e várzea. Foram detectadas duas subpopulações de *R. solanacearum* ecotipo Moko, uma formada por isolados do Amazonas e a outra formada pelos isolados de Sergipe. Houve presença de fluxo gênico e ausência de estruturação entre as subpopulações do Amazonas e estruturação entre a subpopulação de Sergipe e a subpopulação do Amazonas. No Amazonas, nem a condição climática, nem o ecossistema de plantio influenciaram o suficiente para diferenciar as subpopulações. Foram sequenciados os genomas completos dos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC. Foram identificados 16 genes de proteínas de associação com o hospedeiro secretados pelo sistema de secreção tipo III e 61 genes efetores T3E, dos quais dois efetores foram exclusivos dos isolados da sequevar IIA-53 quando comparados a outros isolados de Moko do filotipo IIA. Este é o primeiro trabalho que analisou a estrutura genética de populações de *R. solanacearum* ecotipo Moko, nos estados do Amazonas e de Sergipe, Brazil, sendo IBSBF 2570 e CCRMSFC os primeiros isolados da sequevar IIA-53 com genoma completo sequenciado.

**Palavras-chave:** filotipo, endoglucanase, genética populacional, genes efetores



## GENERAL ABSTRACT

The Moko disease, caused by the bacteria *Ralstonia solanacearum*, is one of the main banana diseases, in the Amazon region of Brazil (North region), being a limiting factor to the production. Additionally, in the state of Sergipe (Northeast region), a group of strains belonging to sequevar IIA-53 (endemic) causes the "Sergipe Faciens" of the Moko disease. Therefore, the objectives of this work were (i) to analyze the genetic diversity of *R. solanacearum* complex in the state of Amazonas; (ii) to analyze the population structure of *R. solanacearum* strains in the states of Amazonas and Sergipe; and (iii) to analyze the genome of isolates of *R. solanacearum* Moko ecotype, sequevar IIA-53, which cause "Sergipe Faciens". A total of 47 isolates of *R. solanacearum* ecotype Moko were obtained from the state of Amazonas (North region) and all of them belong to phylotype II. The phylogenetic analysis of the *egl* gene revealed the presence of sequevars IIA-24 and IIA-4, representing 91,5% and 8,5% of the population, respectively. In the analysis of the population genetic structure of *R. solanacearum*, Moko ecotype, the first study comprised three subpopulations based on the combination of geographic location and climatic classification. The second study comprised two subpopulations from the state of Amazonas, based on the ecosystems of planting, dryland and wetland. Two subpopulations of *R. solanacearum* Moko ecotype, one formed by isolates from Amazonas and the other by Sergipe isolates were detected. There was presence of gene flow and absence of structuring between the subpopulations of the Amazonas and structuring between the subpopulation of Sergipe and the subpopulation of the Amazonas. In the Amazonas, neither the climatic condition nor the planting ecosystem influenced enough to differentiate the subpopulations. The complete genome of the strains IBSBF 2570 and CCRMSFC were sequenced. There were identified 16 host-associated protein genes secreted by the type III secretion system and 61 effector genes T3E, of which two effectors were unique to sequevar IIA-53 isolates when compared to other Moko strains of the IIA phylotype. This is the first analysis of the genetic structure of populations of *R. solanacearum* Moko ecotype in the states of Amazonas and Sergipe, Brazil, and IBSBF 2570 and CCRMSFC, are the first strains of sequevar IIA-53, with complete genome sequenced.

**Keywords:** phylotype, endoglucanase, population genetics, effector genes

## **CAPÍTULO I**

---

### **Introdução Geral**

# DIVERSIDADE E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Ralstonia solanacearum* ECOTIPO MOKO NOS ESTADOS DO AMAZONAS E DE SERGIPE E SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE ISOLADOS DA SEQUEVAR IIA-53

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Importância econômica da bananeira

As cultivares comestíveis de banana (*Musa* Lin. spp.) originaram-se de *Musa acuminata* Colla, que tem o centro de origem no continente Asiático e, posteriormente, foram levadas para Índia e Filipinas onde foram cruzadas com espécies selvagens diploides de *M. balbisiana* Colla produzindo os primeiros híbridos interspecíficos diploides e triploides de bananeiras (SALOMÃO; SIQUEIRA, 2015). Na literatura, não existem relatos precisos que indiquem como a cultura da bananeira foi introduzida em território brasileiro. No entanto, segundo Moreira e Cordeiro (2006), cartas escritas por Pero Vaz de Caminha indicam que indígenas brasileiros já cultivavam a banana antes do ano 1500. Apesar da bananeira não ser originária do Brasil, ela é cultivada em quase todos os municípios brasileiros, em altitudes que variam entre 0 e 1000 m acima do nível do mar (SALOMÃO; SIQUEIRA, 2015).

O cultivo da bananeira representa uma relevante atividade econômica, principalmente em regiões tropicais, constituindo um importante produto agrícola de inserção internacional. Índia, China, Filipinas e Brasil, são considerados os maiores produtores mundiais desta fruta (FAO, 2014).

No Brasil, a produção de banana em 2016 foi de 6.962.134 t em uma área de aproximadamente 474.054 ha (IBGE, 2017). Essa produção abastece principalmente o mercado interno, que é o principal destino dessa fruta, sendo as exportações pouco expressivas, representando em 2015 e 2016, respectivamente 1,17% e menos de 1% da produção. Entre 2001 e 2016, o maior volume exportado ocorreu em 2002, representando 3,67% da colheita (KIST et al., 2017).

Embora o Brasil seja um grande produtor e consumidor de banana, a bananicultura nacional sofre graves problemas nas fases de produção e pós-colheita (BUAINAIN; BATALHA, 2007). Entre eles está a perda em quantidade e qualidade dos frutos em consequência de problemas fitossanitários, principalmente devido às doenças de origem fúngica, como a sigatoka amarela, sigatoka negra e mal-do-panamá (CORDEIRO, 2000). No entanto, as doenças bacterianas conhecidas como Moko da bananeira, Bugtok e blood disease

têm destaque relevante para a bananicultura e são causadas por componentes do complexo *Ralstonia solanacearum* (FEGAN; PRIOR, 2006), porém apenas o Moko da bananeira tem ocorrência no Brasil.

## **2. Moko da bananeira: Importância, aspectos bioquímicos, taxonomia, diversidade, epidemiologia, sintomatologia e controle**

### **2.1. Importância**

O Moko da bananeira, causado pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., é uma importante doença, principalmente na região amazônica do Brasil, onde é considerado fator limitante para a produção de banana (COELHO NETTO et al., 2004). Nessa região, também conhecida como região Norte estão os estados: Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Roraima. Dentre eles, os maiores produtores de banana são: Roraima (117.577 t), Acre (114.741 t) e Amazonas (92.557 t) (IBGE, 2016)

A primeira referência à murcha bacteriana em bananeiras foi realizada por Schomburgk em viagens pela Guiana Inglesa (hoje denominada Guiana), entre 1840 e 1844 (SEQUEIRA, 1998). No entanto, somente após ter devastado plantios da cultivar Moko (*Musa AAB*) em Trinidad, a doença foi descrita (RORER, 1911) e denominada segundo sua hospedeira (BLOMME et al., 2017). Atualmente, a doença está restrita a América Central e América do Sul (Belize, Brasil, Colômbia, Equador, El Salvador, Guatemala, Guiana, Guiana Francesa, Honduras, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname e Venezuela), América do Norte (México e Estados Unidos), Caribe (Costa Rica, Granada, Granadinas, Jamaica, São Vicente, e Trinidad e Tobago) e Ásia (Filipinas e Malásia) (BLOMME et al., 2017; CABI International, 2017; CELLIER et al., 2015; FEGAN; PRIOR, 2006; SÁNCHEZ, 2016.). No Brasil, apesar de ter sido registrada anteriormente, os primeiros relatos com caracterização do patógeno e testes de patogenicidade foram feitos independentemente por dois grupos de pesquisadores (ROBBS; KIMURA, 1976; TOKESHI; DUARTE, 1976), a partir de material proveniente do vale do rio Pedreira, no antigo Território Federal do Amapá (ROBBS, 1983).

O difícil controle do Moko acarreta grandes riscos econômicos ao cultivo da bananeira. O patógeno é considerado uma ameaça pela legislação Europeia e um potencial agente de bioterrorismo nos Estados Unidos (AILLOUD et al., 2012). No Brasil, *R. solanacearum* é classificada como praga quarentenária presente restrita aos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima (região Norte) e Sergipe (região Nordeste) pela IN59 de 18/12/2013 (MAPA, 2013) e regulamentada pela IN17 de 27/05/2009 (MAPA, 2009).

No estado do Amazonas, o Moko da bananeira foi detectado em 2001 em cinco municípios, com prevalência variando de 11 a 100% (COELHO NETTO; NUTTER JR., 2005). A incidência da doença é alta nesse estado, sendo capaz de atingir 46% das touceiras plantadas. Em geral, os bananais com sintomas da doença são abandonados ou substituídos por outros cultivos. Embora ocorra em bananais estabelecidos em áreas de terra firme, a doença está associada, principalmente, a plantios sujeitos a inundações periódicas, ou seja, em regiões de várzea (PEREIRA et al., 2003). No estado de Sergipe, o Moko foi constatado em 1987 e atualmente ainda ocorre, principalmente na época chuvosa. No entanto, o programa de erradicação existente reduziu a prevalência da doença de 15% para 2%, de 2008 a 2010 (TALAMINI et al., 2010). A importância da presença do Moko em Sergipe se deve ao fato de que a região Nordeste é a maior produtora de banana no Brasil (TALAMINI et al., 2010) e porque nesse estado ocorrem os sintomas atípicos, chamados síndrome Sergipe (ALBUQUERQUE et al., 2014), causados por isolados disseminados por insetos visitantes de inflorescências. A transmissão do Moko por insetos a distâncias superiores a 90 km foi constatada na Colômbia e na Venezuela (WARDLAW, 1972).

## 2.2. Aspectos bioquímicos do patógeno

*R. solanacearum* é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, reto ou levemente curvo, com aproximadamente 0,5 x 1,5 µm, é aeróbica e não forma esporos. Não produz pigmentos fluorescentes. Isolados virulentos não apresentam flagelos, enquanto isolados avirulentos têm alta motilidade, sendo providos de um a quatro flagelos polares. Frequentemente pode reduzir nitrato a nitrito com produção de gás, mas não hidrolisa o amido, caseína e arginina. Realiza fraca hidrólise de gelatina e não utiliza arginina ou betaina como fonte de carbono. É oxidase e catalase positiva. Acumula poli-β-hidroxi-butirato como fonte de carbono. Tolerante a 1% de NaCl em meio líquido, com pouco ou nenhum crescimento em NaCl 2%. Tem bom crescimento entre 25 e 35°C. Isolados que causam Moko não produzem pigmentos marrons em meio de cultura contendo a tirosina, mas incitam reação de hipersensibilidade quando infiltrados em folhas de fumo (KELMAN, 1953; MEHAN et al., 1994; ROBBS, 1983).

## 2.3. Taxonomia

O gênero *Ralstonia* pertence ao domínio Bacteria, reino Procariotae, divisão Proteobacteria, classe β-Proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae

(YABUUCHI et al., 1995). No entanto, segundo Kado (2010) este gênero pertence à família Ralstoniaceae.

A nomenclatura de *R. solanacearum* tem sofrido grandes mudanças ao longo do tempo. A bactéria foi inicialmente observada em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) no Japão, cerca de 200 anos antes de sua descrição em 1896 (KELMAN, 1953). Neste ano, foi isolada a partir de plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.) infectadas, provenientes de Ocean Springs (Mississippi) e descrita pela primeira vez por Erwin F. Smith que a denominou *Bacillus solanacearum* Smith 1896. Em seguida passou a *Pseudomonas solanacearum* (Smith 1896) Smith 1914; *Burkholderia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1993; e *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996 emend. Safni et al. 2014 de acordo com List of Prokaryotes with Standing in Nomenclature (EUZEBY, 2017).

Devido à heterogeneidade da espécie, *R. solanacearum* foi considerada um complexo de espécies (FEGAN; PRIOR, 2005), que é definido como um grupo de isolados proximalmente relacionados, cujos membros individuais podem representar mais de uma espécie. Além de *R. solanacearum*, dois outros organismos foram definidos pela análise de sequências da região 16S rRNA e participam desse complexo de espécies, a blood disease bacterium (BDB) que causa doença apenas em bananeiras na Indonésia e *R. syzygii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al., agente causal da doença de Sumatra do cravo da Índia. Esta última ocorre em Java e Sumatra, sendo transmitida pela cigarrinha *Hindola fulva* Baker, na Sumatra e *H. striata* Maa, em Java (EDEN-GREEN; ADHI, 1986). As bactérias da blood disease e da doença de Sumatra ainda não foram relatadas no Brasil (ALBUQUERQUE et al., 2014; SANTIAGO et al., 2016).

O complexo de espécies *R. solanacearum* está subdividido em um sistema hierárquico de classificação, constituído de quatro filotipos (relacionados à origem geográfica dos isolados) (FEGAN; PRIOR, 2005), 59 sequevares (SILVA, 2014), oito clados (WICKER et al., 2012) e clones (FEGAN; PRIOR, 2005). O filotipo I é encontrado na Ásia; o filotipo II é proveniente das Américas; o filotipo III é oriundo da África e ilhas vizinhas; e o filotipo IV é encontrado principalmente na Indonésia, mas também na Austrália e Japão, sendo constituído por duas espécies intimamente relacionadas: a BDB e *R. syzygii*. Cada filotipo é subdividido em sequevares, definidos como um grupo de isolados com uma sequência altamente conservada dentro de uma região sequenciada (FEGAN; PRIOR, 2005). Sequevares são determinados a partir do relacionamento filogenético dos genes *egl* e/ou *mutS*, onde dois ou mais isolados sequenciados devem apresentar sequências similares (FEGAN; PRIOR, 2005; WICKER et al., 2007; XU et al., 2009).

Remenant et al. (2011) comparando oito genomas sequenciados de *R. solanacearum*

observaram a relação entre os isolados pertencentes aos quatro filotipos e, propuseram uma revisão na taxonomia para o complexo de espécies de *R. solanacearum* baseada na média da identidade de nucleotídeos e relação genética. Desde que os três grupos de isolados excediam o limite para a especiação, foram propostas duas novas espécies e três subespécies. O filotipo II deveria ser mantido como *R. solanacearum*, enquanto que os isolados pertencentes ao filotipo IV deveriam ser reclassificados como *Ralstonia haywardii*, com as subespécies *R. haywardii* subsp. *celebensis* para BDB, *R. haywardii* subsp. *solanacearum* para isolados de *R. solanacearum* da Indonésia e *R. haywardii* subsp. *syzygii* para *R. syzygii*. Por fim, os isolados agrupados aos filotipos I e III formariam uma única espécie denominada *Ralstonia sequeirae*. Entretanto, esta proposta não foi aceita por não estar de acordo com as Regras do Código Internacional de Nomenclatura de Procariotos (DE VOS; TRUPER, 2000; LAPAGE et al., 1992).

Com base em estudos anteriores de hibridização DNA-DNA (ROBERTS et al., 1990; VANEECHOUTTE et al., 2004), Gennin e Denny (2012) propuseram para o complexo, além de *R. solanacearum*, a criação de duas novas espécies (*Ralstonia sequeirae* e *R. haywardii*) e três subespécies (*R. haywardii* subsp. *celebensis*, *R. haywardii* subsp. *solanacearum*, *R. haywardii* subsp. *syzygii*), mas a proposta não foi adotada. Posteriormente, estudos de taxonomia polifásica para 68 isolados pertencentes ao complexo de espécies *R. solanacearum*, demonstraram que o mesmo compreende três genoespécies. Os isolados pertencentes ao filotipo II permaneceram como *R. solanacearum*. No filotipo IV, os isolados de *R. solanacearum* da Indonésia, *R. syzygii* e BDB, foram reclassificados como *R. syzygii* subsp. *indonesiensis*, *R. syzygii* subsp. *syzygii* e *R. syzygii* subsp. *celebesensis*, respectivamente. A terceira genoespécie composta de isolados pertencentes aos filotipos I e III foi renomeada *R. pseudosolanacearum* (SAFNI et al., 2014). Esta divisão do complexo *R. solanacearum* em três espécies foi confirmada, bem como, a diferenciação entre os isolados dos filotipos II e IV e a relação entre os isolados dos filotipos I e III foram evidenciadas (PRIOR et al., 2016; ZHANG; QIU, 2016).

#### **2.4. Diversidade**

Existem discussões sobre o centro de origem do complexo *R. solanacearum*. Segundo Wicker et al. (2012) originou-se na Oceania/Indonésia, migrou para a África e subsequentemente para a América do Sul e Ásia, possivelmente antes da separação geológica do continente ancestral, Gondwana. No entanto, a América Central e norte da América do Sul têm sido considerados centros de origem dos isolados causadores de Moko (HAYWARD, 1991; SEQUEIRA; AVERRE, 1961), provavelmente por serem grandes produtores de banana

(ALBUQUERQUE et al., 2014). É provável que o complexo *R. solanacearum* tenha sido originado na Austrália/Indonésia e que o filotipo II tenha se originado na região que corresponde ao Brasil, no continente americano, com posterior diferenciação em filotipo IIA e IIB (WICKER et al., 2012).

*Ralstonia solanacearum* é caracterizada pela alta diversidade de fenótipos e genótipos e foi classificada anteriormente em nível infraespecífico em cinco raças de acordo com a gama de hospedeiros (HE; KELMAN; SEQUEIRAE, 1983) e seis biovars em relação às características bioquímicas (HAYWARD, 1994; HAYWARD et al., 1990).

Nesta classificação de acordo com a gama de hospedeiros, a raça 1 afeta o maior número de culturas incluindo solanáceas tais como, batata (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), tomate e plantas de outras famílias, entre as quais, amendoim (*Arachis hypogaea* L.), oliveira (*Olea europaea* L.), bananeira ornamental (*Musa* sp.), ave do paraíso (*Strelitzia reginae* Banks) e em alguns locais, helicônia (*Heliconia* spp.). A raça 2 afeta bananeira triplóide (banana comestível e banana subgrupo Terra ou “plátano”) e helicônias (HAYWARD, 1994), enquanto a raça 3 é considerada específica da batata e ocasionalmente tomate, mas não outras culturas (BUDDENHAGEN; SEQUEIRA; KELMAN, 1962). As raças 4 e 5 infectam o gengibre (*Zingiber officinale* [Willd.] Roscoe.) e a amoreira (*Morus nigra* L.), respectivamente (HAYWARD, 1994). A classificação de acordo com a biovar é definida através da utilização de açúcares (lactose, maltose e celobiose) e álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol) como única fonte de carbono e a formação de ácidos a partir destes carboidratos, além da produção de nitrito e gás a partir de nitrato, sendo classificadas as biovars 1, 2, N2, 3, 4 e 5 (HAYWARD, 1994; HAYWARD et al., 1991). Ambas as classificações foram amplamente utilizadas por sua simplicidade e praticidade, mas não refletem a heterogeneidade dos isolados de *R. solanacearum* (PINHEIRO et al., 2011).

Com relação à raça 2 causando murcha bacteriana em bananeira triploide e helicônia na América Central e do Sul, French e Sequeira (1970) definiram cinco grupos ou ecotipos relacionados à ecologia do patógeno: (1) Grupo A, proveniente da Bacia Amazônica; (2) Grupo SFR (small, fluidal and round), transmitido por insetos; (3) Grupo B, de banana, habitante do solo; (4) Grupo D, causando distorção; e (5) Grupo H, de helicônias. Os ecotipos A, SFR, B e D são patogênicos à bananeira triploide; e H apenas à banana subgrupo Terra. SFR, A e B são grupos mais agressivos que o D. Todos são naturalmente patogênicos a *Musa* sp. e, quando inoculados por injeção no caule, são patogênicos ao tomate e a outras solanáceas, mas nunca foram isolados de solanáceas com sintomas de murcha natural no campo (FEGAN; PRIOR,



2005).

Apesar de Safni et al. (2014) reclassificarem o complexo *R. solanacearum*, diversos trabalhos (CARSTENSEN et al., 2017; SANTIAGO et al., 2016; STULBERG; HUANG, 2016) ainda utilizaram a classificação em filotipos, clados e sequevares, associando os filotipos às respectivas espécies de *Ralstonia*. Esta divisão reflete a variabilidade do complexo de espécies *R. solanacearum* ecotipo Moko, que corresponde ao filotipo II, com as sequevares 2, 3, 4, 6 e 24 (CELLIER; PRIOR, 2010; FEGAN; PRIOR, 2006). Fegan e Prior (2006), propuseram uma subdivisão do Filotipo II, em IIA e IIB. Dessa forma, as sequevares 6 e 24 são intimamente relacionadas e estão contidas no filotipo IIA e as sequevares 2, 3 e 4 estão agrupadas no filotipo IIB. No entanto, as sequevares IIB-25 e IIA-41 foram encontradas causando Moko em bananeiras no Brasil, estendendo a gama de sequevares associadas ao Moko e uma nova sequevar (IIA-53) foi relatada causando sintomas atípicos em bananeiras no estado de Sergipe (ALBUQUERQUE et al., 2014).

A diversidade genética de *R. solanacearum* também pode ser avaliada através de técnicas moleculares, tais como AFLP (FOUCHÉ-WEICH et al., 2006; YU et al., 2003), RFLP (POUSSIER et al., 2000) e rep-PCR (COSTA; FERREIRA; LOPES, 2007; HORITA; TSUCHIYA, 2001; MARTINS; RUDOLPH, 2002; NOURI; BAHAR; FEGAN, 2009; SMITH et al., 1995). Os marcadores moleculares de rep-PCR são baseados em regiões repetitivas do DNA. Três famílias de sequências repetitivas foram identificadas, a sequência REP (sequência repetitiva extragênica palindrômica), sequência ERIC (sequência consenso intergênica repetitiva enterobacteriana), e o elemento BOX. Estas sequências estão localizadas em posições intergênicas distintas no interior do genoma, promovendo a amplificação de regiões distintas, produzindo um perfil genômico que pode ser visualizado em gel de agarose. Os elementos repetitivos podem estar presentes em ambas as orientações e primers de oligonucleotídeos têm sido desenhados para priorizar a síntese externa de DNA de repetições inversas de REP, ERIC e da subunidade boxA de BOX, na reação de PCR (VERSALOVIC et al., 1994).

A sequência do gene *egl* (endoglucanase) tem sido utilizada para determinar a relação filogenética entre isolados de *R. solanacearum*. Este gene existe em cópia única no genoma, é conservado e está presente em todos os isolados testados até o momento. Além disso, tem variabilidade que apresenta suporte na sequência de nucleotídeos para caracterizar a diversidade de *R. solanacearum* (FEGAN; PRIOR, 2005). A endoglucanase é uma enzima pertencente à família da celulase com função importante na patogenicidade de *R. solanacearum* (KADO, 2010). Mutantes defectivos em *egl* são mais lentos em causar sintomas do que os isolados que expressam o gene (GENNIN; DENNY, 2012; SAILLE et al., 1997). As evidências sugerem

que a lise da parede celular, pelo menos nos estágios iniciais, envolve a degradação da pectina e hemiceluloses, com a consequente exposição das microfibrilas da celulose à ação das celulases (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). A filogenia baseada na sequência parcial do gene *egl* para o complexo de espécies de *R. solanacearum* é relatada como um bom indicador do relacionamento entre isolados (FEGAN; PRIOR, 2006) e mostrou ser congruente com a análise filogenética baseada na hibridização do DNA em microarranjos (GUIDOT et al., 2007). Genes como *gyrB* (DNA girase), *egl* e *mutS* (reparo do DNA) têm demonstrado serem mais informativos nas análises de diversidade genética de espécies relacionadas e tem suportado a classificação em filotipos e sequevares (DEWHIRST et al., 2000; HANNINEN; HANNULA, 2007).

Para obter uma descrição completa de um organismo é necessário realizar o sequenciamento do DNA, que permite identificar a sequência de nucleotídeos, na ordem correta, visando conhecer a informação genética presente no genoma (FIETTO; MACIEL, 2015). Com o sequenciamento do genoma completo do primeiro isolado de *R. solanacearum* (GMI1000) (SALANOUBAT et al., 2002) surgiu o desafio de compreender como os genes atuam.

O genoma de *R. solanacearum* é organizado em dois replicons, ou seja, um cromossomo e um megaplasmídeo, com o cromossomo totalizando aproximadamente 5,8 Mb (REMENANT et al., 2010). Ambos os replicons possuem genes relacionados que são essenciais para a patogênese e as análises indicam que esses genes coevoluiram (COENYE; VANDAMME, 2003; GUIDOT et al., 2007). As atribuições funcionais dos genes mostram que a maioria dos genes housekeeping estão presentes no cromossomo, enquanto que o megaplasmídeo, contém alguns genes essenciais além de ilhas genômicas e genes específicos (REMENANT et al., 2011; REMENANT et al., 2010; SALANOUBAT et al., 2002).

Portanto, conhecer a estrutura genética da população é fundamental para estudos epidemiológicos e para o controle efetivo de doenças, principalmente no que se refere as novas estratégias baseadas na resistência de germoplasma (VAN DER WOLF et al., 1998).

## 2.5. Epidemiologia

Nos centros de origem do Moko e nas áreas afetadas e abandonadas, *R. solanacearum* poderá sobreviver indefinidamente em Musáceas selvagens ou em algumas ervas Dicotiledôneas. Em Honduras, a estirpe SFR foi relatada em *Asclepia curassavica* L., *Cecronia peltatum* L., *Piper auritum* HBK., *P. peltatum* L., *Riccinus communis* L., *Solanum hirtum* Vahl., *S. nigrum* L., *S. umbellatum* Mill., *S. verbascifolium* L. e *Xanthosoma roseum* Schott (ROBBS,

1983). No solo, a sobrevivência da bactéria é de 3 a 6 meses para a estirpe SFR e de 12 a 18 meses para a estirpe J3, a qual é transmitida por insetos, porém com baixa frequência (STOVER, 1972).

No estado do Amazonas, a doença está relacionada a plantios de várzea, sujeitos a inundações periódicas (COELHO NETTO; NUTTER JR., 2005). Devido a sensibilidade da bactéria à dessecação, na ausência de hospedeiros selvagens a sobrevivência é menor em solos de terra firme ou plantios sem irrigação (ROBBS, 1983). Em locais de plantio, na ausência da planta hospedeira, a sobrevivência de *R. solanacearum* independe do tipo de solo, sendo reduzida ao longo do tempo (PEREIRA; NORMANDO, 1993).

A disseminação do patógeno a curta distância ocorre através da movimentação de solo, contato entre as raízes, máquinas agrícolas, utilização de ferramentas contaminadas durante as práticas culturais e, no caso de isolados transmitidos por insetos visitantes de inflorescências, principalmente pela abelha arapuá (*Trigona* spp.) (PEREIRA et al., 2003). A disseminação a longa distância ocorre principalmente pelo transporte de material vegetal infectado. No estado do Amazonas, uma das formas de disseminação observada é através do descarte de pseudocaulis com sintomas nas margens dos rios, os quais podem ser transportados para áreas onde a doença ainda não ocorre (Figura 1).



**Figura 1.** Pseudocaulis de bananeiras com murcha causada por *Ralstonia solanacearum* descartados à margem do rio Solimões, Amazonas, Brasil, provável forma de disseminação do patógeno a grandes distâncias. (Foto: Jéssica Rodrigues da Silva)

*Ralstonia solanacearum* é uma bactéria habitante do solo e, em geral, penetra através de ferimentos ou aberturas naturais principalmente nas raízes e nos tecidos de emergência das raízes secundárias do hospedeiro (VASSE; FREY; TRIGALET, 1995). Após dois a três dias a bactéria coloniza inteiramente o córtex, juntamente com o parênquima vascular e os vasos do xilema (SAILLE et al., 1997).

Em decorrência da colonização, ocorre a obstrução dos vasos, causada pelo acúmulo de exopolissacarídeo (EPS), que é considerado o principal fator de virulência deste patógeno, sendo produzido em grande quantidade em meio de cultura e na planta. Este EPS promove uma rápida colonização sistêmica e mutantes desprovidos do gene *eps* introduzidos diretamente no xilema das plantas, raramente causam murcha ou morte. O acúmulo de EPS é responsável pela disfunção vascular e causa os sintomas característicos de murcha em hospedeiros suscetíveis (SAILLE, et al., 1997). Assim, o fluxo de seiva pode ser parcial ou totalmente bloqueado, impedindo que a água e nutrientes absorvidos pelo sistema radicular supram adequadamente a parte aérea da planta (HIKICHI et al., 2007).

## **2.6. Sintomatologia**

Como consequência da colonização do rizoma que se estende em direção ao pseudocaule, os sintomas típicos do Moko da bananeira na região da Amazônia (Figura 2) são amarelecimento, murcha e necrose das folhas internas (ALBUQUERQUE et al., 2014). Além disso, pode ocorrer a quebra do pecíolo devido à curvatura das folhas. O sintoma mais característico do Moko, entretanto, se manifesta nas brotações novas que foram cortadas e que, voltando a se desenvolver, escurecem, atrofiam e podem apresentar distorções (CORDEIRO, 2000). A descoloração vascular ocorre na parte interna do pseudocaule e concentra-se próximo a região central. Com o avançar da infecção sistêmica, a bactéria se move por toda a planta, sendo capaz de afetar o pedúnculo e frutos (FEGAN, 2006). No rizoma, o escurecimento vascular ocorre na região central e também na região de conexão do rizoma principal com o rizoma das brotações. No engaço e na ráquis, ou eixo da inflorescência, ocorre escurecimento vascular, na forma de pontos avermelhados dispostos uniformemente (PEREIRA et al., 2003). Em cachos de plantas infectadas, ocorre o amadurecimento prematuro dos frutos isoladamente, com uma podridão seca, firme e de coloração parda (AGRIOS, 2005; SALOMÃO; SIQUEIRA, 2015).

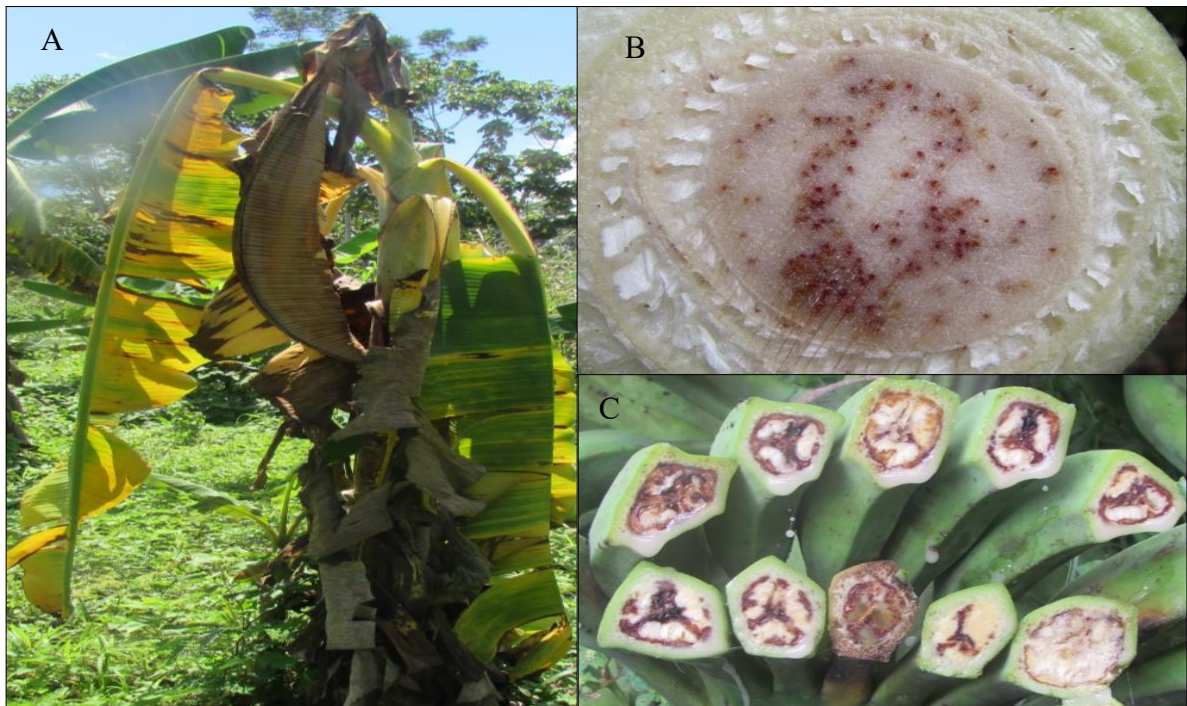


Figura 2. Sintomas típicos do Moko (*Ralstonia solanacearum*) em bananeira no estado do Amazonas, Brasil: (A) planta murcha, amarelecimento; (B) descoloração dos feixes vasculares na região central do pseudocaule (C) frutos com podridão seca. (Foto: Jéssica Rodrigues da Silva)

No estado de Sergipe, os sintomas do Moko diferem dos sintomas típicos encontrados na região da Amazônia. Iniciam-se nas inflorescências e causam amadurecimento desigual e prematuro de frutos que mostram internamente podridão seca (Figura 3). As bactérias podem se mover em direção ao pseudocaule e causar escurecimento dos feixes vasculares mas a murcha das touceiras raramente é observada (ALBUQUERQUE et al., 2014).



Figura 3. Sintomas do Moko (*Ralstonia solanacearum*) em bananeira no estado de Sergipe, Brasil: A- cacho com amadurecimento desigual; B- podridão interna dos frutos; C- descoloração dos feixes vasculares na região central do pseudocaule. (Foto: Viviane Talamini)

## 2.8. Controle

A inviabilidade do controle químico do Moko da bananeira reside na alta variabilidade genética do patógeno e extensa sobrevivência no solo (LOPES; REIFSCHNEIDER, 1999). Além disso, todos os cultivares comerciais de bananeira são suscetíveis ao Moko. Assim, a base principal do controle é a detecção precoce da doença e a erradicação das plantas infectadas e adjacentes. Para tanto, dependendo do grau de incidência, faz-se necessário um esquema de inspeção repetido a intervalos regulares de duas a quatro semanas (CORDEIRO, 2000; PEREIRA; GASPAROTO, 2016). Outras medidas importantes para o controle da doença consistem no uso de mudas sadias, eliminação do coração dos cachos, controle de insetos transmissores e desinfestação de ferramentas utilizadas durante os tratos culturais (SALOMÃO; SIQUEIRA, 2015). Entretanto, a detecção de *R. solanacearum* em plantas assintomáticas e outras possíveis hospedeiras se torna difícil pela ausência de métodos eficientes de detecção e de inspeção adequada do campo por profissionais qualificados (PINHEIRO et al., 2011).

## 3. Estrutura genética de populações

Estudos de variação genética em populações de patógenos de plantas tornaram-se muito populares na última década devido à disponibilidade de marcadores genéticos (MILGROOM, 1997). Estas ferramentas moleculares detectam a variação genética entre os indivíduos e algumas delas, tais como: aloenzimas, RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microsátélites e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), têm sido utilizadas para avaliar o polimorfismo em sequências de genes ou nucleotídeos e a estrutura populacional de patógenos (MILGROOM, 2015). Em bactérias fitopatogênicas, os marcadores moleculares mais utilizados são as rep-PCR baseada em regiões repetitivas do DNA, as sequências de REP, ERIC e elemento BOX (VERSALOVIC et al., 1994). O uso deste último, possibilita identificar como a variabilidade está distribuída entre as populações e a partir dessas análises inferir quanto aos padrões de cruzamentos e dispersão, fluxo gênico e histórico biogeográfico da espécie (SCHNABEL et al., 1998).

Análises de *fingerprint* de DNA através da técnica de BOX-PCR têm sido bastante utilizadas para estudo de diversidade genética entre isolados do complexo de *R. solanacearum* (COSTA; FERREIRA; LOPES, 2007; PINHEIRO et al., 2011; SILVEIRA et al., 2005; XUE et al., 2011) e de outras bactérias fitopatogênicas, tais como *X. campestris* pv. *campestris* (LANGE et al., 2016; RATHAUR et al., 2015), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (TAVASOLI; MAREFAT; HASSANZADEH, 2011) e *Acidovorax citrulli* (MELO et al., 2014).

Embora existam numerosos artigos publicados sobre a variação genética, é importante distinguir entre os diferentes tipos de questões que podem ser abordadas ao nível da população com marcadores genéticos. Existem quatro amplas aplicações de variação genética: 1) detecção, diagnose e taxonomia; 2) sistemática; 3) epidemiologia; e 4) estrutura populacional. As questões relativas à genética populacional podem ser abordadas nos contextos de epidemiologia ou estrutura de populações (MILGROOM, 1997). A estrutura genética é definida como a quantidade e a distribuição da variação genética dentro e entre populações determinada pela história evolutiva dessa população (MCDONALD; LINDE, 2002). As inferências são tipicamente baseadas em análises de frequências alélicas e de genótipos (MILGROOM, 1997).

A evolução refere-se às mudanças nas frequências alélicas e genotípicas nas populações em uma escala de tempo relativamente curta. Quando a evolução ocorre em uma longa escala de tempo pode resultar em espécies geneticamente isoladas. Independentemente da escala de tempo e das mudanças nas frequências alélicas e genotípicas, a evolução é consequência da interação entre cinco processos evolutivos: mutação, migração, seleção, deriva genética e recombinação (MILGROOM, 2015; MCDONALD; LINDE, 2002).

Na era das “Ômicas”, a genética populacional, é capaz de elucidar a história evolutiva e os processos populacionais que impulsionam a coevolução entre os patógenos e hospedeiros (KAMVAR; BOOKS; GRÜNWALD, 2015). A estrutura genética da população permite inferir como os patógenos emergiram, evoluíram e se adaptaram aos hospedeiros, fungicidas, ou outros fatores (MCDONALD; LINDE, 2002; GRÜNWALD; GOSS, 2011). Permite ainda entender os processos evolutivos que moldaram uma população no passado e deduzir o futuro evolutivo potencial das populações (MCDONALD; LINDE, 2002). Este conhecimento sobre a evolução potencial de patógenos tem aplicação direta na agricultura e na compreensão da relação patógeno-hospedeiro (MILGROOM, 2015), podendo aprimorar o uso de genes de resistência, de fungicidas e antibióticos, aumentando seu tempo de ação e reduzindo as perdas causadas em decorrência da redução de eficácia destes métodos (MCDONALD; LINDE, 2002).

A diversidade genética pode ser compreendida a partir de dois parâmetros, riqueza e equitabilidade. A riqueza genotípica  $E_{(gn)}$ , que demonstra o número de genótipos esperados na amostra aleatória de  $n$  indivíduos, dentro de uma amostra total de  $N$  indivíduos é estimada através de análise de rarefação baseada no tamanho da amostra da menor população. As análises de rarefação são utilizadas quando o tamanho das populações é desigual (GRÜNWALD et al., 2003; HURLBERT, 1971; MILGROM, 2015). O índice de equitabilidade ( $E_5$ ), que mede como os genótipos estão distribuídos na amostra, é estimado pela fórmula  $E_5 = G-1/N_1-1$  (ALATALO, 1981; GRÜNWALD et al., 2003; LUDWIG; REYNOLDS, 1988). Grünwald et al. (2003)

afirmaram que os índices de diversidade gênica e genotípica são necessários para estimar a diversidade genética em populações de micro-organismos. A diversidade genotípica refere-se ao número e a frequência dos genótipos ou indivíduos geneticamente distintos em uma população, enquanto que a diversidade gênica ( $H_E$ ) infere sobre o número e frequência de alelos em locos individuais numa população (MCDONALD; LINDE, 2002). Os índices de diversidade genotípica mais utilizados são  $N_1$  (HILL, 1973),  $H'$  (SHANNON-WIENER, 1949) e  $G$  (STODART e TAYLOR, 1988). Com os índices de Hill:  $N_1$  e  $N_2$  a análise de diversidade genotípica pode diferir em riqueza, igualdade e diversidade.  $N_1$  refere-se ao número de genótipos comuns de forma uniforme que podem produzir a mesma diversidade  $H$  ( $H$ = índice de Shannon) (SHANNON, 1948).  $N_2$  corresponde ao índice de diversidade genotípica de acordo com Stoddart e Taylor (1988):  $G = 1/\sum p_i^2$ .  $N_1$  e  $G$  medem a eficiência da distribuição das concentrações populacionais entre os diferentes genótipos.  $N_1$  geralmente fica entre o número de genótipos observados (gobs) e o valor de  $G$ .

O índice de dominância, conhecido como índice de diversidade de Simpson (Lambda), mostra a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na mesma população pertencerem ao mesmo haplótipo. Os valores desse índice variam de 0 a 1 e quanto mais alto for, maior a variabilidade (BROWER; ZAR, 1984). A fração clonal é calculada com base na frequência de clones de cada população, estimada pela fórmula  $(N-G)/G$ , na qual  $N$  é o número de amostras e  $G$  o número de genótipos (ZHAN et al., 2002).

A associação não aleatória entre alelos de diferentes locos em uma população é analisada pela pelo teste de desequilíbrio de ligação, que pode ser provocado por diferentes processos biológicos. Segundo Agapow e Burt (2001), estes processos incluem a diferenciação da população e o isolamento pela distância, reprodução assexuada e seleção natural. Uma métrica tradicional para desequilíbrio de ligação de multilocus, o índice da associação (IA) (MAYNARD SMITH et al., 1993), baseia-se na variância de distâncias emparelhadas entre os indivíduos, ou seja, o número de locos em que eles diferem, comparando a variância dessas distâncias com aquelas esperadas se não houvesse desequilíbrio gamético entre os pares de locos, sendo dependente do tamanho da amostra. A hipótese nula dessa análise indica que todos os locos estão em equilíbrio entre todas as populações. Uma modificação de IA que remove essa dependência é o  $r_{barD}$  (rd), considerado menos sensível à variação no número de locos e devendo, portanto, facilitar comparações entre populações (AGAPOW; BURT, 2001).

A estrutura genética é estimada através do índice  $F_{ST}$  de Wright (1931) ou pela AMOVA, e ambos geram resultados semelhantes (NYBOM; BARTISH, 2000). O índice  $F_{ST}$  é uma medida da divergência de frequência de alelos entre as subpopulações que determina



proporção da variância genética total em uma subpopulação em relação a variância genética total da população (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Já a análise de variância AMOVA (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992), analisa a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações, gerando estimativas dos componentes de variância, que refletem a correlação da diversidade dos genótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. É considerada uma ferramenta coerente e flexível para análise de dados moleculares por apresentar uma metodologia facilmente aplicável em várias situações (ZUCCHI et al., 2005).

A análise discriminante de componentes principais (DAPC) é um método multivariado capaz de identificar e descrever grupos de indivíduos geneticamente relacionados, permitindo também a caracterização da subdivisão da população e a visualização da diferenciação entre populações (JOMBART et al., 2010).

Muitos estudos utilizando BOX-PCR têm sido realizados para avaliar a diversidade genética, buscar agrupar ou separar filotipos, hospedeiros, biovars e biotipos de *R. solanacearum* (COELHO NETTO et al., 2004; COSTA; FERREIRA; LOPES, 2007; IVEY et al., 2007; RODRIGUES et al., 2012), mas não têm analisado a estrutura da população deste patógeno. No Brasil, apenas os trabalhos de Garcia et al. (2013) e Santiago (2014) analisaram a estrutura populacional de *Ralstonia* em pimentão e ampla gama de hospedeiros, respectivamente. Entretanto, não há nenhum estudo sobre a estruturação da população de *R. solanacearum* ecotipo Moko em bananeiras no estado do Amazonas e Sergipe.

Considerando esta lacuna nos estudos, este trabalho teve por objetivos: i) avaliar a diversidade genética do complexo *R. solanacearum* em bananeiras no estado do Amazonas e ii) analisar a estrutura de populações de isolados deste patógeno nos estados do Amazonas e de Sergipe; e (iii) analisar o genoma de isolados de *R. solanacearum* ecotipo moko, sequenciar IIA-53, agente causal da síndrome Sergipe.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPOW, P.M.; BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Notes**, Malden, v.1, p.101-102. 2001.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed. San Diego, Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.
- AILLOUD, F.; CELLIER, G.; YAHIAOUI, N.; REMENANT, B.; ALLEN, C.; PRIOR, P. Banana Moko disease and diversity of its unpredictable causative agent *Ralstonia solanacearum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 45., 2012. Manaus. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2012. CD-ROM 2.
- ALATALO, R. V. Problems in the measurement of evenness in Ecology. **Oikos**, Copenhagen, v. 37, n. 2, p. 199-204, 1981.

- ALBUQUERQUE, G. M. R.; SILVA, SANTOS, L. A.; FELIX, K. C. S.; ROLLEMBERG, C. L.; SILVA, A. M. F.; SOUZA, E. B.; CELLIER, E.B.; PRIOR, P.; MARIANO, R. L. R. Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, n. 11, p. 1175-1182, 2014.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G.; AITKEN, S. N. **Conservation and the genetics of populations**. 2ªed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2013. 663 p.
- AMORIM, L.; REZENDE, M. A. J.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. v.1, Agronômica Ceres, 2011. 704 p.
- FEGAN, M. **Bacterial wilt of banana diagnostics manual**. Plant health Australia e CRC for tropical plant protection. St Lucia, Australia. p. 1–61, 2006.
- BLOMME, G.; DITA, M.; JACOBSEN, K. S.; PÉREZ VICENTE, L.; MOLINA, A.; OCIMATI, W.; POUSSIER, S.; PRIOR, P. Bacterial Diseases of Bananas and Enset: Current State of Knowledge and Integrated Approaches Toward Sustainable Management. **Frontiers in Plant Science**. v. 8, p. 1290-1315.
- BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. (Coord.) **Cadeia produtiva de frutas**. Brasília: MAPA/SPA, 2007. 102 p. (Série Agronegócios, 7)
- BUDDENHAGEN, I. W.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 52, n. 7, p. 726, 1962.
- CABI Internacional. ***Ralstonia solanacearum* race 2 (moko disease)**. Wallingford, Reino Unido: CAB Internacional, 2017. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/44999/aqb>. Acesso em: 15 fev. 2018.
- CARSTENSEN, G. D.; VENTER, S. N.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T. A. 2016. Two *Ralstonia* species associated with bacterial wilt of *Eucalyptus*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 66, n. 3, p. 393-403, 2017.
- CELIER, G.; MOREAU, A.; CHABIRAND, A. HOSTACHY, B.; AILLOUD, F.; PRIOR, P. A Duplex PCR Assay for the Detection of *Ralstonia solanacearum* Phylotype II Strains in *Musa* spp. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 1-17, 2015.
- CELLIER, G.; PRIOR, P. Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, p. 1250-1261, 2010.
- COELHO NETTO, R. A.; NUTTER JÚNIOR, F. W. Use of GPS and GIS technologies to map the prevalence of Moko disease of banana in the amazon region of Brazil. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Ed.) **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. Saint Paul: APS Press, 2005. p. 431-436.
- COELHO NETTO, R. A.; PEREIRA, B. G.; NODA, H.; BOEHER, B. Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3/4, p. 21-27, 2004.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Oxford v. 5, p. 719-729, 2003.
- CORDEIRO, Z. J. M (org.). **Banana: fitossanidade**. Brasília: Embrapa para transferência de Tecnologia, 2000. 121p. (Frutas do Brasil, 8)
- COSTA, S. B.; FERREIRA, M. A. S. V.; LOPES, C. A. Diversidade patogênica e molecular de *Ralstonia solanacearum* da região amazônica brasileira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p.285-294, 2007.
- DE VOS, P.; TRUPER, H. G. Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology. IXth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Minutes of the meetings, 14, 15 and 18 August 1999, Sydney, Australia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, New York, v. 50, p. 2239–2244, 2000.

DEWHIRST, F. E.; TAMER, M. A.; ERICSON, R. E.; LAU, C. N.; LEVANOS, V. A.; BOCHES, S. K.; GALVIN, J. L.; PASTER, B. J. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen v. 15, p. 196–202, 2000.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Bethesda, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

EDEN-GREEN, S. J.; ADHI, E. M. Sumatra disease of cloves and *Pseudomonas solanacearum*. **Bacterial wilt newsletter**, ACIAR, Camberra, v.1, p. 2-3, 1986.

EUZÉBY, J. P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. 2009. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnamesmr.html>>. Acesso em: 10 Jan. 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization. **FAOSTAT**. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 04 set. 2017.

FEGAN, M.; PRIOR, P. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilt of banana. **Australasian Plant Pathology**, Rockhampton, v. 35, n. 2, p. 93-101, 2006.

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

FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando genomas. In: MOREIRA, L. M. (Eds.). **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p. 27-64, 2015.

FOUCHÉ-WEICH, J.; POUSSIER, S.; TRIGALET-DEMERY, D.; BERGER, D.; TERESA C. Molecular identification of some African strains of *Ralstonia solanacearum* from eucalypt and potato. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, p. 369-373, 2006.

FRENCH, E. R.; SEQUEIRA, L. Strains of *Pseudomonas solanacearum* from Central and South America: a comparative study. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 3, p. 506-512, 1970.

GARCIA, A. L.; LIMA, W. G.; SOUZA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. 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.

GENNIN, S.; DENNY, T. P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 67–89, 2012.

GUIDOT, A.; PRIOR, P.; SHOENFELD, J.; CARRÈRE, S.; GENIN, D.; BOUCHER, C. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.189, n. 2, p. 377-387, 2007.

GRÜNWARD, N. J.; GOSS, E. M. Evolution and population genetics of exotic and re-emerging pathogens: novel tools and approaches. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 249–267, 2011.

GRÜNWARD, N.J.; GOODWIN, S.B.; MILGROOM, M.G.; FRY, W.E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 6, p. 738-746, 2003.

HÄNNINEN, M. L.; HANNULA, M. Spontaneous mutation frequency and emergence of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 60, n. 6, p. 1251-1257, 2007.

HAYWARD, A. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 265-277, 1964.

HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 29, n. 1, p. 65–87, 1991.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.). **Bacterial wilt - the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p. 9-24.

HE, L. Y.; KELMAN, A.; SEQUEIRAE, L. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 12, p. 1357-1361, 1983.

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

HORITA, M.; TSUCHIYA, K. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 399-407, 2001.

HURLBERT, S. H. The Nonconcept of Species Diversity: A Critique and Alternative Parameters. **Ecology**, Washington, v. 52, n. 4. p. 577-586, 1971.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201702.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201702.pdf)>. Acesso em: 05 set. 2017.

IVEY, M. L.; GARDENER, B.B.; OPINA, N.; MILLER, S. A. Diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting eggplant in the Philippines. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 11, p. 1467-1475, 2007.

KADO, C. **Plant bacteriology**, St. Paul: APS Press, 2010. 336 p.

KAMVAR, Z. N.; BOOKS, J. C.; GRÜNWARD, N. J. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. **Frontier in Genetics**, Lausana, v. 6, p. 208-218, 2015.

KELMAN, A. **The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: A literature review and bibliography**. Agricultural Experiment Technical Bulletin, North Carolina, 1953. 194 p.

KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; TREICHEL, M.; FILTER, C. F. **Anuário brasileiro da fruticultura 2017**. Gazeta Santa Cruz, 2017. 88 p.

JOMBART, T. Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, Oxford: v. 24, n. 11, p. 1403-1405, 2010.

LANGE, H. W.; TANCOS, M. A.; CARLSON, M.O.; SMART, C.D. Diversity of *Xanthomonas campestris* isolates from symptomatic crucifers in New York state. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 106, n. 2, p. 113-122, 2016.

LAPAGE, S. P., SNEATH, P. H. A., LESSEL, E. F., SKERMAN, V. D. B., SEELIGER, H. P. R.; CLARK, W. A. **International Code of Nomenclature Bacteria**. Washington, DC: **American Society for Microbiology**. 1992.

LOPES, C. A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Manejo integrado das doenças da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n.197, p. 56-60, 1999.

LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. Diversity indices. In: LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. **Statistical ecology: a primer on methods and computing**. New York: John Wiley & Sons, 1988. p. 85-103.

MAPA. **Instrução Normativa Nº 59 de 18/12/2013**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/rede-nacional-de-laboratorios-agropecuarios/documentos-rede-nacional-de-laboratorios-agropecuarios/in-59-2013-pragas-quarentenarias-para-o-brasil.pdf>>. Acesso em 22 Jan. 2018.

MAPA. **Instrução Normativa Nº 17 de 27/05/2009**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/prevencao-e-controle-de-pragas.pdf>>. Acesso em 26 Jan. 2018.

- MARTINS, O.M.; RUDOLPH, K. Variability of *Ralstonia solanacearum* strains using repetitive extragenic palindromic sequences. **Bacterial Wilt Newsletter**, ACIAR, Canberra, v.17, p. 4-5, 2002.
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 349-379, 2002.
- MEHAN, V. K.; LIAO, B. S.; TAN, Y. J.; ROBINSON-SMITH, A.; McDONALD, D.; HAYWARD, A. C. **Bacterial wilt of groundnut**. Patancheru: Internacional Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1994. 28 p. (ICRISAT Information Bulletin, 35).
- MELO, L. A.; TEBALDI, N. D.; MEHTA, A.; MARQUES, A. S. A. Comparing *Acidovorax citrulli* 441 strains from melon and watermelon: Phenotypic characteristics, pathogenicity and 442 genetic diversity. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n. 2, p.154-162, 2014.
- MILGROOM, M. G. Genetic variation and the application of genetic markers for studying plant pathogen populations. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 79, n. 1, p. 1-13, 1997.
- MILGROOM, M. G. **Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology and Evolution**. American Phytopathological Society Press, St. Paul, 2015. 399p.
- MOREIRA, R. S.; CORDEIRO, Z. J. M. A história da banana no Brasil. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17., 2006, Joinville, SC. Bananicultura: um negócio sustentável. **Anais...** Joinville: ACORBAT/ACAFRUTA, 2006. v. 1, p. 49-82.
- NOURI, S.; BAHAR, M.; FEGAN, M. Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2 strains outside South America. **Plant Pathology**, Dordrecht, v. 58, p. 243-249, 2009.
- NYBOM, H.; BARTISH, I. V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in plant ecology, evolution and systematics**, Jena, v. 3, n. 2, p. 93-114, 2000
- PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L. **Cultivo da banana para o estado do Amazonas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2016. (Sistemas de produção, 2). Disponível em: [https://www.spo.cnpia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemasdeproducao16\\_1galceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaoId=8007&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicoId=8753](https://www.spo.cnpia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao16_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=8007&p_r_p_-996514994_topicoId=8753). Acesso em: 22 jan. 2018.
- PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A. F. S.; VÉRAS, S. M. **Doenças da Bananeira no Estado do Amazonas (3ª Edição Revisada)**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2003. (Circular Técnica, 20).
- PEREIRA, L. V.; NORMANDO, M. C. S. Sobrevivência de *Pseudomonas solanacearum* raça 2 em solos de terra-firme no Estado do Amazonas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 137-142, 1993.
- PINHEIRO, C. R.; AMORIM, J. A. E.; DINIZ, L. E. C.; SILVA, A. M. F.; TALAMINI, V.; SOUZA JÚNIOR, M. T. 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.
- PRIOR, P.; AILLOUD, F.; DALSING, B. L.; REMENANT, B.; SANCHEZ, B.; ALLEN, C. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC Genomics**, London, v. 17, n. 1, p. 90-101, 2016.
- POUSSIER, S.; TRIGALET-DEMERY, D.; VANDERWALLE, P.; GOFFINET, B.; LUISETTI, J.; TRIGALET, A. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. **Microbiology**, v. 146, p. 1679- 1692, 2000.

- RATHAUR, P. S.; SINGH, D.; RAGHUWANSHI, R.; YADAVA, D. K. Pathogenic and genetic characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races based on rep-PCR and multilocus sequence analysis. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, San Mateo, v. 6, p.317, 2015.
- REMENANT, B., DE CAMBIAIRE, J.C., CELLIER, G.; JACOBS, J. M.; MANGENOT, S.; BARBE, V.; LAJUS, A. VALLENET, D.; MEDIGUE, D.; FGAN, D.; ALLEN, C.; PRIOR, P. *Ralstonia syzygii*, the blood disease bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. 1-10, 2011.
- REMENANT, B.; COUPAT-GOUTALAND, B.; GUIDOT, A.; CELLIER, G.; WICKER, E.; ALLIEN, C.; FEGAN, M.; PRUVOST, O.; ELBAZ, M.; CALTEAU, A.; PRIOR, P. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 6, p. 379, 2010.
- ROBBS, C. F. "Moko" da bananeira e outras bacterioses de cultivos tropicais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 3, p. 534-535, 1983.
- ROBBS, C. F. KIMURA, O. **Moko ou murcha bacteriana da bananeira**. Brasília-DF, DNPV/DDSV, 1976. n.p.
- ROBERTS, S.; EDEN-GREEN, S.; JONES, P.; AMBLER D. *Pseudomonas syzygii* sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1990.
- RODRIGUES, L. M. R.; DESTEFANO, S. A. L.; SILVA, M. J.; COSTA, G. G. L.; MARINGONI, A. C. Characterization of *Ralstonia solanacearum* from Brazil using molecular methods and pathogenicity tests. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 94, n. 3, p. 505-516, 2012.
- RORER, J. B. A bacterial disease of bananas and plantains. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 1, p. 45-49, 1911.
- SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L.; KAPPLER, U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *R. solanacearum* and *R. syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii*, *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *Indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *Celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotypes I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 64, n. 9, p. 3087-103, 2014.
- SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULT, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J. C.; CATTOLICO, L.; CHANDLER, M.; CHOISNE, N.; CLAUDEL-RENARD, C.; CUNNAC, S.; DEMANGE, N.; GASPIN, C.; LAVIE, M.; MOISAN, A.; ROBERT, C.; SAURIN, W.; SCHIEX, T.; SIGUIER, P.; THÉBAULT, P.; WHALEN, M.; WINCKER, P.; LEVY, M.; WEISSENBACH, J.; BOUCHER, C. A. . Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, London, v. 415, p. 497-502, 2002.
- SAILLE, E. MCGARVEY, J.; SCHELL, M.; DENNY, T. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 12, 1264-71, 1997.
- SALOMÃO, L. C.; SIQUEIRA, D. L. **Cultivo da bananeira**. UFV, 2015. 109 p.
- SANTIAGO, T. R.; LOPES, C. A.; CAETANO-ANOLLES, G.; MIZUBUTI, E. S. G. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. **Plant Pathology**, Dordrecht, v. 66, n. 3, p. 383-392, 2016.
- SEQUEIRA, L. **Bacterial wilt: The missing element in international banana improvement programs**. In: PRIOR, P.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. (Eds.) *Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects*. Berlin: Springer, 1998. p. 6-14.
- SEQUEIRA, L.; AVERRE, C. Distribution and pathogenicity of strains of *Pseudomonas solanacearum* from virgin soils in Costa Rica. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 45, p. 435-440, 1961.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana, 1949. 132 p.

SILVA, J. R. **Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões norte e nordeste do Brasil**. 2014, 48 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVEIRA, J. R. P., DUARTE, V., MORAES, M. G., OLIVEIRA, A. M. R., BARNI, V.; MACIEL, J. L. N. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-rep e RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 615-622, 2005.

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.

SMITH, E. F. **Bacteria in relation to plant disease**. Carnegie Institute, Washington, 1914. v. 3, 309 p.

SMITH, J. J.; OFFORD, L.C.; HOLDRNESS, M.; SADDLER, G.S. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (Synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. **Applied and Environmental Microbiology**, Basel, v. 6, p. 4263-4268, 1995.

STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotypic diversity: estimation and prediction in 550 samples. **Genetics**, Madison, v. 118, n. 4, p. 705-711, 1988.

STOVER, R. H. **Banana, plantain, and abaca diseases**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England: 1972, 316 p.

STULBERG, M. J.; HUANG, Q. 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**, Netherlands, v. 123, n. 1, p. 101-107, 2016.

TALAMINI, V.; SILVA, A. M. F.; ALMEIDA, N. A.; MORAES, A. C.; WARWICK, D. R. N.; NASCIMENTO, M. A. A.; DEVI, C. K. **Situação do moko da bananeira no Estado de Sergipe**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 2010. 16p. (Boletim Técnico, 159).

TAVASOLI, E.; MAREFAT, A. R.; HASSANZADEH, N. Identity and genetic diversity of *Pectobacterium* spp., causal agents of potato soft rot in Zanjan, Iran. **African Journal of Plant Science**, Lagos, v. 5, n. 6, p.329-336, 2011.

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.

VAN DER WOLF, J. M.; BONANTS, P. J.; SMITH, J. J.; HAGENAAAR, M.; NIJHUIS, E.; VAN BECKHOVEN, J. R.C. M.; SADDLER, G. S.; TRIGALET, A.; FEUILLADE, R. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. In: PRIOR P., ALLEN C., ELPHINSTONE J. (Ed.) **Bacterial Wilt Disease**. Berlin: Springer, 1998. p. 44-49.

VANEECHOUTTE, M.; KAMPFER, P.; DE BAERE, T.; FALSEN, E.; VERSCHRAEGEN, G. *Wautersiagen* nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia (Pseudomonas) syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 2, p. 317-327, 2004.

VASSE, J.; FREY, P.; TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 8, n. 2, p. 241-251, 1995.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUJIN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and cellular biology**, London, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.

WARDLAW, C. W. **Banana Diseases Including Plantains and Abaca**. 2.ed. London. Longman. 1972. 878 p.

WICKER, E.; GRASSART, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M.

*Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 21, p. 6790-6801, 2007.

WICKER, E.; LEFEUVRE, P.; DE CAMBIAIRE, J. C.; POUSSIER, S.; PRIOR, P. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. **International Society Microbial Ecology Journal**, London, v. 6, n. 5, p. 961-974, 2012.

WRIGHT, S. Statistical methods in biology. **Journal of the American Statistical Association**, New York, v. 26, n. 173A, p. 155-163, 1931.

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

XUE, Q. Y.; YIN, Y.N.; YANG, W.; HEUER, H.; PRIOR, P.; GUO, J. H.; SMALLA, K. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China assessed by PCR-based fingerprints to unravel host plant- and site-dependent distribution patterns. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 507–519, 2011.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAW, M. Validation. of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 43, n. 2, p. 398-399, 1993.

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

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJBS. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 46, n. 2, p. 625-626, 1996.

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

ZHAN, J.; MUNDT, C. C.; HOFFER, M. E.; MCDONALD, B. A. Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 15, n. 4, 634-647, 2002.

ZHANG, Y.; QIU, S. Phylogenomic analysis of the genus *Ralstonia* based on 686 single-copy genes. **Antonie van Leeuwenhoek.**, Switzerland, v. 109, n. 1, 71-82, 2016.

ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; COUTO, M. A.; MORAIS, L. K. D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 10, p. 975-980, 2005.



## CAPÍTULO II

---

---

### **ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Ralstonia solanacearum* ECOTIPO MOKO NOS ESTADOS DO AMAZONAS E DE SERGIPE**

*Submeter à Australasian Plant Pathology*

1 **Estrutura de populações de *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko nos estados do**  
2 **Amazonas e de Sergipe**

3  
4 J. R. Silva<sup>A</sup>, A. M. F. Silva<sup>A</sup>, G. M. R. Albuquerque<sup>A</sup>, E. B. Souza<sup>B</sup>, R. A. Coelho Netto<sup>C</sup>, R. L.  
5 R. M. Mariano<sup>A</sup>,

6  
7 <sup>A</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel  
8 de Medeiros, Dois Irmãos, Recife, Brasil.

9 <sup>B</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de  
10 Medeiros, Dois Irmãos, Recife, Brasil.

11 <sup>C</sup>INPA-CSAS Campus III - Laboratório de Fitopatologia, Av. André Araújo, Petrópolis,  
12 Manaus, Brasil.

13  
14 **RESUMO**

15 O Moko da bananeira, causado pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, é uma das principais  
16 doenças da cultura, na região amazônica do Brasil, sendo fator limitante à produção. O difícil  
17 controle da doença, se deve, entre outros fatores, à variabilidade de *R. solanacearum*, que é  
18 uma praga quarentenária presente restrita a todos os estados da região Norte, com exceção do  
19 Acre; e restrita ao de Sergipe, na região Nordeste. Foi estudada a diversidade genética de 47  
20 isolados do complexo *R. solanacearum* causando murcha bacteriana em bananeira, no estado  
21 do Amazonas (região Norte), ao nível de espécie, filotipo e sequevar. Na análise da estrutura  
22 genética de populações de *R. solanacearum*, ecotipo Moko, o primeiro estudo compreendeu  
23 três subpopulações baseadas na combinação entre a localização geográfica e classificação  
24 climática: as subpopulações AbSM (Amazonas, baixo Solimões e rio Madeira com clima de  
25 monção) e AmaS (Amazonas, médio e alto Solimões com clima equatorial), no estado do  
26 Amazonas; e a subpopulação SbSF (Sergipe, baixo São Francisco com clima de estepe quente)  
27 em Sergipe (região Nordeste). O segundo estudo compreendeu duas subpopulações do  
28 Amazonas, sendo baseadas nos ecossistemas de plantio, Atf (Amazonas, terra firme) e Av  
29 (Amazonas, várzea). Todos os isolados do Amazonas foram identificados como *R.*  
30 *solanacearum* filotipo II. A análise filogenética do gene *egl* revelou a presença das sequevares  
31 IIA-24 (43 isolados) e IIA-4 (4 isolados), representando 91,5% e 8,5% da população,  
32 respectivamente. As subpopulações de *R. solanacearum* ecotipo Moko, do Amazonas e de  
33 Sergipe, possuem alta variabilidade genética. Foram detectadas duas subpopulações de *R.*  
34 *solanacearum* ecotipo Moko, uma formada por isolados do Amazonas e a outra formada pelos  
35 isolados de Sergipe. Houve presença de fluxo gênico e ausência de estruturação entre as  
36 subpopulações do Amazonas e estruturação entre a subpopulação de Sergipe e a subpopulação  
37 do Amazonas. No Amazonas, nem a condição climática, nem o ecossistema de plantio  
38 influenciaram o suficiente para diferenciar as subpopulações; no entanto, a variabilidade da

39 subpopulação de terra firme foi maior que a de várzea. A ausência de recombinação nas  
40 subpopulações de *R. solanacearum* ecotipo Moko nos estados do Amazonas e Sergipe indica  
41 que este não é o principal mecanismo responsável por gerar variabilidade nesta espécie, nas  
42 populações estudadas. Este é o primeiro trabalho que analisou a estrutura genética de  
43 populações de *R. solanacearum* ecotipo Moko, nos estados do Amazonas e de Sergipe.

44 **Palavras chaves:** filotipo, sequevar, endoglucanase, estruturação, populações

45

#### 46 **ABSTRACT**

47 The Moko disease of bananas caused by the bacterium *Ralstonia solanacearum*, is one of the  
48 main diseases of this crop, in the Amazon region of Brazil, being a limiting factor of the  
49 production. The difficult control of the disease is due, among other factors, to the variability of  
50 *R. solanacearum*, which is a present quarantine pest restricted to all the states of the North  
51 region, except for Acre; and restricted to the state of Sergipe, in the Northeast region. The  
52 genetic diversity of 47 isolates of the *R. solanacearum* complex causing bacterial wilt in the  
53 state of Amazonas (North region) was studied at the level of species, phylotype and sequevar.  
54 In the analysis of the population genetic structure of *R. solanacearum*, Moko ecotype, the first  
55 study comprised three subpopulations based on the combination of a geographic location and  
56 climatic classification: the subpopulations AbSM (Amazonas, low Solimões and Madeira river  
57 with monsoon climate) and AmaS (Amazonas, medium and high Solimões with equatorial  
58 climate) in Amazonas state; and a subpopulation SbSF (Sergipe, low São Francisco with a warm  
59 aesthetic climate) in Sergipe. The second study comprised two subpopulations of the Amazon,  
60 being based on the planting ecosystems, Atf (Amazonas, dryland) and Av (Amazonas, wetland).  
61 All strains from the Amazon were identified as *R. solanacearum* phylotype II. A phylogenetic  
62 analysis of the *egl* gene revealed the presence of sequevars IIA-24 (43 isolates) and IIA-4 (4  
63 isolates) representing 91.5% and 8.5% of the population, respectively. The subpopulations of  
64 *R. solanacearum* ecotype Moko from Amazonas and Sergipe showed high genetic variability.  
65 Two subpopulations of *R. solanacearum* ecotype Moko were detected, one formed by isolates  
66 from Amazonas and the other formed by Sergipe isolates. There was presence of gene flow and  
67 no structuring between subpopulations of Amazonas and structuring between the subpopulation  
68 of Sergipe and the subpopulation of Amazonas. In Amazonas, neither a climatic condition nor  
69 the planting ecosystem influenced enough to differentiate subpopulations. However, the  
70 variability of the subpopulation highland was greater than that of lowland. The absence of  
71 recombination in the subpopulations of *R. solanacearum* ecotype Moko in the states of  
72 Amazonas and Sergipe indicates that this is not the main mechanism responsible for generating

73 variability in this species in the populations studied. This is the first work that analyzed the  
74 genetic structure of populations of *R. solanacearum* ecotype Moko, in the states of Amazonas  
75 and Sergipe.

76 **Keywords:** phylotype, sequevar, endoglucanase, structuring, populations

77

78

## 79 **Introdução**

80

81 A murcha bacteriana é uma importante doença da bananeira, principalmente na região  
82 amazônica do Brasil, onde é considerada fator limitante para a produção. No estado do  
83 Amazonas, o cultivo da bananeira é realizado nas várzeas altas, raramente alagadas, e nas áreas  
84 livres das enchentes, chamadas de terra firme. Nestes locais, a murcha bacteriana tem causado  
85 grandes perdas de produção e abandono de áreas de cultivo. A disseminação do patógeno para  
86 novas áreas é feita, geralmente, por mudas infectadas (Coelho Netto et al. 2004) ou pelo  
87 descarte de plantas com sintomas da doença no rio Solimões.

88 Para representar melhor a alta diversidade genética de *R. solanacearum*, Fegan e Prior  
89 (2005) propuseram um sistema de classificação hierárquica, onde o complexo de espécies de  
90 *R. solanacearum* é subdividido em quatro filotipos que correspondem a quatro grupos  
91 genéticos, sendo o filotipo I, encontrado principalmente na Ásia; o filotipo II proveniente das  
92 Américas; o filotipo III, oriundo da África e ilhas vizinhas; e o filotipo IV proveniente  
93 principalmente da Indonésia, mas também encontrado na Austrália e Japão. O filotipo IV é  
94 constituído por duas espécies intimamente relacionadas: a blood disease bacterium (BDB) e *R.*  
95 *syzygii*. Cada filotipo é composto de um número de sequências variantes ou sequevares (Fegan  
96 e Prior 2005) e atualmente existem 59 sequevares representando o complexo de espécies *R.*  
97 *solanacearum* (Silva 2014). Mais recentemente, a taxonomia polifásica para isolados  
98 pertencentes ao complexo de espécies *R. solanacearum*, demonstrou que o mesmo compreende  
99 três genoespécies (Safni et al. 2014). Os isolados pertencentes ao filotipo II permaneceram  
100 como *R. solanacearum*. No filotipo IV, os isolados de *R. solanacearum* da Indonésia, *R. syzygii*  
101 e BDB, foram reclassificados como *R. syzygii* subsp. *indonesiensis*, *R. syzygii* subsp. *syzygii* e  
102 *R. syzygii* subsp. *celebesensis*, respectivamente. A terceira genoespécie, composta de isolados  
103 pertencentes aos filotipos I e III, foi renomeada *R. pseudosolanacearum*.

104 Dentro desses sistemas de classificação, todos os isolados de *R. solanacearum*  
105 associados à murcha bacteriana, até o momento, estão filogeneticamente distribuídos dentro do  
106 filotipo II e subdivididos nas linhagens IIA e IIB (Cellier e Prior 2010; Fegan e Prior 2006).  
107 Mais especificamente, *R. solanacearum* associada à murcha bacteriana pertence às sequevares

108 IIA-6, IIA-24, IIA-41, IIA-53, IIB-3, IIB-4 e IIB-25 (Albuquerque et al. 2014; Fegan e Prior  
109 2006; Wicker et al. 2009). A expansão da variabilidade dessa espécie tem sido observada, com  
110 a ocorrência no Brasil, de três sequevares antes não relatados em associação à murcha da  
111 bananeira (IIA-41, IIA-53 e IIB-25), sendo um deles nunca antes descrito (IIB-53)  
112 (Albuquerque et al. 2014).

113 A diversidade do complexo *R. solanacearum* é pouco conhecida no Brasil, embora até  
114 o momento apenas a espécie *R. solanacearum* esteja associada a murcha bacteriana  
115 (Albuquerque et al. 2014). Entretanto, não se descarta a hipótese de que isolados de outras  
116 espécies possam infectar a banana no Brasil, a exemplo de *R. syzygii* subsp. *celebesensis*, ainda  
117 não detectada em bananais brasileiros.

118 Entende-se como variabilidade, a variação dentro de uma mesma espécie, a exemplo de  
119 subespécies e sequevares. Entretanto, a diversidade refere-se ao número de diferentes espécies  
120 de organismos vivos que estão representadas numa mesma comunidade, habitat ou região (Melo  
121 2008). A variabilidade genética quanto a filotipos e sequevares tem sido estudada com base em  
122 métodos de sequência de nucleotídeos, sendo os mais utilizados: sequências de genes da  
123 endoglucanase (*egl*) e de reparo do DNA (*mutS*) (Fegan e Prior 2005).

124 A estrutura genética da população de um patógeno refere-se a quantidade e distribuição  
125 da variação genética nos indivíduos, entre os indivíduos e entre populações. Esta variação é  
126 determinada pela história evolutiva desta população resultante da atuação combinada das forças  
127 de seleção, mutação, deriva e fluxo gênico (McDonald e Linde 2002). Estudos de genética de  
128 população permitem inferir como os patógenos emergiram, evoluíram e se adaptaram aos  
129 hospedeiros, fungicidas, ou outros fatores (McDonald e Linde 2002; Grünwald e Goss 2011).  
130 Possibilita ainda entender os processos evolutivos que moldaram uma população no passado e  
131 deduzir o futuro evolutivo potencial das populações (McDonald e Linde 2002). Este  
132 conhecimento tem aplicação direta na agricultura e na compreensão da relação patógeno-  
133 hospedeiro (Milgroom 2015), podendo aprimorar o uso estratégico de genes de resistência a  
134 doenças de plantas, aumentando seu tempo de ação e reduzindo as perdas causadas em  
135 decorrência da redução de eficácia deste método (McDonald e Linde 2002).

136 A variabilidade genética de *R. solanacearum* caracterizando filotipos, hospedeiros,  
137 biovares e biotipos tem sido analisada pelo marcador genético BOX-PCR, no Brasil (Coelho  
138 Netto et al. 2004; Costa et al. 2007) e Filipinas (Ivey et al. 2007). No Brasil, entretanto, apesar  
139 da importância da murcha bacteriana da bananeira, a estrutura populacional de *R. solanacearum*  
140 foi apenas estudada em pimentão utilizando-se a técnica rep-PCR com os marcadores REP e  
141 BOX (Garcia et al. 2013) e em ampla gama de hospedeiros empregando-se BOX-PCR

142 (Santiago 2014).

143 Considerando a necessidade de novos estudos de diversidade e estrutura genética de  
144 populações de isolados do complexo *R. solanacearum* associados a murcha bacteriana da  
145 bananeira no Brasil, os objetivos do presente trabalho foram: i) avaliar a diversidade genética  
146 do complexo *R. solanacearum* no estado do Amazonas e ii) analisar a estrutura de populações  
147 deste complexo nos estados do Amazonas e de Sergipe.

148

## 149 **Material e Métodos**

150

### 151 **Coleta de isolados**

152

153 As visitas para coleta de material vegetal infectado foram realizadas em plantios de  
154 bananeiras em regiões de várzea e terra firme em nove municípios do estado do Amazonas:  
155 Anori, Benjamin Constant, Coari, Codajás, Fonte Boa, Manicoré, Novo Airão, Parintins e Tefé  
156 (Fig. 1). Plantas com sintomas de murcha e escurecimento do sistema vascular, tecidos de  
157 pseudocaulis e frutos foram amostrados e etiquetados. Os isolamentos do patógeno foram  
158 realizados (Souza et al. 2016) até 72 h após a coleta em meio TZC (cloreto de trifenil tetrazólio)  
159 (Kelman 1954). Após 48 h, colônias circulares a irregulares, fluidas, com consistência cremosa  
160 e de cor branca com centro róseo foram purificadas e preservadas em tubos de criogenia  
161 contendo água destilada esterilizada (Mariano et al. 2016).

162

### 163 **Extração de DNA**

164

165 A extração do DNA foi realizada a partir de crescimento bacteriano em meio TZC a  
166 30°C por 48 h com o auxílio do kit PureLink® Genomic DNA (Thermo Scientific, San Jose,  
167 USA) seguindo a metodologia do fabricante. Após a extração, o DNA foi eluído em água  
168 ultrapura, quantificado em espectrofotômetro modelo BioChrome WPA (Biowave DNA  
169 Spectrophotometer, Harvard, USA), submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8% para  
170 avaliar a integridade do DNA e armazenado a -20°C.

171

### 172 **Identificação da espécie/filotipo/sequenar**

173

174 A determinação de filotipo foi realizada por meio da técnica filotipo multiplex (Pmx-  
175 PCR) utilizando-se os iniciadores 759/760 (Invitrogen, São Paulo, Brasil) os quais amplificam

176 um fragmento específico de 280 pb para o complexo *R. solanacearum*, e um conjunto de quatro  
177 iniciadores específicos da série Nmult (Invitrogen), os quais amplificam fragmentos de 144,  
178 372, 91 e 213 pb para os filotipos I, II, III e IV, respectivamente (Fegan e Prior 2005). As  
179 reações foram preparadas em PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) contendo mix dos  
180 iniciadores (Nmult 21:1F, Nmult 21:2F, Nmult 22:INF, Nmult 23:AF e Nmult 22:RR - 2µM  
181 cada; 759 e 760 - 1µM cada), DMSO (5%) e DNA (100 ng) e ajustadas com água ultrapura para  
182 um volume final de 25 µl. As condições de amplificação foram desnaturação inicial a 96°C por  
183 5 min, 30 ciclos de 94°C por 15 s, 59°C por 90 s e 72°C por 90 s e extensão final de 72°C por  
184 10 min, realizada em termociclador modelo SimpliAmp™ (Thermo Fisher Scientific,  
185 Massachusetts, EUA) (Fegan e Prior 2005). Os produtos de PCR foram corados com SYBR  
186 Gold (Invitrogen), submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5 X (5,4 g de  
187 Tris-base; 2,75 g de ácido bórico e 0,375 g de EDTA, para 1000 ml) e visualizados em  
188 fotodocumentador modelo Digi Doc-It® (UVP, Upland, Canadá). O marcador 100 pb DNA  
189 ladder (Thermo Scientific) foi utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados.  
190 Para a determinação de sequevar através do Moko multiplex (Mmx-PCR) utilizou-se um  
191 conjunto de quatro pares de iniciadores específicos IS24F, IS24R; MUS20F, MUS20R; SI28F,  
192 SI28R e VC46F, VC46R que identificam as sequevares 3 (400pb), 4 (351pb), 6 (220 pb) e 24  
193 (100pb), respectivamente.

194

### 195 **Amplificação e sequenciamento parcial do gene *egl***

196 As sequências parciais do gene *egl* (750 pb) foram amplificadas com os iniciadores  
197 Endo-F (5'-ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3')/Endo-R (5'-  
198 GCGTTGCCCGGCACGAACACC-3') (Wicker et al. 2007). A mistura de reação (50 µl  
199 volume total) foi composta por: tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl) (1X); MgCl<sub>2</sub>  
200 (1,5mM); dNTPs (0,2mM); iniciador (2 µM); Taq DNA Polimerase (Fermentas Life Sciences,  
201 Waltham, Massachusetts, USA) (2 U) e DNA (100 ng). As reações foram amplificadas em  
202 termociclador modelo SimpliAmp™ (Thermo Fisher Scientific) e submetidas às seguintes  
203 condições: desnaturação inicial a 96°C por 9 min, seguindo-se 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min  
204 a 70°C e 2 min a 72°C e extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos de PCR foram submetidos  
205 à eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado em TBE 0,5X durante 1,5 h, junto com o  
206 marcador Gene-Ruler 100 pb DNA Lader (Thermo Scientific). A purificação dos produtos da  
207 PCR foi feita com o kit de purificação PCR Clean Up (Axygen Biosciences, California, USA)  
208 e os sequenciamentos realizados pela Macrogen® (Coréia do Sul).

209

## 210 **Análises filogenéticas**

211

212 As sequências parciais dos genes *egl* foram analisadas e os contigs montados utilizando-  
213 se o software Staden Package versão 2.0 (Staden et al. 1998). As sequências parciais montadas  
214 foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W (Tompson et al. 1994) pelo software MEGA  
215 versão 7.0 (Kumar et al. 2016) e manualmente ajustadas para obter máxima similaridade entre  
216 as sequências. As relações filogenéticas entre as sequências foram analisadas pelos métodos de  
217 Neighbor-Joining (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML). A análise de NJ foi realizada com o  
218 algoritmo de Jukes e Cantor com auxílio do programa MEGA versão 7.0 e a análise de ML foi  
219 realizada utilizando o CIPRES Science Gateway v.3.3 (<https://www.phylo.org>) com RAxML-  
220 HPC2 on SEDE.

221

## 222 **Genotipagem com BOX-PCR e análise da diversidade genética**

223

224 Para o estudo de estrutura de populações foram utilizados 58 isolados de *R.*  
225 *solanacearum* ecotipo Moko, sendo 47 isolados obtidos neste trabalho no estado do Amazonas  
226 (região Norte) e 11 isolados do estado de Sergipe (região Nordeste) (Tabela 1, Figura 1), todos  
227 depositados na Coleção de Culturas Rosa Mariano do Laboratório de Fitobacteriologia da  
228 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil (CCRM).

229 As reações de BOX-PCR foram compostas por uma mistura de reação (50 µl volume  
230 total) contendo PCR Master Mix (1X), iniciador (2 µM) e DNA (200 ng). Foi utilizado o  
231 iniciador BOXAIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Louws et al. 1994). As  
232 condições de amplificação consistiram de desnaturação inicial a 95°C por 7 min; seguida por  
233 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 65°C por 8 min, e uma extensão  
234 final a 65°C por 15 min. De cada amostra, 12 µL foram corados com SYBR Gold (Invitrogen)  
235 (10X), submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 3 h, junto com os marcadores  
236 GeneRuler 100 pb DNA Lader e GeneRuler 1Kb DNA lader (Thermo Scientific) e visualizados  
237 em fotodocumentador modelo Digi Doc-It® (UVP, Upland, Canadá). Foi construída uma matriz  
238 binária, onde cada banda visualizada foi marcada como presente (1) ou ausente (0) para cada  
239 isolado.

240 Foram realizadas duas análises de estrutura genética de populações. A primeira  
241 compreendeu três subpopulações baseadas na combinação entre localização geográfica e  
242 classificação climática: as subpopulações AbSM (Amazonas, baixo Solimões e rio Madeira,  
243 com clima de monção) e AmaS (Amazonas, médio e alto Solimões, com clima equatorial), no



244 estado do Amazonas e a subpopulação SbSF (Sergipe, baixo São Francisco, clima de estepe  
245 quente) no estado de Sergipe. A segunda análise compreendeu duas subpopulações baseadas  
246 nos ecossistemas de plantio, a subpopulação Atf (Amazonas, terra firme) e a subpopulação Av  
247 (Amazonas, várzea), ambas no estado do Amazonas.

248 A estrutura genética de populações foi inferida através de vários parâmetros que  
249 avaliaram a diversidade genética natural: diversidade genotípica estimada pelo índice G de  
250 Stoddart e Taylor (1988); diversidade gênica pelo índice de Shannon-Weaver (Shannon e  
251 Weaver 1949); fração clonal estimada pela fórmula  $(N-G)/G$ , em que N é o tamanho da amostra  
252 e G o número de genótipos (Zhan et al. 2002); riqueza genotípica  $E(gn)$  utilizando curvas de  
253 rarefação (Grunwald et al. 2003); equitabilidade genotípica (E5) (Alatalo 1981; Grünwald et  
254 al. 2003; Ludwig e Reynolds 1988); número de haplótipos e índice de diversidade de Simpson  
255 ( $\Lambda$ ) (He e Hu 2005). Além disso, foi construída uma rede de haplótipos.

256 Para analisar o desequilíbrio de ligação em todas as populações foi calculado o índice  
257 de associação ( $I_A$ ) (Maynard Smith et al. 1993) e o índice alternativo  $r_{barD}$  ( $r_d$ ), que é menos  
258 sensível à variação do número de locus (Agapow e Burt 2001).

259 Também foi realizada a análise discriminante de componentes principais (DAPC)  
260 (Jombart et al. 2010). Todas as análises acima citadas foram executadas pelo programa R versão  
261 2.15.0 (R development core team 2011). Além disso, a análise de variância molecular  
262 (AMOVA), utilizada para estimar a variação entre e dentro das subpopulações, e a  
263 diferenciação genética entre populações por  $F_{st}$  (Wright 1951), foram realizadas com o auxílio  
264 do software Arlequin versão 3.5.2.2 (Excoffier et al. 2005).

265

## 266 **Resultados**

267

### 268 **Coleta de isolados**

269

270 Bananeiras com sintomas de murcha bacteriana foram encontradas em 78% dos  
271 municípios visitados e 47 isolados foram obtidos (Tabela 1). Nos municípios de Anori e Novo  
272 Airão, em nenhum dos bananais foram encontrados sintomas de murcha bacteriana (Fig. 1).

273

### 274 **Identificação da espécie/filotipo/sequevar**

275

276 A análise de filotipo Multiplex (Pmx-PCR) para todos os isolados coletados resultou na  
277 amplificação de um fragmento com 280 pb, específico para o complexo *R. solanacearum* e

278 outro fragmento de 372 pb, indicando que os isolados pertencem ao filotipo II, correspondente  
279 à espécie *R. solanacearum*. O Moko multiplex (Mmx-PCR) identificou as sequevars IIA-24  
280 (100pb) e IIB-4 (351pb) no estado do Amazonas, com prevalência de 91,5% da sequevar IIA-  
281 24.

282

### 283 **Análises filogenéticas**

284

285 A relação filotipo e sequevar dos isolados foi revelada através da reconstrução  
286 filogenética a partir do sequenciamento parcial do gene *egl* (Fig. 2). As seqüências dos 47  
287 isolados obtidos foram comparadas com 60 seqüências de referência do gene *egl* da base de  
288 dados do GenBank representando todos os filotipos e sequevars (Tabela 2). A árvore  
289 filogenética do gene *egl* revelou dois haplótipos, confirmando a presença das sequevars IIA-  
290 24 (43 isolados) e IIB-4 (4 isolados) para *R. solanacearum*, anteriormente obtidos pelo Mmx-  
291 PCR. Com base nestes resultados, a partir deste ponto a murcha da bananeira será referida como  
292 Moko da Bananeira e a bactéria como *R. solanacearum* ecotipo Moko.

293

### 294 **Genotipagem com BOX-PCR**

295

296 Todos os 58 isolados de *R. solanacearum* ecotipo Moko produziram 21 bandas que  
297 variaram entre 500 e 10.000 pb. Um total de 28 haplótipos foram derivados a partir do padrão  
298 de multilocus. Pela rede de haplótipos (Fig. 3a) foi possível observar que as subpopulações  
299 AbSM e AmaS compartilham haplótipos entre si, indicando a presença de fluxo gênico,  
300 enquanto que a subpopulação SbSF não compartilha haplótipos com as subpopulações AbSM  
301 e AmaS. A fração clonal variou de 23,0% para a população AbSM a 56,0% para AmaS (Tabela  
302 3). A diversidade genotípica (G) encontrada foi alta para as subpopulações do estado do  
303 Amazonas e baixa para a subpopulação do estado de Sergipe. A diversidade gênica ( $H_e$ ) foi de  
304 2,11; 1,60 e 1,42 para as subpopulações AbSM, AmaS e SbSF, respectivamente. Houve alta  
305 equitabilidade genotípica, variando de 0,62 para SbSF a 0,88 para AbSM.

306 Na análise discriminante de componentes principais - DAPC (Fig. 4) foi observada  
307 ausência de estruturação entre as subpopulações AbSM e AmaS, enquanto na subpopulação  
308 SbSF houve estruturação em relação às subpopulações do estado do Amazonas. O valor de  $F_{ST}$   
309 entre as populações AbSM e AmaS foi 0,01; entre AbSM e SbSF foi 0,38; e entre AmaS e SbSF  
310 0,41, com ocorrência de 23 indivíduos migrantes entre as populações AbSM e AmaS (Tabela

311 5). Pela análise de variância molecular (AMOVA) a porcentagem de variação entre as  
312 subpopulações foi 25,1%, enquanto que dentro das subpopulações foi 74,8% (Tabela 4).

313 Na análise das subpopulações de *R. solanacearum* ecotipo Moko Atf (Amazonas, terra  
314 firme) e Av (várzea) no estado Amazonas (Tabela 6) observou-se uma diversidade genotípica  
315 (G) de 6,91 para Atf e 4,25 para Av enquanto a diversidade gênica ( $H_E$ ) foi de 2,15 para Atf e  
316 1,83 para Av. Houve alta equitabilidade genotípica, sendo de 0,88 para Atf e de 0,73 para Av.  
317 Pela rede de haplótipos (Fig. 3b) foi possível observar que as subpopulações Atf e Av  
318 compartilham haplótipos, indicando a ocorrência de fluxo gênico. Também foi observada a  
319 presença de dois haplótipos compartilhados com alta frequência (Fig. 3b). O haplótipo 2  
320 (MLG12) apresentou uma frequência de 0,44 na subpopulação do ecossistema de várzea.

321 Na análise DAPC (Fig. 5) foi observada ausência de estruturação entre as  
322 subpopulações Atf e Av. O valor de  $F_{ST}$  entre as subpopulações Atf e Av foi de 0,0073. Pela  
323 análise de variância molecular (AMOVA) a porcentagem de variação entre as subpopulações  
324 foi 0,7%, enquanto que dentro das subpopulações foi 99,2% (Tabela 7).

325 O índice de Associação  $I_A$  e o índice alternativo  $r_{bD}$  ( $r_d$ ) para todas as três regiões  
326 AbSM, AmaS e SbSF foram significativamente diferentes de 0 ( $P < 0,001$ ) (Tabela 3). Sendo  
327 assim, não há evidências de recombinação nestas subpopulações de *R. solanacearum* ecotipo  
328 moko. No caso dos ecossistemas Atf e Av, o índice de Associação  $I_A$  e o índice alternativo  
329  $r_{bD}$  ( $r_d$ ) foram determinados para a população total e indicaram que a população não está em  
330 equilíbrio de ligação, assim como verificado no caso anterior (Tabela 6).

331

## 332 **Discussão**

333

334 Este é o primeiro trabalho que analisa a estrutura genética de populações de *R.*  
335 *solanacearum* ecotipo Moko, nos estados do Amazonas e Sergipe.

336 *R. solanacearum* ecotipo Moko foi confirmada como única espécie associada a murcha  
337 em bananeiras nos principais municípios produtores do estado do Amazonas, confirmando a  
338 importância desse patógeno, como já relatado por Albuquerque et al. (2014), Coelho Netto et  
339 al. (2004) e Pinheiro et al. (2011).

340 Apenas as sequevares IIA-24 e IIB-4 foram encontradas no estado do Amazonas,  
341 embora no Brasil já tenham sido detectadas as sequevares IIA-6, IIA-24, IIB-25, IIA-41 e IIA-  
342 53 associadas à murcha bacteriana da bananeira (Albuquerque et al., 2014). Dentre estas, as  
343 sequevares IIB-25 e IIA-41 previamente relatadas no Amazonas (Albuquerque et al. 2014) não  
344 foram detectadas neste trabalho. Entretanto, a sequevar IIB-4 também foi relatada por Santiago

345 et al. (2016). Considerando os resultados obtidos neste estudo juntamente com os dados de  
346 Albuquerque et al. (2014) e Rodrigues (2010), pode-se concluir que IIA-24 é a sequevar  
347 associada ao Moko prevalente no Brasil.

348 Segundo Sanchez (2016) a distribuição das sequevares de *R. solanacearum* nos países  
349 onde ocorre o Moko da bananeira é: sequevar IIB-4 ocorre no Brasil, Colômbia, Peru, Costa  
350 Rica, Estados Unidos, Martinica, Guiana Francesa e Malásia (Zulperi e Sijam, 2014); sequevar  
351 IIA-6 em Granada, Brasil, Colômbia, Venezuela, Estados Unidos, Honduras, Guatemala,  
352 Guiana Francesa e México. É interessante que as sequevares IIA-24, IIB-25, IIA-41 e IIA-53  
353 só foram relatadas no Brasil, onde são encontradas todas as sequevares relacionadas a murcha,  
354 exceto a IIB-3 que só ocorre nas Filipinas, Costa Rica e Honduras. Esta alta variabilidade de *R.*  
355 *solanacearum* associada a murcha bacteriana no Brasil, aponta este país não apenas como  
356 centro de origem, mas também, como centro de diversidade do filotipo II na região Amazônica  
357 (Wicker et al. 2012). Segundo estes autores, espécies do complexo *R. solanacearum* foram  
358 originadas na Oceania/Indonésia, e então migraram para a África e depois para a América do  
359 Sul e Ásia, provavelmente antes da separação geológica do continente ancestral, Gondwana.

360 Os índices de diversidade genética refletiram a variabilidade das subpopulações de *R.*  
361 *solanacearum* ecotipo Moko no estado do Amazonas. Quando comparada com as demais  
362 subpopulações, a subpopulação AbSM apresentou menor proporção de clones. Seguindo esta  
363 tendência, AbSM apresentou os mais altos valores de diversidade genotípica, gênica e riqueza  
364 genotípica. A compreensão da diversidade genética, tanto continental quanto regional ajuda a  
365 determinar os fatores bióticos ou abióticos que afetam a evolução das populações de  
366 fitopatógenos (Lin et al. 2014).

367 Houve também alta variabilidade para as subpopulações dos ecossistemas terra firme e  
368 várzea, considerando os altos valores de diversidade genotípica, gênica e riqueza genotípica.  
369 Contudo, a maior variabilidade foi observada na subpopulação de terra firme, possivelmente  
370 porque a mesma não sofre redução populacional no solo durante as inundações. McDonald e  
371 Linde (2002) afirmaram que as populações de patógenos que se mantêm altas durante o ano  
372 inteiro são mais diversificadas.

373 Com base nas análises de DAPC, AMOVA e índice de diferenciação  $F_{st}$  foi observada  
374 estruturação com formação de duas subpopulações de *R. solanacearum* ecotipo Moko, uma  
375 contendo isolados obtidos na região Norte, estado do Amazonas (AbSM e AmaS) e outra  
376 subpopulação formada por isolados da região Nordeste, estado de Sergipe (SbSF). Isto indica  
377 que o isolamento geográfico das populações de *R. solanacearum* ecotipo Moko concorre  
378 fortemente para esta estruturação. Sabe-se que a separação geográfica pode determinar a

379 diferenciação genética entre populações, pois ao reduzir o fluxo gênico influencia a  
380 variabilidade e a estrutura genética da população (Liu et al. 2009; Norman et al. 2009; Toukam  
381 et al. 2009). A relação direta entre o aumento da distância geográfica e a diferenciação entre  
382 populações é um modelo observado para todos os organismos vivos, especialmente aqueles  
383 com disseminação restrita (Martiny et al. 2011), como bactérias habitantes do solo.

384 A formação dessas duas subpopulações pode também ter ocorrido devido às duas  
385 regiões apresentarem climas distintos, quente e úmido no Amazonas e semiárido em Sergipe.  
386 Mesmo sabendo-se que diferenças entre populações podem ser explicadas por distintas  
387 condições de temperatura, umidade e altitude, entre outras (Tang 2009), foi evidenciado que  
388 entre as subpopulações do Amazonas, pequenas diferenças climáticas como clima de monções  
389 no baixo Solimões e rio Madeira e clima equatorial no médio e alto Solimões (classificação  
390 climática de Köppen) (Köppen 1931) não foram suficientes para estruturar as duas  
391 subpopulações. Por outro lado, também não se pode afirmar que diferenças climáticas entre as  
392 regiões Norte e Nordeste, impeçam o estabelecimento de diferentes subpopulações entre essas  
393 regiões, caso o isolamento geográfico venha a ser quebrado, como por exemplo, pelo trânsito  
394 de material propagativo infectado.

395 Não foram detectados haplótipos compartilhados e também não houveram migrantes  
396 entre as subpopulações do Amazonas e Sergipe permitindo a divergência entre estas  
397 subpopulações, pois o fluxo gênico entre as mesmas é insuficiente para contrapor os efeitos da  
398 deriva. Embora subpopulações de outros estados da região Norte, onde o Moko da bananeira  
399 ocorre, não tenham sido inseridas no presente trabalho, muito provavelmente a migração de  
400 indivíduos desta região para a região Nordeste deve reproduzir os resultados aqui encontrados.

401 Com base nas análises de DAPC, AMOVA e índice de diferenciação *F<sub>st</sub>*, foi observada  
402 a ausência de estruturação entre as subpopulações dos ecossistemas terra firme e várzea no  
403 estado do Amazonas. Tal fato se deve ao alto fluxo gênico entre esses ecossistemas. A  
404 diversidade baixa a moderada de subpopulações de *R. solanacearum* em pimentão no estado de  
405 Pernambuco foi relacionada ao fluxo gênico dentro dos municípios estudados, devido à  
406 disseminação da bactéria através de mudas e solos infectados, ou máquinas agrícolas utilizadas  
407 entre municípios e áreas (Garcia et al. 2013). No estado do Amazonas, as plantas com sintomas  
408 são descartadas no rio Solimões e afluentes, facilitando a disseminação da bactéria para outros  
409 locais. Em concordância, grupamentos relacionados a distância geográfica não foram  
410 encontrados entre subpopulações de *R. solanacearum* em Trindade indicando fluxo gênico  
411 entre áreas de cultivos através de cursos d'água, dentre outros agentes de disseminação  
412 (Ramsubhaga et al. 2012). Da mesma forma, foi comprovada na Martinica, por amostragens

413 periódicas de água, a disseminação de *R. solanacearum* sequevar IIA-4NPB do rio Lezarde  
414 para o lago Manzo que supre de água os perímetros irrigados da ilha (Wicker et al. 2009).

415 Muito provavelmente a subpopulação do baixo São Francisco apresenta tamanho  
416 reduzido, sendo, portanto, mais sujeita ao efeito de deriva genética que tende a baixar a  
417 variabilidade das populações. Acredita-se também que esta subpopulação se encontra em  
418 isolamento geográfico e, portanto, sem fluxo gênico para contrapor os efeitos de deriva. Além  
419 disso, deve-se ainda levar em consideração que a população desse local foi fundada em um  
420 evento de introdução relativamente recente por indivíduos possivelmente oriundos da região  
421 Norte do Brasil. Esses fatores são suficientes para explicar porque a variabilidade da  
422 subpopulação do baixo São Francisco é menor do que a do Amazonas.

423 As estimativas de desequilíbrio de ligação obtidas para as três subpopulações de *R.*  
424 *solanacearum* ecotipo Moko nos estados do Amazonas e Sergipe (AbSM, AmaS e SbSF)  
425 indicam que as mesmas estão em desequilíbrio de ligação. Sendo assim, é correto afirmar que  
426 a recombinação tem sido relativamente rara nestas subpopulações. As bactérias possuem vários  
427 mecanismos de variabilidade, entre os quais a recombinação, que não é imprescindível e cujo  
428 evento é influenciado por fatores biológicos e ecológicos, os quais podem variar mesmo em  
429 diferentes populações da mesma espécie (Tang et al. 2009). A frequência da recombinação  
430 depende ainda da ocorrência e eficiência dos mecanismos de permuta genética, tais como  
431 transformação, transdução e conjugação (Feil e Spratt, 2001).

432 A ausência de recombinação nas subpopulações de *R. solanacearum* ecotipo Moko nos  
433 estados do Amazonas e Sergipe indica que este não é o principal mecanismo responsável por  
434 gerar variabilidade na espécie. A mutação, a recombinação e o fluxo gênico são, provavelmente,  
435 os mecanismos evolucionários mais importantes para moldar as populações do complexo *R.*  
436 *solanacearum*. Dentre eles, o principal mecanismo de variabilidade dessas fitobactérias no  
437 Brasil é a mutação (Santiago, 2014).

438 A alta diversidade genética e ausência de recombinação observadas neste estudo indica  
439 que a estrutura genética de *R. solanacearum* ecotipo Moko não segue o modelo epidêmico  
440 sugerido por Maynard Smith *et al.* (1993), no qual a variabilidade genética é dada pelo  
441 cruzamento aleatório, mas múltiplos ciclos assexuados geram desequilíbrios de ligação com  
442 inclinação à clonalidade.

443 As subpopulações de *R. solanacearum* ecotipo Moko estudadas possuem alta  
444 variabilidade genética e ausência de recombinação. Há estruturação entre a subpopulação do  
445 estado do Amazonas e a subpopulação de Sergipe, bem como, ausência de estruturação entre  
446 as subpopulações de diferentes ecossistemas no Amazonas, com maior variabilidade genética

447 para a população de terra firme. Este conhecimento contribui para o melhor entendimento da  
448 estrutura de populações deste patógeno nos estados do Amazonas e de Sergipe e levanta  
449 questões sobre os fatores que promovem a adaptação a diferentes regiões geográficas e  
450 ecossistemas e sobre a dinâmica pela qual *R. solanacearum* ecotipo Moko tem evoluído. Estes  
451 dados são importantes para direcionar as estratégias de controle do Moko da bananeira,  
452 principalmente o desenvolvimento e uso de cultivares resistentes ao patógeno.

453

#### 454 **Literatura citada**

455

456 Agapow PM, Burt A. (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. Mol Ecol Resour.  
457 [https://doi: 10.1046/j.1471-8278.2000.00014.x](https://doi:10.1046/j.1471-8278.2000.00014.x)

458

459 Albuquerque GMR, Silva, Santos L A.; Felix, K CS.; Rollemberg CL, Silva AMF, Souza EB,  
460 Cellier EB, Prior P, Mariano RLR. (2014) Moko disease-causing strains of *Ralstonia*  
461 *solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II.  
462 Phytopathology. <https://doi:10.1094/PHYTO-12-13-0334-R>

463

464 Alatalo RV. (1981) Problems in the measurement of evenness in Ecology. Oikos 37:199-204.

465

466 Celier G, Prior P (2010) Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains  
467 pathogenic to potato. Phytopathology. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-10-0059>

468

469 Coelho Netto RA, Nutter Júnior FW (2005) Use of GPS and GIS technologies to map the  
470 prevalence of Moko disease of banana in the amazon region of Brazil. In: Allen C, Prior  
471 P, Hayward AC. (eds) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species  
472 complex. Saint Paul, Minnesota, pp 431-436

473

474 Coelho Netto RA, Pereira BG, Noda H, Boeher B (2004) Murcha bacteriana no estado do  
475 Amazonas, Brasil. Fitopatol Bras. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000100004>

476

477 Costa SB, Ferreira MASV, Lopes CA (2007) Diversidade patogênica e molecular de *Ralstonia*  
478 *solanacearum* da região amazônica brasileira. Fitopatol Bras. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000400002>

479  
480

481 Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software  
482 package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform.* 1:47–50  
483

484 Fegan M, Prior P. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause  
485 bacterial wilt of banana (2006) *Australas Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1071/AP05105>  
486

487 Fegan M, Prior, P (2005) How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In:  
488 Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum*  
489 *species complex*. Saint Paul, Minnesota, pp 449-461  
490

491 Feil EJ, Spratt BG. (2001) Recombination and the Population Structures of Bacterial Pathogens.  
492 *Annu Rev Microbiol.* [https://doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.561](https://doi:10.1146/annurev.micro.55.1.561)  
493

494 Garcia AL, Lima WG, Souza EB, Michereff SJ, Mariano RLR (2013) Characterization of  
495 *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt bell pepper in the state of Pernambuco, Brazil. *J*  
496 *Plant Patholol.* <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V95I2.032>  
497

498 Grünwald NJ, Goodwin SB, Milgroom MG, Fry WE (2003) Analysis of genotypic diversity  
499 data for populations of microorganisms. *Phytopathology.*  
500 <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.738>  
501

502 He F, Hu X (2005) Hubbell’s fundamental biodiversity parameter and the Simpson diversity  
503 index. *Ecol Lett.* <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00729.x>  
504

505 Ivey ML, Gardener BB, Opina N, Miller SA (2011) Diversity of *Ralstonia solanacearum*  
506 infecting eggplant in the Philippines. *Phytopathology.*  
507 <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-97-11-1467>  
508

509 Jombart T, Devillard S, Balloux, F (2010) Discriminant analysis of principal components: a  
510 new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.*  
511 <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>  
512

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



515

516 Köppen William (1931) *Climatologia*. Tlalpan, Cidade do México

517

518 Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis  
519 Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

520

521 Liu Y, Kanda A, Yano K, Kiba A, Hikichi Y, Aino M, Kawaguchi A, Mizoguchi S, Nakaho K,  
522 Shiomi H, Takikawa Y, Ohnishi K (2009) Molecular typing of Japanese strains of *Ralstonia*  
523 *solanacearum* in relation to the ability to induce a hypersensitive reaction in tobacco. *J Gen*  
524 *Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0188-7>

525

526 Lin CH, Tsai KC, Prior P, Wang JF (2014) Phylogenetic relationships and population structure  
527 of *Ralstonia solanacearum* isolated from diverse origins in Taiwan. *Plant*  
528 *Pathol.* <https://doi.org/10.1111/ppa.12209>

529

530 Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, Bruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints of  
531 phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with  
532 repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol.* 60:2286–2295

533

534 Ludwig JA, Reynolds JF (1988) Diversity indices. In: Ludwig JA, Reynolds JF. *Statistical*  
535 *ecology: a primer on methods and computing*. Wiley, New York pp 85-103

536

537 Mariano RLR, Souza EB, Assis SMP, Gomes AMA, Guerra ML (2017) Testes fisiológicos,  
538 nutricionais e bioquímicos para identificação e caracterização de bactérias fitopatogênicas. In:  
539 Mariano RLR, Souza EB (eds) *Manual de práticas em fitobacteriologia*. Recife, Pernambuco,  
540 pp 75-124

541

542 Martiny JBH, Eisen JA, Penn K, Allison SD, Horner-Devine MC (2011) Drivers of bacterial  
543 beta-diversity depend on spatial scale. *PNAS.*

544 <https://doi.org/10.1073/pnas.1016308108>

545

546 Maynard Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG (1993) How clonal are bacteria? *Proc*  
547 *Natl Acad Sci.* 90: 4384-4388.

548

549 Mcdonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and  
550 durable resistance. *Annu Rev Phytopathol.*  
551 <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>  
552

553 Melo AS (2008) O que ganhamos ‘confundindo’ riqueza de espécies e equabilidade em um  
554 índice de diversidade? *Biota Neotrop.* 8: 21-27.  
555

556 Melo LA, Tebaldi ND, Mehta A, Marques ASA (2014) Comparing *Acidovorax citrulli* strains  
557 from melon and watermelon: Phenotypic characteristics, pathogenicity and genetic diversity.  
558 *Trop Plant Pathol.* <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762014000200006>  
559

560 Milgroom MG (2015) *Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology and*  
561 *Evolution.* Saint Paul, Minnesota  
562

563 Norman DJ, Zapata M, Gabriel DW, Duan YP, Yuen JM, Mangravita-Novo A, Donahoo RS  
564 (2009) Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering  
565 North America. *Phytopathology.* <http://doi.org/10.1094/PHYTO-99-9-1070>  
566

567 Pinheiro CR, Amorim JAE, Diniz LEC, Silva AMF, Talamini V, Souza Júnior MT (2011)  
568 Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto  
569 a filotipos e sequevares. *Pesq Agropec Bras.* [http://dx.doi.org/10.1590/S0100-](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000600004)  
570 [204X2011000600004](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000600004).  
571

572 Ramsubhaga A, Lawrence D, Cassie D, Fräser R, Umaharana P, Prior P, Wicker E (2012)  
573 Wide genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains affecting tomato in Trinidad, West  
574 Indies. *Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02572.x>  
575

576 R development core team (2011) *R: A language and environment for statistical computing.* R  
577 Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em:  
578 28 dez. 2017.  
579

580 Rodrigues LMR (2010) Avaliação da agressividade e caracterização genética de linhagens de  
581 *Ralstonia solanacearum* isoladas de diferentes plantas hospedeiras. Dissertação, Universidade  
582 Estadual Paulista

583

584 Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L, Kappler U (2014) Polyphasic taxonomic  
585 revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of  
586 *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as  
587 *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia*  
588 *syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia*  
589 *syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. e *R. solanacearum* phylotype I and III strains as  
590 *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Micr.  
591 <https://doi.org/10.1099/ijs.0.066712-0>

592

593 Sanchez JAO (2016) Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* de cepas  
594 aisladas de plátano en México. Dissertação, Centro de Investigación Científica de Yucatán

595

596 Santiago TR, Lopes CA, Caetano-Anolles G, Mizubuti ESG (2016) Phylotype and sequevar  
597 variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen.  
598 Plant Pathol. <https://doi.org/10.1111/ppa.12586>

599

600 Santiago TR (2014) A deep analysis of the genetic structure of *Ralstonia solanacearum* in Brazil  
601 reveals not much sex in the population. Tese, Universidade Federal de Viçosa

602

603 Shannon CE, Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. Urbana, Illinois

604

605 Silva JR (2014) Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões Norte e  
606 Nordeste do Brasil. Dissertação, Universidade Federal Rural de Pernambuco

607

608 Staden R, Beal KF, Bonfield JK (1998) The Staden package. In: Misener S, Krawetz SA (eds)  
609 Bioinformatics methods and protocols. Totowa, Nova Jersey, pp 115-130

610

611 Souza EB, Mariano RLR, Félix KS (2017) Isolamento de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano  
612 RLR, Souza EB (eds) Manual de práticas em fitobacteriologia. Recife, Pernambuco, pp 26-35

613

614 Stoddart JA, Taylor JF (1988) Genotypic diversity: estimation and prediction in samples.  
615 Genetics 118:705-711

616

617 Tang JW (2009) The effect of environmental parameters on the survival of airborne  
618 infectious agents. *J Royal Soc Interface* 6:737-746.  
619 <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0227.focus>  
620

621 Tang J, Hanage WP, Fraser C, Corander J (2009) Identifying currents in the gene pool for  
622 bacterial populations using an integrative approach. *PLoS Comput Biol.*  
623 <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000455>  
624

625 Tompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: Improving the sensitivity of multiple sequence  
626 alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice.  
627 *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680  
628

629 Toukam GMS, Cellier G, Wicker E, Guilbaud C, Kahane R, Allen C, Prior P (2009) Broad  
630 diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. *Plant Dis.*  
631 <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1123>  
632

633 Wicker E, Lefeuvre P, De Cambiaire JC, Poussier S, Prior P (2012) Contrasting recombination  
634 patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from  
635 MLSA. *ISME J.* <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.160>  
636

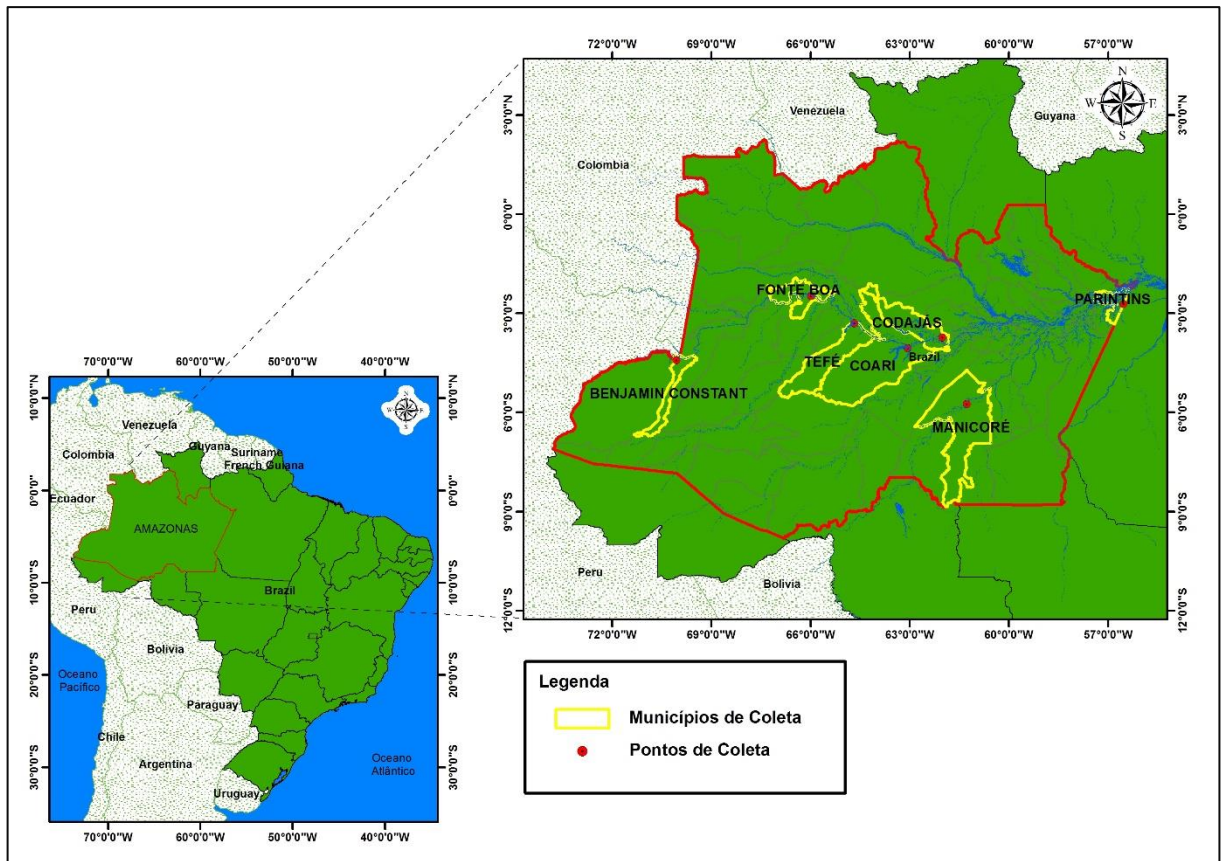
637 Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Prior P (2009) Epidemiological evidence  
638 for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstoniasolanacearum* in Martinique  
639 (French West Indies). *Plant pathol.* [https://doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02098.x](https://doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02098.x)  
640

641 Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15:323-354  
642

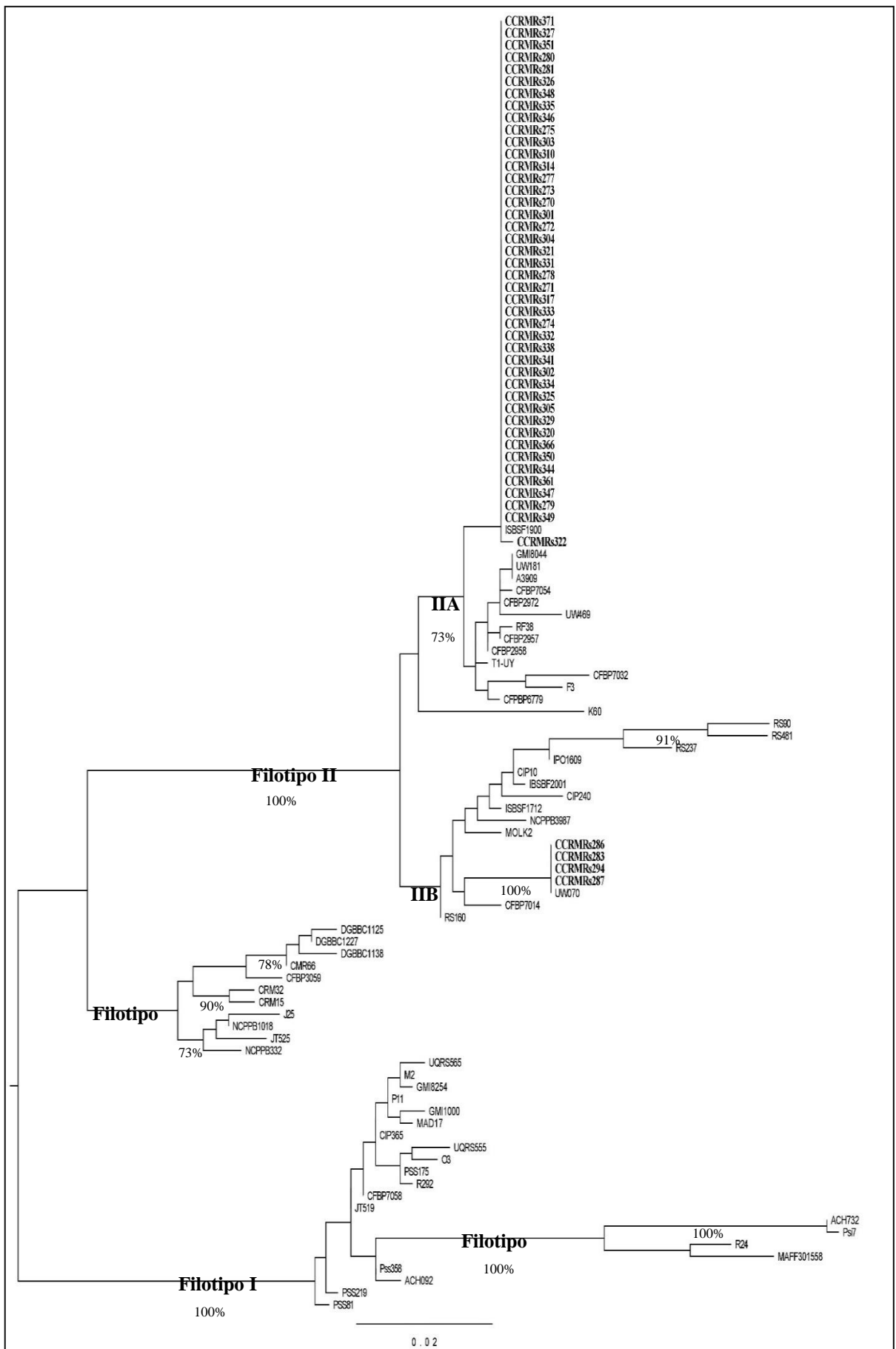
643 Xue QY, Yin YN, Yang W, Heuer H, Prior P, Guo JH, Smalla K (2011) Genetic diversity of  
644 *Ralstonia solanacearum* strains from China assessed by PCR-based fingerprints to unravel host  
645 plant- and site-dependent distribution patterns. *FEMS Microbiol Ecol.* [https://doi:  
646 10.1111/j.1574-6941.2010.01026.x](https://doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01026.x) Z  
647

648 Zhan J, Mundt CC, Hoffer ME, McDonald BA (2002) Local adaptation and effect of host  
649 genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *J Evol*  
650 *Biol* 15:634-647

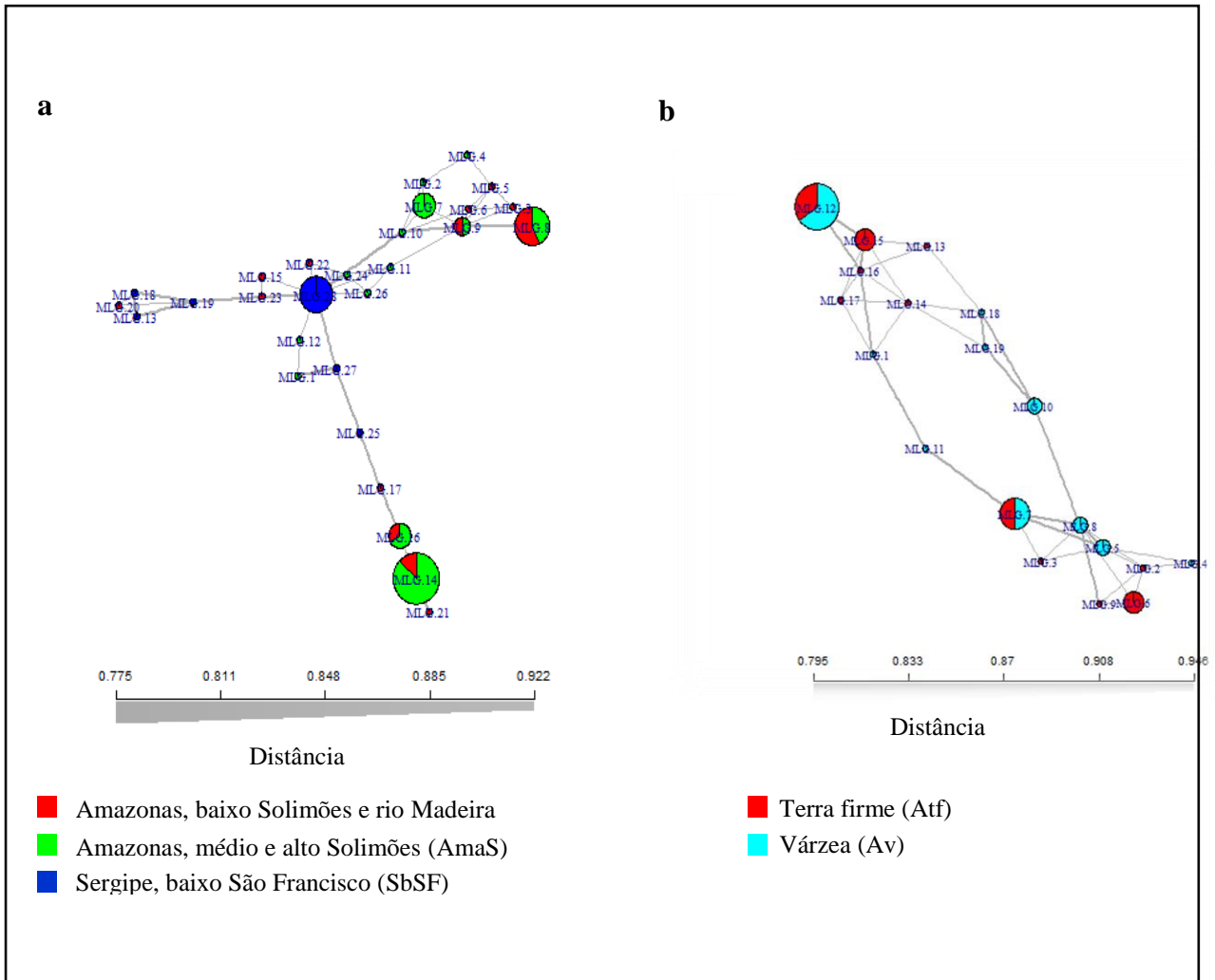
651  
652 Zulperi, D. & Sijam, K. (2014). First report of *Ralstonia solanacearum* race 2 biovar 1 causing  
653 Moko disease of banana in Malaysia. Plant Dis. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0321-PDN>



654 **Fig 1.** Localização no mapa do Brasil dos municípios dos estados do Amazonas e de Sergipe com presença do  
 655 Moko da bananeira, causado por *Ralstonia solanacearum*

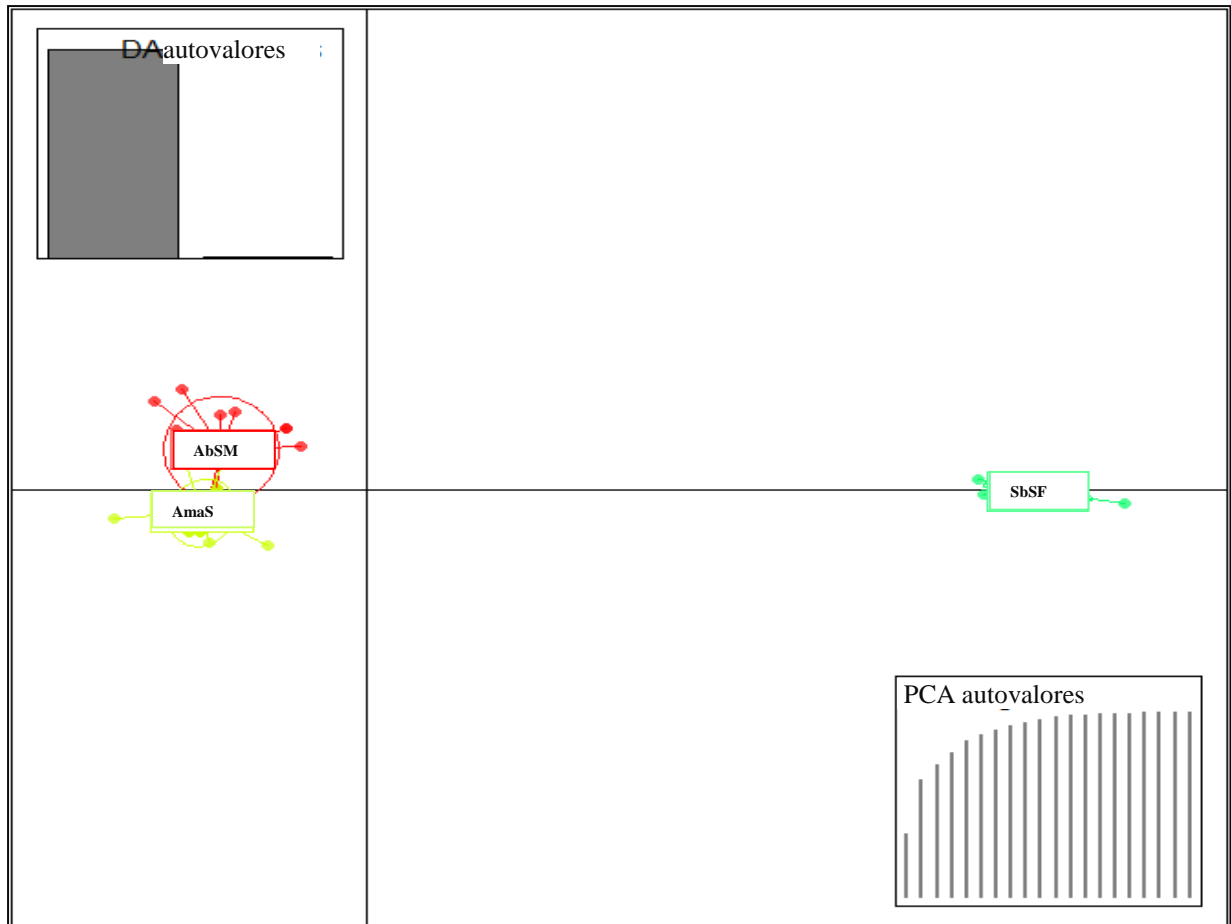


**Fig 2.** Reconstrução filogenética de *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko no estado do Amazonas, Brasil, baseada nas sequências parciais do gene da endoglucanase egl. Relacionamento filogenético determinado pelo método de Máxima Verossimilhança. Valores dos ramos indicam porcentagem de bootstraps para 1000 repetições.

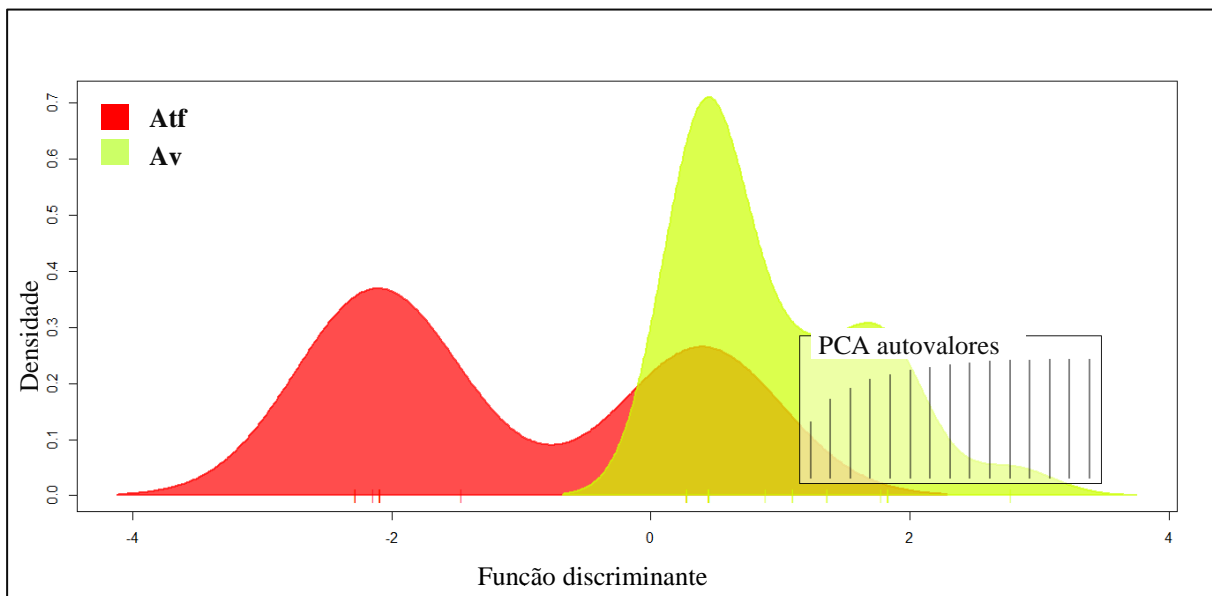


656 **Fig 3.** Rede de haplótipos das populações de *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko do Brasil, de acordo com a  
 657 origem geográfica (a) e ecossistema (b). Cada círculo corresponde a um haplótipo (MLG), cujo tamanho é  
 658 proporcional à sua frequência nas subpopulações. Dados obtidos a partir de rep-PCR, utilizando o primer Box.





659 **Fig 4.** Análise discriminante de componentes principais (DAPC) entre subpopulações de *Ralstonia solanacearum*  
 660 ecotipo Moko dos estados do Amazonas e de Sergipe, Brasil. Subpopulações AbSM (Amazonas, baixo Solimões  
 661 e rio Madeira, clima de monção) e AmaS (Amazonas, médio e alto Solimões, clima equatorial) no estado do  
 662 Amazonas e SbsSF (Sergipe, baixo São Francisco, clima de estepe quente) no estado de Sergipe. Dados obtidos a  
 663 partir de rep-PCR, utilizando o primer Box.



664 **Fig 5.** Análise discriminante de componentes principais (DAPC) entre subpopulações de *Ralstonia solanacearum*  
 665 ecotipo Moko do estado do Amazonas, Brasil (Atf = terra firme e Av = várzea). Dados obtidos a partir de rep-  
 666 PCR, utilizando o primer Box.

667  
668

**Tabela 1.** Isolados de *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko dos estados do Amazonas (AM) e de Sergipe (SE), Brasil, utilizados neste estudo.

<b>ISOLADO</b>	<b>MUNICÍPIO</b>	<b>ECOSSISTEMA</b>	<b>FILOTIPO-SEQUEVAR</b>
CRMRS270	Manicoré – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS271	Manicoré – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS272	Manicoré – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS273	Manicoré – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS274	Manicoré – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS275	Manicoré – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS277	Manicoré – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS278	Manicoré – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS279	Manicoré – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS280	Manicoré – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS281	Manicoré – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS283	Benjamin Constant – AM	Terra firme	IIB-4
CCRMRS286	Benjamin Constant – AM	Terra firme	IIB-4
CCRMRS287	Benjamin Constant – AM	Terra firme	IIB-4
CCRMRS294	Benjamin Constant – AM	Terra firme	IIB-4
CCRMRS301	Fonte Boa – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS302	Fonte Boa – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS303	Fonte Boa – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS304	Fonte Boa – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS305	Fonte Boa – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS310	Tefé – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS314	Tefé – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS317	Tefé – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS320	Tefé - AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS321	Tefé – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS322	Tefé – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS325	Tefé – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS326	Tefé – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS327	Tefé – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS329	Tefé – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS331	Tefé – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS332	Tefé – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS333	Coari – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS334	Coari – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS335	Coari – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS338	Coari – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS341	Coari – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS344	Coari – AM	Várzea	IIA-24
CCRMRS346	Coari – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS347	Coari - AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS348	Coari – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS349	Coari – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS350	Codajás – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS351	Codajás – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS361	Parintins - AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS366	Parintins – AM	Terra firme	IIA-24
CCRMRS371	Parintins – AM	Terra firme	IIA-24
IBSBF2570	Japoatã – SE	-	IIA-53
CCRMSFC	Japoatã – SE	-	IIA-53
CCRMRS382	Japoatã – SE	-	IIA-24
CCRMRS383	Japoatã – SE	-	IIA-24
CCRMRS384	Neópolis – SE	-	IIA-53
CCRMRS385	Neópolis – SE	-	IIA-53
CCRMRS386	Neópolis – SE	-	IIA-53
CCRMRS387	Propriá – SE	-	IIA-53
CCRMRS388	Propriá – SE	-	IIA-53
CCRMRS389	Propriá – SE	-	IIA-53
CCRMRS390	Propriá – SE	-	IIA-53

669 CCRM = Coleção de Culturas Rosa Mariano do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural  
670 de Pernambuco, Recife, Brasil

**Tabela 2.** *Ralstonia* spp. isolados de referência (Genbank) (n=60) utilizados neste estudo.

ISOLADO	HOSPEDEIRO	ORIGEM	FILOTIPO-SEQUEVAR ( <i>egl</i> )	GENBANK ( <i>egl</i> )
A3909	Heliconia	Hawaii	IIA-6	EF371812
ACH732	Tomate	Australia	IV-11	GQ907150
ACH092	Ginger	Australia	I-16	AF295254
CFBP2957	Tomate	Martinica	IIA-36	AF295265
CFBP2958	Tomate	Guadalupe (FWI)	IIA-39	AF295266
CFBP2972	Batata	Martinica (FWI)	IIA-35	AF295264
CFBP3059	Berinjela	Burkina Faso	III-23	AF295270
CFBP6779	Canna Russian Red	Martinica (FWI)	IIA-38	EF371835.1
CFBP7014	Anthurium	Trinidade	IIB-51	EU726798.1
CFBP7032	Tomate	Camarões	IIA-41	EF439726
CFBP7054	Tomate	Camarões	IIA-52	EF439725
CFBP7058	Huckleberry	Camarões	I-13	EF439740
CIP10	Batata	Peru	IIB-25	AF295260
CIP240	Batata	Brasil	IIB-26	EF647739
CIP365	Batata	Filipinas	I-45	GQ907151
CMR15	Tomate	Camarões	III-29	EF439743
CRM32	Huckleberry	Camarões	III-29	EF439749
CMR66	Huckleberry	Camarões	III-49	EF439729
DGBBC1125	Batata	Guiné	III-43	GU295008
DGBBC1138	Batata	Guiné	III-44	GU295009
DGBBC1227	Batata	Guiné	III-42	GU295011
GMI1000	Tomate	Guiana Francesa	I-18	AF295251
GMI8044	Banana	Grenada	IIA-6	GU295013
GMI8254	Tomate	Indonesia	I-47	GU295014
IBSBF1900	Banana	Brasil	IIA-24	EF371839
IBSBF2001	Tomate	Brasil	IIB-25	GU295017
ISBSF1712	Geranium	Brasil	IIB-27	EF371833
IPO1609	Batata	Netherlands	IIB-1	EF371814
J25	Tomate	Quênia	III-20	AF295279
JT519	Geranium	Ilhas Reunião	I-31	GU295032
JT525	Geranium	Ilhas Reunião	III-19	AF295272
K60 <sup>Tz</sup>	Tomate	EUA	IIA-7	EF192970.1
M2	Mulberry	China	I-48	FJ561067
MAD17	Pepper	Madagascar	I-46	GU295040
MAFF301558	Batata	Japan	IV-8	AY46500.1
Molk2	Banana	Filipinas	IIB-3	EF371841
NCPPB1018	Batata	Angola	III-21	AF295271
NCPPB332	Batata	Zimbabwe	III-22	AF295276
NCPPB3987	Batata	Brasil	IIB-28	AF295261
O3	Olive tree	China	I-44	FJ561069
P11	Peanut	China	I-17	FJ561068
PSi7	Tomate	Indonesia	IV-10	EF371804
PSS175	Perilla	Taiwan	I-32	KF913847
PSS219	Tomate	Taiwan	I-34	FJ561167
PSS358	Tomate	Taiwan	I-15	EU407298
PSS81	Tomate	Taiwan	I-14	FJ561066
R24 (RSY)	Clove	Indonesia	IV-9	JF702321
R292	White mulberry	China	I-12	AF295255
RF38	Tomate	Trinidade	IIA-37	JF702309
T1-UY	Tomate	Uruguai	IIA-50	GU295049
UQRS555	Ginger	Mauritius	I-33	KF913848
UQRS565	Ginger	Tailândia	I-30	KF913846
UW170	Heliconia	Colombia	IIB-4	DQ011550
UW181	Plantain	Venezuela	IIA-6	GU295053
UW469	Batata	Brasil	IIA-40	DQ657612
F3	Banana	Brasil	IIA-53	KF875425
RS237	Batata	Brasil	IIB-54	KT630019

RS90	Batata	Brasil	IIB-55	KT630064
RS481	Eucalyptus	Brasil	IIB-56	KT630065
RS160	Batata	Brasil	IIB-57	KT630004

672 <sup>T2</sup>*Ralstonia solanacearum* isolado tipo, mantido na CCRM = Coleção de Culturas Rosa Mariano do Laboratório  
673 de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil

674 **Tabela 3.** Índices de diversidade genética de subpopulações de *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko dos estados  
 675 do Amazonas e de Sergipe, Brasil. Subpopulações AbSM (Amazonas, baixo Solimões e rio Madeira, clima de  
 676 monção) e AmaS (Amazonas, médio e alto Solimões, clima equatorial) no estado do Amazonas e subpopulação  
 677 SbsSF (Sergipe, baixo São Francisco, clima de estepe quente) em Sergipe. Dados obtidos a partir de rep-PCR,  
 678 utilizando o primer Box.

População	AbSM	AmaS	SbsSF
N	17	30	11
Nº de haplótipos	13	13	6
E ( $g_{11}$ )	9	6,43	6
G	7,60 (4,84-11)	4,16 (2,2-7,11)	2,95 <NA>
E <sub>5</sub>	0,88 (0,75-1)	0,73 (0,58-0,93)	0,62 <NA>
H <sub>E</sub>	2,11 (1,76-2,39)	1,60 (1,03-2,09)	1,42 <NA>
Índice de Simpson	0,86 (0,793-0,909)	0,73 (0,545- 0,86)	0,66 NA
Fração Clonal	0,23	0,56	0,45
I <sub>A</sub>	1,01**	2,91**	1,20**
rbarD ( $r_d$ )	0,73**	0,16**	0,10**

679 N, tamanho da amostra; Nº haplótipos, Número de haplótipos para cada população; E ( $g_n$ ), riqueza genotípica ou  
 680 número esperado de genótipos pelo método de rarefação; G, diversidade genotípica; Índice dimensionado; E<sub>5</sub>,  
 681 índice de equitabilidade genotípica; H<sub>E</sub>, diversidade gênica de Shannon-Weaver (1949); Índice de Simpson;  
 682 intervalos de confiança (entre parênteses); Fração clonal, índice de diversidade genotípica, calculado por 1-  
 683 (número de diferentes genótipos)/(total de números de isolados). (I<sub>A</sub>) índice de associação; rbarD ( $r_d$ ), índice de  
 684 associação alternativo rbarD; \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

685 **Tabela 4.** Análise de variância molecular (AMOVA) em subpopulações de *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko  
 686 dos estados do Amazonas e de Sergipe, Brasil. Dados obtidos a partir de rep-PCR, utilizando o primer Box.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Componente de variância	Porcentagem de variação
Entre subpopulações	2	38,14	0,92 Va	25,12
Dentro de subpopulações	55	151,11	2,74 Vb	74,88
Total	57	189,25	3,66	

687 **Tabela 5** Diferenciação genética entre populações ( $F_{ST}$ ) de *Ralstonia solanacearum*<sup>a</sup> dos estados do Amazonas e  
 688 de Sergipe, Brasil (diagonal inferior) e número de migrantes ( $Nm$ )<sup>b</sup> (diagonal superior). Dados obtidos a partir de  
 689 rep-PCR, utilizando o primer Box.

População	AbSM	AmaS	SbsSF
AbSM		23	0,39
AmaS	0,01		0,34
SbsSF	0,38**	0,41**	

690 \*\* Significativo a 1% de probabilidade

691 **Tabela 6.** Índices de diversidade genética de subpopulações de *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko, de terra  
 692 firme (Atf) e várzea (Av) no estado do Amazonas, Brasil. Dados obtidos a partir de rep-PCR, utilizando o primer  
 693 Box.

População	Atf	Av
N	22	25
Nº de haplótipos	11	10
E (g <sub>22</sub> )	11	9,37
G	6,91	4,25
	NA	(3,40-5,37)
E <sub>5</sub>	0,88	0,73
	(0,75-1)	(0,58-0,93)
H <sub>E</sub>	2,15	1,83
	NA	(1,61-1,99)
Índice de Simpson	0,85	0,76
	(0,793-0,909)	(0,545- 0,86)
População Total		
I <sub>A</sub>	2,19**	
rbarD (r <sub>d</sub> )	0,12**	

694 N, tamanho da amostra; N° haplótipos, Número de haplótipos para cada população; E (g<sub>N</sub>), riqueza genotípica ou  
 695 número esperado de genótipos pelo método de rarefação; G, diversidade genotípica; E<sub>5</sub>, índice de equitabilidade  
 696 genotípica; H<sub>E</sub>, diversidade gênica de Shannon-Weaver (1949); Índice de Simpson; intervalos de confiança (entre  
 697 parênteses); (I<sub>A</sub>) índice de associação; rbarD (r<sub>d</sub>), índice alternativo; ; \*\* significativo ao nível de 1% de  
 698 probabilidade.

700 **Tabela 7.** Análise de variância molecular (AMOVA) em subpopulações de *Ralstonia solanacearum* ecotipo  
 701 Moko, de várzea e terra firme, no estado do Amazonas, Brasil. Dados obtidos a partir de rep-PCR, utilizando o  
 702 primer Box.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre subpopulações	1	2,27	-0,02 Va	0,74
Dentro de subpopulações	44	120,16	2,73 Vb	99,26
Total	45	122,43	2,71	

703

## CAPÍTULO III

---

---

### **GENOMA COMPLETO DOS ISOLADOS IBSBF 2570 E CCRMSFC DE *Ralstonia solanacearum* ECOTIPO MOKO SEQUEVAR IIA-53 DO BRASIL**

*Submeter à Standards in Genomics Sciences*



1 **Genoma completo dos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC de *Ralstonia solanacearum***  
2 **ecotipo Moko sequevar IIA-53 do Brasil**

3  
4 Jéssica Rodrigues da Silva,<sup>a</sup> Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque,<sup>a</sup> Ana Karolina Leite  
5 Pais,<sup>a</sup> Adriano Márcio Freire Silva,<sup>a</sup> Elineide Barbosa de Souza,<sup>b</sup> Maria Esther N. F.  
6 Boiteux,<sup>c</sup> Rosa de Lima Ramos Mariano<sup>a</sup>

7  
8  
9 **Resumo**

10  
11 *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko é o agente causal do Moko da bananeira. No  
12 estado de Sergipe, região Nordeste do Brasil, ocorre um grupo de isolados pertencentes à  
13 sequevar IIA-53 (endêmica) que causam a “Síndrome Sergipe” do Moko da bananeira,  
14 assim designada por induzir sintomas atípicos e específicos em bananeira, diferenciados  
15 dos causados pelas demais sequevares do ecotipo Moko. Dessa forma, IBSBF 2570 e  
16 CCRMSFC são os primeiros isolados com genoma completo sequenciados pertencentes  
17 à sequevar IIA-53. Além da anotação padrão do genoma, foram analisados a presença de  
18 genes efetores tipo III (T3E), genes de proteínas de associação com hospedeiro e análise  
19 comparativa dos efetores com outros isolados de *R. solanacearum*. Foram identificados  
20 16 genes de proteínas de associação com o hospedeiro secretados pelo sistema de secreção  
21 tipo III e 61 genes efetores T3E, dos quais dois efetores foram exclusivos dos isolados da  
22 sequevar IIA-53 quando comparados a outros isolados de Moko do filotipo IIA. Os  
23 resultados obtidos sinalizam para um possível papel dos genes efetores T3E atuando nos  
24 sintomas atípicos apresentados pelo Moko da bananeira “Síndrome Sergipe”. Além disso,  
25 apontam para a ocorrência de isolados não clonais na sequevar IIA-53 e agregam  
26 informações sobre a patogenicidade, epidemiologia e filogenia de *R. solanacearum*  
27 ecotipo Moko, as quais podem contribuir para maior eficiência no manejo da doença.

28  
29 **Palavras-chave:** efetores, Sergipe facies, praga quarentenária, diversidade

30  
31 **Introdução**

32 *Ralstonia solanacearum* é o agente causal da murcha bacteriana em diversas  
33 hospedeiras, do Moko em bananeiras triploides e heliconias, bem como do “Brown rot”  
34 em batata. Esta bactéria apresenta elevada diversidade genética quanto a gama de  
35 hospedeiros, distribuição geográfica, patogenicidade, epidemiologia e propriedades  
36 fisiológicas (Genin e Denny, 2012).

37 Tradicionalmente, isolados associados ao Moko são conhecidos como raça 2,

38 biovar 3, que no Brasil é considerada praga quarentenária presente restrita aos estados do  
39 Nordeste (Sergipe) e Norte (Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima,) pela IN59 de  
40 18/12/2013 (MAPA, 2013) e regulamentada pela IN17 de 27/05/20009 (MAPA, 2009).  
41 Devido a sua diversidade *R. solanacearum* é uma espécie heterogênea, sendo considerada  
42 um complexo de espécies. O complexo de espécies *R. solanacearum* é subdividido em  
43 um sistema hierárquico de classificação, constituído de quatro filotipos (Fegan e Prior,  
44 2005), 59 sequevares (Silva, 2014), oito clados (Wicker et al., 2012) e clones (Fegan e  
45 Prior, 2005). Filotipo é um grupo monofilético de isolados definido pela análise  
46 filogenética de sequências da região ITS e genes *hrpB* e *egl*. O filotipo I é encontrado na  
47 Ásia; o filotipo II é proveniente das Américas; o filotipo III é oriundo da África e ilhas  
48 vizinhas; e o filotipo IV é encontrado principalmente na Indonésia, mas também na  
49 Austrália e Japão, sendo constituído por duas espécies intimamente relacionadas: a blood  
50 disease of banana (BDB) e *R. syzygii*. Sequevar é um grupo de isolados com uma  
51 sequência altamente conservada dentro da área sequenciada. (Fegan e Prior, 2005).

52 Além disso, o complexo também foi classificado em cinco raças (He et al., 1983),  
53 seis biovares (características bioquímicas) (Hayward, 1994) e ecotipos (especialização para  
54 hospedeiros) (French e Sequeira, 1970). Após a reclassificação taxonômica, o complexo  
55 *R. solanacearum* foi dividido em três espécies independentes: *Ralstonia solanacearum*,  
56 que inclui os isolados do filotipo II, *R. pseudosolanacearum* com isolados dos filotipos I  
57 e III e *R. syzygii* incluindo isolados do filotipo IV (Safni et al., 2014).

58 Apesar de Safni et al. (2014) reclassificarem o complexo *R. solanacearum*,  
59 diversos trabalhos (Carstensen et al., 2017; Santiago et al., 2016; Stulberg e Huang, 2016)  
60 ainda utilizam a classificação em filotipos, clados e sequevares, associando os filotipos  
61 às respectivas espécies de *Ralstonia*. Esta divisão reflete a variabilidade do complexo de  
62 espécies *R. solanacearum* ecotipo Moko, que corresponde ao filotipo II, com as  
63 sequevares 3, 4, 6 e 24 (Cellier e Prior, 2010; Fegan e Prior, 2006). Fegan e Prior (2006)  
64 propuseram uma subdivisão do Filotipo II, em IIA e IIB. Dessa forma, as sequevares 6 e  
65 24 são intimamente relacionadas e estão contidas no filotipo IIA enquanto que as  
66 sequevares 3 e 4 estão agrupadas no filotipo IIB. No entanto, as sequevares IIB-25 e IIA-  
67 41 foram encontradas causando Moko em bananeiras no Brasil, estendendo a gama de  
68 sequevares associadas ao Moko e uma nova sequevar (IIA-53) foi relatada causando  
69 sintomas atípicos em bananeiras no estado de Sergipe (Albuquerque et al., 2014).

70 Os isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC pertencem a espécie *R. solanacearum*,  
71 ecotipo Moko, sequevar IIA-53 (Silva, 2014) a qual é endêmica do estado de Sergipe

72 (Nordeste do Brasil) causando a doença Moko da bananeira “Sergipe facies” (Síndrome  
73 Sergipe), por apresentarem sintomatologia e epidemiologia específicas (Albuquerque et  
74 al., 2014). Os isolados da sequevar IIA-53 em Sergipe induzem sintomas de Moko apenas  
75 em cachos de banana, com infecção iniciando apenas pelas inflorescências, sendo os  
76 sintomas nos frutos muito similares aos sintomas da doença Bugtok nas Filipinas  
77 (Albuquerque et al., 2014). Isolados da sequevar IIA-53 são disseminados por insetos  
78 visitantes de inflorescência.

79

## 80 **Informação do organismo**

### 81 **Classificação e característica**

82 Os isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC de *R. solanacearum* ecotipo Moko  
83 pertencem a classe  $\beta$ -Proteobacteria, ordem *Burkholderiales* e família *Burkholderiaceae*  
84 (Yabuuchi et al., 1995). No entanto, segundo Kado (2010) este gênero pertence à família  
85 *Ralstoniaceae*. Esta é uma bactéria Gram-negativa, apresenta forma de bastonete,  
86 aeróbica e não forma esporos. Os isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC sequenciados neste  
87 trabalho foram obtidos através de isolamento a partir de cachos de bananeiras (*Musa* sp.)  
88 infectadas, na cidade de Japoatã no estado de Sergipe, Brasil (Tabela 1). No estado de  
89 Sergipe, o Moko, designado por Albuquerque et al. (2014) como Síndrome Sergipe,  
90 apresenta sintomas atípicos e diferentes dos sintomas típicos encontrados no estado do  
91 Amazonas. Em Sergipe, os sintomas iniciam em inflorescências e causam  
92 amadurecimento desigual e prematuro de frutos que mostram internamente podridão seca.  
93 A bactéria pode se mover em direção ao pseudocaule e causar escurecimento dos feixes  
94 vasculares (Albuquerque et al., 2014).

95

## 96 **Material e Métodos**

### 97 **História do projeto genoma**

98 O sequenciamento do genoma completo dos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC de *R.*  
99 *solanacearum*, ecotipo Moko, sequevar IIA-53 foi iniciado em 2017, a montagem e a  
100 anotação foi realizada no mesmo ano. Os dados do projeto foram depositados no  
101 GenBank (Tabela 2). Estes dois isolados foram selecionados por induzirem os sintomas  
102 atípicos de Moko, denominados Síndrome Sergipe, sendo endêmicos no estado de  
103 Sergipe e pertencerem à sequevar IIA-53, recentemente adicionada à lista de sequevares  
104 associadas ao Moko (Albuquerque et al., 2014), cujo genoma ainda não foi descrito.

105

## 106 **Condições de crescimento e preparação do DNA genômico**

107 A extração do DNA foi realizada a partir de crescimento bacteriano em meio TZC  
108 (peptona – 10g, caseína hidrolisada – 1g, glucose – 5g, 2,3,5-Cloreto de trifenil tetrazólio  
109 – 0,05g, ágar – 18g e água destilada – 1000mL) (Kelman, 1953) a 28°C por 48 h com o  
110 auxílio do kit PureLink® Genomic DNA (Thermo Fisher Scientific) seguindo a  
111 metodologia do fabricante. Após a extração, o DNA foi eluído em água ultrapura,  
112 quantificado em espectrofotômetro modelo BioDrop (BioDrop) e submetido à  
113 eletroforese em gel de agarose a 0,8% para avaliar a qualidade do DNA extraído. As  
114 amostras de DNA apresentaram relação A260/A280 nm entre 1,8 e 2,0 e sem degradação  
115 visível no gel de agarose, sendo armazenadas a -20 °C, para posterior envio ao  
116 sequenciamento.

117

## 118 **Sequenciamento, montagem e alinhamento do genoma**

119 O sequenciamento completo do genoma foi realizado em um lane da plataforma MiSeq  
120 (Illumina) no Centro de Biotecnologia Animal (ESALQ/USP, São Paulo, SP, Brazil) e as  
121 livrarias foram preparadas com o Kit Nextera DNA sample prep (Illumina). O controle  
122 de qualidade foi realizado por FastQC  
123 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Os genomas completos  
124 foram montados no software SeqMan NGen v.14 (Lasergene, DNASTAR) utilizando  
125 como genoma de referência o do isolado Po82 de *R. solanacearum*, ecotipo Moko,  
126 sequevar IIB-4 (GCA\_000215325.1). Adaptadores e reads de baixa qualidade foram  
127 retirados automaticamente pelo SeqMan NGen. Após a montagem, os genomas dos  
128 isolados foram escaneados no VecScreen  
129 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) para detecção de possíveis  
130 contaminações com adaptadores remanescentes que foram removidos manualmente.

131 Os genomas dos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC foram analisados por genômica  
132 comparativa, alinhando-os com os genomas completos de outros isolados de *R.*  
133 *solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* de diversas sequevares, provenientes do banco  
134 de dados do NCBI, pelo método Mauve, no software MegAlign Pro v. 14. A distância  
135 métrica entre os isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC foi analisada por matriz de distância,  
136 no respectivo software.

137

## 138 **Anotação do genoma, análise de genes efetores tipo III e genes de proteínas de** 139 **interação com hospedeiro**

140 Os genomas foram anotados em NCBI Prokaryotic Annotation Pipeline (PGAP)  
141 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)) pelos métodos Best-placed  
142 reference protein set e GeneMarkS+ quanto ao número de genes, pseudogenes, CDS,  
143 genes codificantes de proteínas, RNA estrutural, tRNA e CRISPR repeats. A descrição  
144 funcional e identificação dos genes foi realizada no software Blast2GO (Conesa et al.,  
145 2005), que integra o sistema Blastx do NCBI com o Consortium de Ontologia de Gene e  
146 os sistemas de categorização funcional GO Slim. A anotação de ontologias genéticas foi  
147 baseada na mineração de dados de sequências públicas com anotação disponível, com no  
148 mínimo 60% de homologia entre as sequências

149 As anotações geradas no Blast2GO foram importadas no software Array Star v. 14  
150 para a identificação de genes efetores tipo III (efetores T3E) e genes de proteínas de  
151 interação com o hospedeiro secretadas pelo sistema de secreção tipo III (T3SS), de acordo  
152 com anotação no genoma de referência (isolado Po82) (Stangarlin et al., 2011). Em  
153 seguida, os genes T3E selecionados no Array Star foram escaneados pelo blastn para  
154 identificação das famílias dos efetores T3E, no site Ralsto T3E  
155 (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/site/prj/T3Ev2/>) Laboratório de  
156 Interações Plantas-Microrganismos (LIPM) do INRA, em Toulouse, França.

157

## 158 **Resultados**

### 159 **Propriedades do Genoma**

160 A cobertura do sequenciamento do genoma dos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC de  
161 *R. solanacearum* foi de 124,9x e 116,8x, respectivamente. As sequências completas dos  
162 genomas resultaram em um cromossomo circular (IBSBF 2570 = 3.486.592 pb e  
163 CCRMSFC = 3.486.270 pb) e um megaplasmídeo circular (IBSBF 2570 = 1.951.986 pb  
164 e CCRMSFC = 1.952.016 pb). O conteúdo de GC do isolado IBSBF 2570 foi de 66,63%  
165 no cromossomo e 66,78% no megaplasmídeo. Já para o isolado CCRMSFC foi de 66,62%  
166 e 66,78 %, respectivamente, para o cromossomo e megaplasmídeo. O genoma do isolado  
167 IBSBF 2570 consistiu de um total de 4.853 genes, 4.545CDS e 243 pseudogenes;  
168 enquanto o isolado CCRMSFC apresentou um total de 4.844 genes, 4.537 CDS e 241  
169 pseudogenes. Ambos os genomas dos isolados apresentaram três rRNA (5S, 16S, 23S),38  
170 tRNA e dois CRISPR repeats, cada (Tabela 3).

171 A distância métrica calculada no MegAlign Pro entre os isolados IBSBF 2570 e  
172 CCRMSFC foi igual a 0,00 e de 0,002 em relação ao isolado de referência Po82 (sequevar  
173 IIA-4). A análise da árvore do genoma completo dos isolados foi congruente com a

174 determinação da sequênciar dos mesmos (Figura 1), tendo em vista que os isolados IBSBF  
175 2570 e CCRMSFC relacionaram-se muito proximamente entre si.

176

### 177 **Categorias COG**

178 Aproximadamente 64,8% dos genes dos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC anotados  
179 pelo Blast2GO, distribuíram-se nas três principais categorias COG: função molecular,  
180 componente celular e processos biológicos (Tabela 4). Destas categorias, destacaram-se  
181 com maior número de genes as funções de atividade catalítica (n = 95) e ligação (n = 61)  
182 relacionadas à função molecular, partes de membrana e células relacionadas a  
183 componente celular. Dentre os genes relacionados a processos biológicos, destacaram-se  
184 os relacionados a processos metabólicos e celulares. Além disso, os principais termos  
185 quando comparado o número de genes com as funções COG foram: proteína hipotética,  
186 regulador de família transcricional, membrana, proteína de transmembrana e efector tipo  
187 III (Tabela 5).

188

### 189 **Análise de Efectores T3E e de genes de proteínas de interação com o hospedeiro**

190 Foram identificados 61 genes efectores T3E no genoma dos isolados IBSBF 2570 e  
191 CCRMSFC (Tabela 6) de acordo com anotação no genoma do isolado Po82 (genoma de  
192 referência) e por blast das seqüências desses efectores em banco de dados Ralsto T3E. E  
193 também foram identificados 16 genes de associação com o hospedeiro secretados pelo  
194 sistema de secreção tipo III, sendo eles: hrpA, hrpY, hrpX, hrpV, hrcS, hrcR, hrcQ, hrcV,  
195 hrcU, hrpJ, hrcJ, hrpF, hrcN, hrpD, hrcT e hrpB.

196 Dois genes efectores T3E dos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC apresentaram três  
197 cópias no genoma (cada): RipH2 (RSPO\_m00200, RSPO\_m00201 e RSPO\_m00202) e  
198 RipM (RSPO\_c01871, RSPO\_c01872 e RSPO\_c01873); três efectores T3E apresentaram  
199 duas cópias no genoma: RipS3 (RSPO\_m01229 e RSPO\_m01312), RipS4  
200 (RSPO\_c01610 e RSPO\_c00383) e RipV2 (RSPO\_c01875 e RSPO\_c01876). O efector  
201 RipS5 apresentou quatro cópias no genoma (RSPO\_c00036, RSPO\_c00037,  
202 RSPO\_c02545 e RSPO\_c02546) (Tabela 6).

203 Quando comparados a presença de efectores nos isolados da sequênciar IIA-53 com  
204 outros isolados de banana filotipos IIA e IIB, verificou-se a ocorrência dos efectores RipJ  
205 e RS\_T3E\_Hyp10 nos isolados da sequênciar IIA-53 (IBSBF 2570 e CCRMSFC) e sua  
206 ausência nos demais isolados de Moko do filotipo IIA (IBSBF 1900 = IIA-24, B50 = IIA-  
207 24, Grenada91= IIA-6 e UW181= IIA-6); em contrapartida, no filotipo IIB (Po82 =

208 sequevar IIB-4) verificou-se a ocorrência de RipJ e a caracterização do efetor  
209 RS\_T3E\_Hyp10 como um pseudogene. Já o efetor RipAx2 ausente em IBSBF 2570 e  
210 CCRMSFC ocorreu em Po82 e Grenada91 (Tabela 6). Os efetores RipS2 e RipS4  
211 (RSPO\_m00383) verificados nos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC e ausentes em  
212 IBSBF1900, juntamente com os efetores RipJ e RS\_T3E\_Hyp10, podem desempenhar  
213 papel importante (isoladamente ou em conjunto) nas peculiaridades dos sintomas  
214 ocasionados pelos isolados da sequevar IIA-53, que apenas foi detectada em Sergipe  
215 (região Nordeste) em comparação a IIA-24 predominante no Amazonas (região Norte)  
216 no Brasil. Estes mesmos efetores em outros isolados de Moko apresentaram divergências,  
217 como a presença do efetor RipS4 no isolado Grenada91 e RipS2 como pseudogene em  
218 UW181 (Tabela 6).

219 Os genes efetores tipo III têm sido considerados fatores chave de patogenicidade em  
220 bactérias fitopatogênicas (Peeters et al., 2013). *Ralstonia solanacearum* utiliza um grande  
221 repertório de proteínas efetoras tipo III secretadas pelo T3SS para ter sucesso na infecção,  
222 uma vez que as mesmas suprimem ou subvertem as repostas de resistência desencadeadas  
223 por padrões moleculares associados a fitopatógenos (PAMPs) (Jones e Dangl, 2006). Em  
224 *R. solanacearum* já foram identificados um repertório maior que 94 famílias de efetores  
225 T3E (Peeters et al., 2013), sendo que, individualmente, os isolados apresentam  
226 normalmente de 60 a 75 efetores (Deslandes e Genin, 2014), como verificado para IBSBF  
227 2570 e CCRMSFC.

228

## 229 **Conclusões**

230 Este relato do genoma completo dos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC é o  
231 primeiro estudo realizado com isolados da sequevar IIA-53 que apresenta grande  
232 importância patogênica e epidemiológica no Nordeste do Brasil. Os efetores tipo III RipJ  
233 e Rs\_T3E\_Hyp10 foram exclusivos nos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC, dentre os  
234 isolados de *R. solanacearum* ecotipo Moko filotipo IIA. Alterações nos genes efetores  
235 T3E podem estar relacionadas à sintomatologia particular incitada pelos isolados da  
236 sequevar IIA-53 de *R. solanacearum* no Brasil. Apesar de serem isolados da mesma  
237 sequevar, ocorrendo no estado de Sergipe, possivelmente como uma população clonal, as  
238 informações iniciais apontam que existem diferenças entre os mesmos, evidenciadas  
239 pelas propriedades do genoma e análise dos efetores T3E. Estes dados podem agregar  
240 informações ao conhecimento já existente sobre a patogenicidade, epidemiologia e  
241 filogenia de *R. solanacearum* ecotipo moko no Brasil, visando incrementar estratégias

242 eficientes para o manejo da doença.

243

#### 244 **Interesses competitivos**

245 Os autores declaram que não possuem interesses competitivos em recursos financeiros e  
246 não financeiros.

247

#### 248 **Contribuições dos autores**

249 Concessão do projeto: RLRM, ESB. Montagem e anotação dos genomas: GMRA,  
250 MENFB. Execução e anotação de genes efetores: JRS, GMRA. Análise e interpretação  
251 dos resultados: JRS, GMRA. Escrita do manuscrito: JRS, GMRA, AKLP, AMFS, ESB,  
252 MENFB, RLRM. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

253

#### 254 **Agradecimentos**

255 Ao CNPq (Proc.141213/2014-0) pela concessão da bolsa de Doutorado.

256

#### 257 **Detalhes dos autores**

258 Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife,  
259 Pernambuco, Brasil<sup>a</sup>

260 Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife,  
261 Pernambuco, Brasil<sup>b</sup>

262 Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), Embrapa Hortaliças, Brasília DF,  
263 Brasil<sup>c</sup>

264

#### 265 **Referências**

266

267 Albuquerque, GMR, Santos, LA, Felix, KCS, Rollemberg, CL, Silva, AMF, Souza, EB, Cellier,  
268 Prior P, e Mariano, R. L. R. Moko disease causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil  
269 extend known diversity in paraphyletic phylotype II. *Phytopathology*. 2014; 104:1175-82

270

271 Carstensen GD, Venter SN, Wingfield MJ, Coutinho TA. 2016. Two *Ralstonia* species associated  
272 with bacterial wilt of *Eucalyptus*. *Plant Pathol*. 2017; 66(3):393-403.

273

274 Cellier G, Prior P. Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains  
275 pathogenic to potato. *Phytopathology*. 2010; 100:1250-1261.

276

277 Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: a universal tool  
278 for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 2005;  
279 21:3674-3676.

280

281 Deslandes, L, Genin, S. Opening the *Ralstonia solanacearum* type III effector tool box: Insights  
282 into host cell subversion mechanisms. *Curr. Opin. Plant. Biol*. 2014; 20:110-117.

283

284 Fegan M, Prior P. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause



285 bacterial wilt of banana. *Austr. Plant Pathol.* 2006; 35(2): 93-101.  
286  
287 Fegan M, Prior P. How complex is the ‘*Ralstonia solanacearum*’ species complex? In: Allen CP,  
288 editor. *Bacterial wilt: The disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. Prior,  
289 Hayward AC. St. Paul, MN: American Phytopathological Society; 2005. p. 449–61.  
290  
291 Genin, S, Denny, T P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu Rev*  
292 *Phytopathol.* 2012; 50:67–89.  
293  
294 He LY, Kelman A, Sequeira L. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant*  
295 *Dis.* 1983; 67(12):357-1361.  
296  
297 Jones, JD, Dangl, JL. The plant immune system. *Nature.* 2006; 444:323-329  
298  
299 Kelman, A. The Bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* - a literature review and  
300 bibliography. Raleigh: North Carolina State University, 1953. 194p. (North Carolina Agricultural  
301 Experiment Station. Technical Bulletin, 99).  
302  
303 MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2013. Instrução Normativa nº 59 de  
304 18/12/2013. [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/rede-nacional-de-laboratorios-](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/rede-nacional-de-laboratorios-agropecuarios/documentos-rede-nacional-de-laboratorios-agropecuarios/in-59-2013-pragas-quarentenarias-para-o-brasil.pdf)  
305 [agropecuarios/documentos-rede-nacional-de-laboratorios-agropecuarios/in-59-2013-pragas-](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/rede-nacional-de-laboratorios-agropecuarios/documentos-rede-nacional-de-laboratorios-agropecuarios/in-59-2013-pragas-quarentenarias-para-o-brasil.pdf)  
306 [quarentenarias-para-o-brasil.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/rede-nacional-de-laboratorios-agropecuarios/documentos-rede-nacional-de-laboratorios-agropecuarios/in-59-2013-pragas-quarentenarias-para-o-brasil.pdf). Acesso em 22 Jan. 2018.  
307  
308 MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2009. Instrução Normativa nº 17 de  
309 27/05/2009. [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/arquivos-prevencao/IN17_2009MokodaBananeira.pdf)  
310 [vegetal/arquivos-prevencao/IN17\\_2009MokodaBananeira.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/arquivos-prevencao/IN17_2009MokodaBananeira.pdf). Acesso em 26 Jan. 2018.  
311  
312 Peeters N, Carrere S, Anisimova M, Plener L, Cazale AC, Genin S. Repertoire, unified  
313 nomenclature and evolution of the type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species  
314 complex. *BMC Genomics.* 2013; 14:859  
315  
316 Safni, I, Cleenwerck, I, De Vos, P, Fegan, M, Sly, L, Kappler, U. Polyphasic taxonomic revision  
317 of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia*  
318 *solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii*  
319 subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp.  
320 *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp.  
321 *celebesensis* subsp. nov. e *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia*  
322 *pseudosolanacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 2014; 64:3087-103.  
323  
324 Santiago TR, Lopes CA, Caetano-Anolles G, Mizubuti ESG. Phylotype and sequevar variability  
325 of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. *Plant Pathol.*  
326 2016; 66(3)383-392.  
327  
328 Silva, JR. Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões Norte e Nordeste do  
329 Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.  
330 2014.  
331  
332 Stulberg MJ, Huang Q. A computer program for fast and easy typing of a partial endoglucanase  
333 gene sequence into genospecies and sequevars 1&2 of the *Ralstonia solanacearum* species  
334 complex. *J Microbiol Met.* 2016; 123(1):101-107.  
335  
336 Wicker, E, Lefeuvre, P, De Cambiaire, JC, Poussier, S, Prior, P. Contrasting recombination  
337 patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from  
338 MLSA. *Int. Soc. Microbial Ecol. J.* 2012; 6(5):961-974.

339 **Tabela 1.** Classificação e características gerais dos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC de  
 340 *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko de acordo com as recomendações do MIGS

MIGS ID <sup>1</sup>	Propriedades	Termo	Código de evidência <sup>2</sup>
	Classificação	Domínio Bacteria	TAS
		Filo <i>Proteobacteria</i>	TAS
		Classe	TAS
		<i>Betaproteobacteria</i>	
		Ordem	TAS
		<i>Burkholderiales</i>	
		Família	TAS
		<i>Burkholderiaceae</i>	
		Gênero <i>Ralstonia</i>	TAS
		Espécie <i>Ralstonia solanacearum</i>	TAS
	Gram	Negativa	IDA
	Formato da célula	Bastonete	IDA
	Esporulação	Sem esporulação	IDA
	Faixa de temperatura	Mesófila	IDA
	Temperatura ótima	28°C	IDA
	Faixa de pH; ótimo	5,5–8,0; 6,5	NAS
	Fonte de carbono	Não relatado	NAS
MIGS-6	Habitat	Bananeiras	TAS
MIGS-6.3	Salinidade	Não relatado	NAS
MIGS-22	Necessidade de Oxigênio	Aeróbica	IDA
MIGS-15	Relação biótica	Vida livre	IDA
MIGS-14	Patogenicidade	Patogênica	TAS
MIGS-4	Localização geográfica	Japoatã, Sergipe, Brasil	TAS
MIGS-5	Coleta de amostras		TAS
MIGS-4.1	Latitude	Não relatado	NAS
MIGS-4.2	Longitude	Não relatado	NAS
MIGS-4.4	Altitude	Não relatado	NAS

<sup>1</sup>MIGS - Informação mínima sobre uma especificação da sequência do genoma

<sup>2</sup>Código de evidência: IDA - Inferida a partir de ensaio direto, TAS - Declaração de autor rastreável (ex., existe um relato na literatura), NAS - Declaração de autor não rastreável (ex., não observado diretamente para a amostra viva, isolada, mas com base em uma propriedade geralmente aceita para a espécie ou evidência anedótica). Os códigos de evidências são do projeto Gene Ontology (Ashburner, 2000)

341 **Tabela 2.** Informações do projeto de sequenciamento completo dos genomas dos isolados IBSBF  
 342 2570 e CCRMSFC de *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko, sequevar IIA-53 do Brasil

<b>MIGS<sup>1</sup> ID</b>	<b>Propriedade</b>	<b>IBSBF 2570</b>	<b>CCRMSFC</b>
MIGS 31	Qualidade final	Concluído	Concluído
MIGS 28	Livraria usada	Illumina Nextera XT DNA	Illumina Nextera XT DNA
MIGS 29	Plataforma utilizada	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq
MIGS 31.2	Cobertura	124,9x	116,8x
MIGS 30	Montagem	SeqMan NGen	SeqMan NGen
MIGS 32	Gene calling method		
	Locus tag	RSPO	RSPO
	Genbank ID	CP026090 (chr)	CP026092 (chr)
		CP026091 (mplasm)	CP026093 (mplasm)
	Data de depósito no GenBank	21/01/2018	21/01/2018
	Bioproject	PRJNA430795	PRJNA430893
MIGS 13	Fonte do Material Identificada	SAMN08378625	SAMN08380407
	Relevância do projeto	Fitopatógeno	Fitopatógeno

343 <sup>1</sup>MIGS - Informação mínima sobre uma especificação da sequência do genoma

344 **Tabela 3.** Propriedades dos genomas completos dos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC de  
 345 *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko, sequevar IIA-53 do Brasil

<b>Propriedade<sup>1</sup></b>	<b>IBSBF 2570</b>	<b>CCRMSFC</b>
Tamanho do genoma (pb)	5.438.578	5.438.286
% GC (média) <sup>1</sup>	66,70	66,70
DNA scaffolds <sup>1</sup>	2	2
Total de genes <sup>1</sup>	4.853	4.844
CDS <sup>1</sup>	4.545	4.537
Pseudogenes <sup>1</sup>	243	241
rRNA <sup>1</sup>	3	3
tRNA <sup>1</sup>	53	54
Genes associados a COGs <sup>2</sup>	68%	68%
CRISPR repeats <sup>2</sup>	2	2

346 <sup>1</sup> Informações do genoma obtidas por NCBI Prokaryotic Annotation Pipeline (PGAP)

347 <sup>2</sup> Informação obtida por anotação COG em Blast2GO

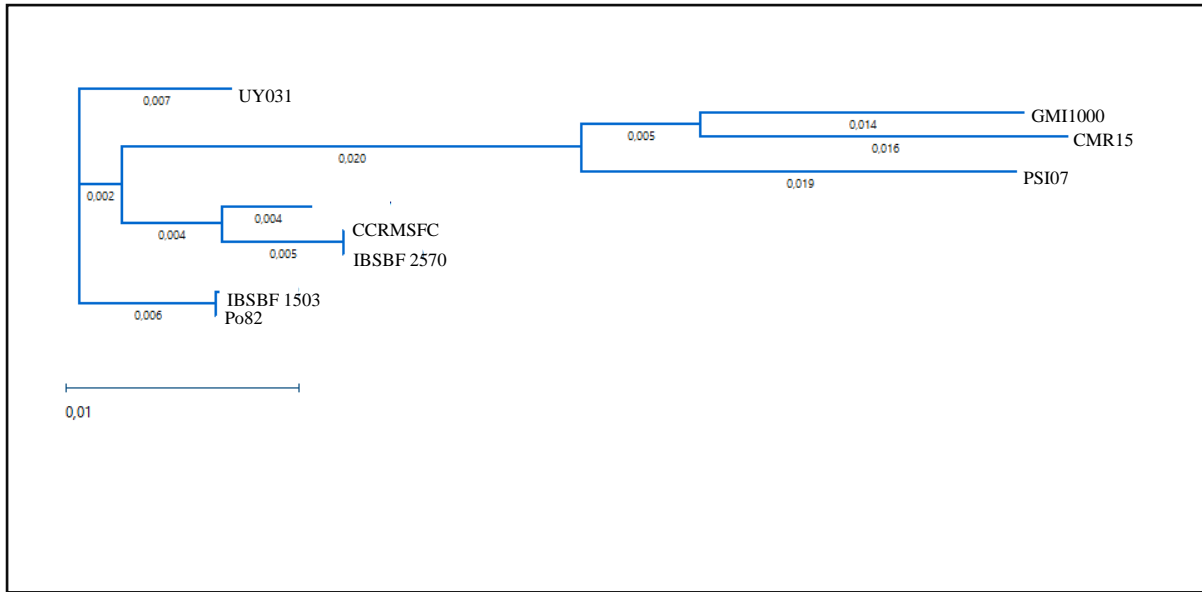
348 **Tabela 4.** Número de genes associados com categorias gerais de função COG no genoma dos isolados  
 349 IBSBF 2570 e CCRMSFC de *Ralstonia solanacearum*, ecotipo Moko, sequevar IIA-53 do Brasil

Termo	Ontologia			Total
	Gene ID	P-Value	Z-Score	
Função molecular	3674	1	-0,16013	127
Atividade transportadora	5215	1	-0,04441	10
Atividade do fator de transcrição, ligação de proteína	988	1	-0,01403	1
Atividade da molécula estrutural	5198	1	-0,01403	1
Atividade do transdutor de sinal	4871	1	-0,02807	4
Atividade do fator de transcrição de ligação de ácido nucleico	1071	1	-0,02431	3
Atividade do transdutor molecular	60089	1	-0,02431	3
Atividade de transportador de elétrons	9055	1	-0,03139	5
Atividade catalítica	3824	1	-0,13805	95
Ligação	5488	1	-0,11024	61
atividade antioxidante	16209	1	-0,01403	1
Componente celular	5575	0,267	6,195147	129
Outra parte do organismo	44217	0,00276	71,2671	1
Organela	43226	1	-0,01985	2
Parte da membrana	44425	1	-0,13123	86
Membrana	16020	1	-0,05963	18
Complexo macromolecular	32991	1	-0,06127	19
Parte da região extracelular	44421	1	-0,01403	1
Região extracelular	5576	1	-0,01985	2
Parte da célula	44464	1	-0,0997	50
Célula	5623	1	-0,01403	1
Processo biológico	8150	1	6,195147	129
Resposta ao estímulo	50896	1	-0,03439	6
Processo multi-organismo	51704	0,651	14,51436	24
Processo metabólico	8152	1	-0,11561	67
Locomoção	40011	1	-0,02431	3
Localização	51179	1	-0,06595	22
Crescimento	40007	1	-0,01403	1
Processo de desenvolvimento	32502	1	-0,01403	1
Desintoxicação	98754	1	-0,01403	1
Processo celular	9987	1	-0,11296	64
Organização de componentes celulares ou biogênese	71840	1	-0,02431	3
Regulação biológica	65007	1	-0,06443	21

350 Genes anotados com categorias COG, n = 68% dos genes.

351 **Tabela 5.** Principais termos de função COG no genoma dos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC de  
 352 *Ralstonia solanacearum*, ecotipo Moko, sequevar IIA-53 do Brasil

<b>Termo</b>	<b>P-Value</b>	<b>Z-Score</b>	<b>Total</b>
Proteína hipotética	1	-0,58038	1280
Família de regulação transcricional	1	-0,07836	31
Membrana	1	-0,07445	28
Proteína transmembranar	1	-0,0731	27
Efetor tipo III	1	-0,0689	24
Lipoproteína	1	-0,06127	19
Peptídeo sinal	1	-0,05795	17
Proteína hipotética conservada	1	-0,05621	16
Conservação hipotética	1	-0,05621	16
Regulador transcricional	1	-0,05442	15
Regulador transcricional do sistema operon de clivagem de glicina e família LysR	1	-0,05257	14
Montagem de pilus	1	-0,05257	14
Proteína efetora tipo III	1	-0,05065	13
---NA---	1	-0,05065	13
Proteína glutathiona s-transferase	1	0,05065	13
Proteína orfa isrso3-transposase	1	-0,04658	11
Proteína semelhante a bacteriófago	1	-0,04658	11
Transportador ABC ligando-ATP	1	-0,04658	11
Transportador MFS	1	-0,04441	10
3-oxoacyl-ACP reductase	1	-0,04441	10
Proteína de regulação de transcrição	1	-0,04213	9
Hemaglutinina	1	-0,03972	8
Transportador ABC permease de cadeia ramificada de aminoácido	1	-0,03972	8
Aspartato aminotransferase	1	-0,03972	8



353 **Figura 1.** Árvore filogenética do genoma completo de *Ralstonia solanacearum* mostrando o  
 354 posicionamento dos isolados IBSBF 2570 e CCRMSFC em relação a outros isolados de *Ralstonia* spp.,  
 355 obtida pelo método Mauve, em MegAlign Pro.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

---

---



## CONCLUSÕES GERAIS

No estado do Amazonas, foi detectado apenas o Moko da bananeira causado por *Ralstonia solanacearum* ecotipo Moko, com prevalência da sequevar IIA-24;

As subpopulações de *R. solanacearum* ecotipo Moko, do Amazonas e de Sergipe, possuem alta variabilidade genética, mas demonstram ausência de recombinação;

A ausência de recombinação nas subpopulações de *R. solanacearum* ecotipo Moko nos estados do Amazonas e Sergipe indica que este não é o principal mecanismo de variabilidade desta espécie, nas populações estudadas;

No Amazonas, nem a condição climática nem o ecossistema de plantio foram capazes de diferenciar as subpopulações;

Existe um possível papel dos genes efetores T3E nos sintomas atípicos apresentados pela “Síndrome Sergipe” do Moko da bananeira, causada por *R. solanacearum* ecotipo Moko sequevar IIA-53.