



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Dissertação de Mestrado**

**Estrutura genética de *Ralstonia pseudosolanacearum* no  
estado de Pernambuco**

**Rayanne Ferreira de Moraes**

**Recife – PE  
2018**

**RAYANNE FERREIRA DE MORAIS**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE *Ralstonia pseudosolanacearum* NO ESTADO DE  
PERNAMBUCO**

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

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza – Orientadora  
Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama – Coorientador  
Dr. Adriano Márcio Freire Silva – Coorientador

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO - 2018**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE *Ralstonia pseudosolanacearum* NO ESTADO DE  
PERNAMBUCO**

**RAYANNE FERREIRA DE MORAIS**

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 23/02/2018

**ORIENTADORA:**

---

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

**EXAMINADORES:**

---

Profa. Dra. Anna Carolina Soares Almeida (UFRPE)

---

Dra. Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque (UFRPE)

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO - 2018**

*Aos meus pais **Valdomiro Carrilho de  
Morais Júnior e Valdelia F. de Moraes**  
por serem meus guias e incentivadores,  
por terem me educado e por  
permanecerem comigo sempre.*

## **DEDICO**

*Ao meu noivo **Eliakim Urbano**, por ser a  
razão do meu sorriso, pelo amor e apoio  
em todos os momentos dessa trajetória.*

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por abençoar meus passos e fortalecer meu caminho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado em Fitopatologia.

À Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza, pela alegria de tê-la como exemplo, pela orientação, paciência, confiança e todos os ensinamentos transmitidos durante os momentos compartilhados.

Ao Dr. Adriano Márcio Freire Silva, por seu entusiasmo e solicitude, pela orientação, atenção e direcionamento fundamentais na construção desse trabalho.

A todos os professores e funcionários que fazem parte do Programa de Pós-Graduação, pela colaboração e ensinamentos, em especial a Profa. Dra. Rosa Mariano, pelo exemplo e inspiração e ao Prof. Dr. Marco Gama pelo apoio à realização dessa pesquisa e ensinamentos difundidos durante todo o curso.

Aos que fazem parte do Laboratório de Fitobacteriologia, Jéssica, Alba, Emanuel, Leandro Victor, Leandro Velez, Roberto, Pedro, Tarcísio, Beatriz, Bárbara, por terem sido companheiros e tornado os dias mais leves. Em especial a Dra. Greecy Mirian por seus ensinamentos e toda ajuda concedida em meus primeiros dias de bancada, e as amigas Alessandra, Claudeana, Ana Dulce, Ana Karolina e Géssyka pela disponibilidade e presença, que foi sentida a cada passo do trabalho.

Aos colegas Cássia, Rezanio, Dani, Carmem e Mari, pela colaboração nos estudos e amizade.

Aos meus amigos Ana Barros, Clariana Santos e Heraldo Oliveira, companheiros de apartamento e, mais do que isso, presença afetuosa em meu caminho.

Aos que contribuíram de alguma forma para a realização desta dissertação;

A todos agradeço.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	7
GENERAL ABSTRACT.....	8
CAPÍTULO I.....	9
1. Murcha bacteriana .....	10
2. Complexo <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	12
3. Estrutura genética de população .....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	21
CAPÍTULO II .....	28
Resumo .....	29
Abstract.....	30
Introdução .....	30
Material e Métodos .....	32
Seleção de isolados.....	32
Extração de DNA .....	33
Genotipagem com BOX-PCR.....	33
Análise da estrutura genética.....	34
Resultados .....	34
Discussão .....	37
Literatura citada .....	42
CONCLUSÕES GERAIS .....	59

## RESUMO GERAL

A murcha bacteriana é causada por espécies do complexo *Ralstonia solanacearum*, que inclui *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* e *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., entretanto, no Brasil foram relatadas apenas as duas primeiras espécies. Em Pernambuco há prevalência da espécie *R. pseudosolanacearum*, representando cerca de 92,5% dos isolados de *Ralstonia* spp. encontrados na região Agreste. Este trabalho teve por objetivo determinar a estrutura genética de populações de *R. pseudosolanacearum* oriundas de solanáceas em Pernambuco de acordo com as diferentes mesorregiões (Mata, Agreste e Sertão) e hospedeiros de origem dos isolados (tomate, pimentão e berinjela). Foram analisados perfis genômicos de 105 isolados com base em dados de BOX-PCR. Nas subpopulações de diferentes mesorregiões foram formados 37 haplótipos. Altos índices de riqueza e diversidade genotípicas foram encontrados. Quando comparada com as demais subpopulações, a da mesorregião Sertão apresentou a menor proporção de clones e os mais altos valores de diversidade gênica, diversidade genotípica e riqueza genotípica. As subpopulações estão em desequilíbrio de ligação, não havendo recombinação entre elas. Observou-se considerável variação entre subpopulações de diferentes mesorregiões, ainda que a variação dentro de subpopulações tenha sido maior. Os índices de diferenciação genética indicaram que a subpopulação do Sertão apresenta significativa diferenciação em relação às populações do Agreste e Mata e que as duas últimas não diferem entre si. A ocorrência de fluxo gênico entre as subpopulações avaliadas foi verificada pelo número de migrantes e haplótipos compartilhados, sendo consideravelmente menores entre a subpopulação do Sertão e das demais mesorregiões. Foi observada associação entre distâncias genética e geográfica. A diferenciação da subpopulação do Sertão em relação às das mesorregiões Agreste e Mata foi comprovada na análise discriminante dos componentes principais e na rede de haplótipos. Nas análises de acordo com hospedeiro não foi observada estruturação de acordo com hospedeiro de origem. O trabalho permitiu melhor compreensão acerca da estrutura genética de populações de *R. pseudosolanacearum* no estado de Pernambuco, indicando a existência de alta variabilidade genética e evidência da formação de grupos genéticos separados geograficamente.

**Palavras-chave:** murcha bacteriana, solanáceas, genética populacional, variabilidade.

## GENERAL ABSTRACT

The Bacterial wilt is caused by species of the *Ralstonia solanacearum* complex, which includes *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, and *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., being that in Brazil were related only the first two species. In Pernambuco there is the prevalence of the specie *R. pseudosolanacearum*, representing about 92% of the strains of *Ralstonia* spp. found in the region. The aim of this work was determinate the genetic structure of the populations of *R. pseudosolanacearum* coming from Solanaceae in Pernambuco according to different mesoregions (Mata, Agreste, and Sertão) and hosts of the strains (tomato, pepper, and eggplant). Genomic profiles of 105 isolates based on BOX-PCR data were analyzed. In the subpopulations of different mesoregions were established 37 haplotypes. High rate of abundance and genotypic diversities have been found. When compared with the other subpopulations, that from the mesoregion Sertão presented the lower proportion of clones and the biggest values of genic and genotypic diversity, and genotypic wealth. The subpopulations are in imbalance, without recombination among them. A significant variation among the populations from the different regions was seen, even though the variation inside the subpopulation has been greater. The genetic differentiation indices indicated that the subpopulation from the Sertão presents significant differentiation in relation to the populations of Agreste and Mata, where the last do not differentiated between them. The occurrence of gene flow among the subpopulations assessed were detected by the number of migrants and shared haplotypes, being significantly smaller among the subpopulation of the Sertão and other mesoregions. Association between genetic and geographic distances were perceived. The differentiation of the subpopulation of the Sertão in relation to the Agreste and Mata mesoregions been proven in the discriminant analysis of the main components and in the network of haplotypes. No arrangement was detected in the analysis according to the host of origin. This work allowed a better comprehension about the genetic structure of populations of *R. pseudosolanacearum* in the Pernambuco state. O trabalho permitiu melhor compreensão acerca da estrutura genética de populações de *R. pseudosolanacearum* no estado de Pernambuco, indicando the existence of high genetic variability and evidence of the formation of geographically separated genetic groups.

**Keywords:** bacterial wilt, Solanaceae, population genetics, variability.



## **CAPÍTULO I**

### **Introdução Geral**

# Estrutura genética de *Ralstonia pseudosolanacearum* no estado de Pernambuco

## 1. Murcha bacteriana

A murcha bacteriana é causada por espécies do complexo *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., que inclui *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* Safni et al. e *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov. Safni et al. (SAFNI et al., 2014), entretanto no Brasil foram relatadas apenas as duas primeiras espécies (ALBUQUERQUE et al., 2016; SANTIAGO et al., 2016). Trata-se de uma importante doença em todo mundo, capaz de causar danos em mais de 450 espécies de plantas distribuídas em cerca de 54 famílias botânicas (WICKER et al., 2007), abrangendo culturas de alto valor econômico como banana (*Musa* spp.), batata (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) (POUEYMIRO et al., 2014; XU et al., 2009). Em solanáceas, a bacteriose é considerada fator limitante para o cultivo, podendo inviabilizar a produção em áreas altamente infestadas, sendo capaz de provocar a murcha e morte da planta (CALDERÓN et al., 2014).

O primeiro relato da murcha bacteriana no Brasil, segundo Takatsu e Lopes (1997), foi feito por Von Parseval, em 1922, em fumo e batata, no estado do Rio Grande do Sul. Posteriormente, uma grande quantidade de informações sobre a ocorrência da doença em todo o país em diversas espécies economicamente importantes foi divulgada na literatura, refletindo a ampla distribuição do patógeno, assim como sua importância econômica (BRINGEL et al., 2004). Relatos de novos hospedeiros aparecem regularmente (DENNY, 2007), contudo as solanáceas ainda constituem as principais espécies de plantas infectadas pelo complexo *R. solanacearum*. Tais bactérias também são capazes de causar doença em hospedeiros lenhosos (SUPRIADI; MULYA; SIPETU, 2001) tendo sido relatada no Brasil em plantas de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (SUDO; OLIVEIRA; PEREIRA, 1983) e oliveira (*Olea europaea* L.) (TEBALDE et al., 2014).

Os maiores danos decorrentes da doença ocorrem em condições de altas temperaturas e umidade do solo, sendo historicamente limitante para culturas de alto valor econômico cultivadas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (COSTA; FERREIRA; LOPES, 2007). Com a expansão do cultivo protegido, representa uma séria ameaça também nas regiões Sul e Sudeste do país (LOPES; BOITEUX; ESCHEMBACH, 2015). Perdas decorrentes da ação do patógeno podem comprometer 100% da produção e inviabilizar a utilização do campo de cultivo, principalmente em plantios sucessivos, devido à capacidade de sobrevivência da bactéria no solo por longo período (LOPES; DUVAL, 2007).

Em Pernambuco, o primeiro relato da murcha bacteriana foi realizado em plantas de pimentão na mesorregião Mata, em 1987 (MARIANO; CABRAL; SILVA, 1988; MARIANO et al., 1987), mas acredita-se que a doença no estado antecede a esta data (MARIANO et al., 1989). A doença restringe o cultivo de tomate, pimentão e berinjela nos municípios produtores das mesorregiões do Agreste (Bezerros, Camocim de São Félix, Caruaru, Garanhuns e Sairé) e da Mata (Chã Grande) (GARCIA et al., 2013; MARIANO et al., 1989), bem como causa grandes prejuízos ao cultivo de solanáceas, principalmente tomateiro, nas mesorregiões do Sertão e Submédio do Vale do São Francisco (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Ao longo do seu ciclo de vida, isolados do complexo *Ralstonia solanacearum* sobrevivem em diversos ambientes, tais como água, solo, rizosfera, córtex da raiz e xilema de plantas hospedeiras. Em condições favoráveis invadem os tecidos da raiz através de ferimentos e colonizam os espaços intercelulares das raízes e tecidos da haste. A colonização completa dos espaços intercelulares do córtex da raiz e do parênquima vascular ocorre em dois a três dias (LIU et al., 2005). A multiplicação do patógeno progride rapidamente em direção aos vasos do xilema, a partir de então a bactéria é translocada juntamente com a água e nutrientes, atingindo todas as partes da planta, em uma densidade populacional superior a  $10^9$  UFC g<sup>-1</sup> de haste. Em decorrência da colonização ocorre a obstrução dos vasos causada pelo acúmulo de exopolissacarídeo, que é considerado o principal fator de virulência deste patógeno. 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 (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). Em virtude da colonização a planta reage formando tiloses, dificultando ainda mais a passagem de água. Conseqüentemente, plantas infectadas desenvolvem sintomas de murcha que são causados pela supressão do fluxo de água (PEETERS et al., 2013).

Altas temperatura e umidade, bem como a menor diversidade biológica decorrente do ambiente de monocultivo, com ampla disponibilidade de hospedeiros e ausência de micro-organismos antagonistas são condições favoráveis ao desenvolvimento da murcha bacteriana (CHAMPOISEAU; JONES; ALLEN, 2009). A distribuição da doença em campo geralmente ocorre em reboleiras, pela aglomeração de plantas murchas formando manchas nos locais onde ocorre acúmulo de água por vazamentos de canos de irrigação ou gotejadores (LOPES, 2009), principalmente durante os períodos mais quentes do dia (CALDERÓN et al., 2014). Os sintomas iniciais são escurecimento da região vascular mais visível na região próxima ao colo, murcha de folíolos e epinastia foliar, podendo haver recuperação das plantas nas horas

mais frescas do dia. A evolução da doença ocorre rapidamente, podendo resultar na morte da planta infectada (REMENANT et al., 2010).

O controle da murcha bacteriana é extremamente difícil, principalmente em condições ambientais favoráveis à doença (COSTA; FERREIRA; LOPES, 2007; DANNON; WYDRA, 2004; REMENANT et al., 2010), sendo importante compreender a biologia da interação entre patógeno e hospedeiro para o desenvolvimento de estratégias eficazes (DALSING; ALLEN, 2014). Nakaho et al. (2017) ressaltam que a ocorrência da murcha bacteriana em campo é de difícil controle por meio de pesticidas.

Como alternativa, diferentes estratégias já foram sugeridas para o manejo da doença, sendo recomendada a adoção do manejo integrado, com medidas preventivas e complementares de controle, posto que a prática de medidas isoladas, não é eficiente para evitar as perdas (LOPES, 2009). Dentre as medidas preventivas que têm sido preconizadas citam-se: manejo da água do solo a fim de evitar encharcamento; evitar ferimentos causados por nematóides, insetos ou implementos agrícolas; evitar movimentação de solo, a partir de focos da doença para outras áreas; eliminação de plantas doentes, voluntárias infectadas e invasoras da família Solanaceae ou remoção da área de plantio e fazer rotação de culturas, por no mínimo um ano, com gramíneas (LOPES; QUEZADO-SOARES, 2001).

Um método eficaz para evitar os danos causados por esta doença é a utilização de plantas enxertadas em variedades resistentes (LEE; BANG; HAM, 1998). Entretanto, em estudo sobre a eficácia de porta-enxertos de tomateiro no controle da murcha-bacteriana, Lopes; Boiteux e Eschembach (2015) relataram que em condições ambientais muito favoráveis e sendo utilizado como única estratégia, dificilmente o sistema de enxertia protegerá a planta enxertada de forma adequada contra a murcha bacteriana.

O melhoramento para resistência à murcha bacteriana constitui-se como medida eficiente para o controle da doença, mas é dificultada pela alta variabilidade genética do patógeno (SANTIAGO, 2014). Cultivares comerciais com resistência ampla à doença ainda não estão disponíveis no mercado (LOPES; BOITEUX; ESCHEMBACH., 2015). Deve-se considerar que o uso estratégico de cultivares resistentes depende de informações básicas relacionadas às condições ambientais, às características do hospedeiro e a estrutura e variabilidade genética da população do patógeno, que muitas vezes está sujeita a mudanças.

## **2. Complexo *Ralstonia solanacearum***

A bactéria agente causal da murcha bacteriana foi inicialmente denominada de *Bacillus solanacearum* Smith em 1896, depois de *Bacterium solanacearum* (Smith) Chester

em 1897, *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith em 1914, *Phytomonas solanacearum* (Smith) Bergey et al. em 1923 e *Burkholderia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. em 1992. Só em 1995 foi classificada no gênero *Ralstonia*, espécie *R. solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. com sua validação publicada em 1996 (Yabuuchi et al., 1996). O gênero *Ralstonia* pertence ao reino Procariotae, domínio Bacteria, divisão Proteobacteria, classe  $\beta$ -Proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Ralstoniaceae (KADO, 2010).

*Ralstonia solanacearum* é uma bactéria habitante do solo, aeróbica, em forma de bastonetes Gram-negativos, medindo 0,5 x 1,5  $\mu\text{m}$ , não formadora de esporos. Isolados virulentos são essencialmente não flagelados e não móveis, enquanto isolados avirulentos têm alta mobilidade sendo providos de 1 a 4 flagelos (RUEDA-PUENTE, et al. 2014; SILVA, 2013; SIRI et al., 2014).

Caracterizada pela alta diversidade de genótipos e fenótipos, *R. solanacearum* foi classificada a nível infra específico em cinco raças e seis biovars. A diferenciação entre raças é baseada na patogenicidade a diferentes plantas hospedeiras: raça 1 (solanáceas), raça 2 (bananas triplóides e helicônias), raça 3 (batata e tomate em regiões temperadas), raça 4 (gengibre - *Zingiber officinale* L.) e raça 5 (amoreira - *Morus nigra* L.) (BUDDENHAGEN, 1986). A classificação em biovars baseia-se na 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 (HAYWARD, 1994).

Utilizando a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi demonstrado por Cook; Barlow e Sequeira (1989) e Cook e Sequeira (1994) que os isolados de *R. solanacearum* podem ser classificados em duas divisões: divisão 1, que inclui isolados pertencentes aos biovars 3, 4 e 5, primariamente obtidos na Ásia, e divisão 2, que abrange todos os isolados pertencentes aos biovars 1, 2 e N2, obtidos das Américas. A dicotomia dos isolados de *R. solanacearum* foi confirmada em várias investigações empregando outras técnicas moleculares (GILLINGS; FAHY; DAVIES, 1993; SEAL; JACKSON; DANIELS, 1992; TAGHAVI et al., 1996)

O avanço das técnicas moleculares possibilitou a utilização de genes para inferência filogenética e caracterização genética de fitobactérias. Tal fato, resultou na reclassificação de *R. solanacearum* em um complexo de espécies. O complexo de espécies *R. solanacearum* tem sido conhecido por ser um conjunto heterogêneo de isolados que compartilham um alto grau de similaridade de sequências do gene 16S-23S rRNA (98-100%) (TAGHAVI et al., 1996), mas podem apresentar homologia DNA-DNA de menos de 70% (PALLERONI; DOUDOROFF, 1971). Fegan e Prior (2005) definiram o complexo como um grupo de

isolados relacionados, cujos membros individuais podem representar mais de uma espécie, incluindo além de *R. solanacearum*, 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, que ocorre em Java e Sumatra.

O complexo de espécies *R. solanacearum* é classificado hierarquicamente em quatro níveis taxonômicos capaz de suportar a diversidade existente na espécie, sendo eles: espécie, filotipo, sequevar e clone (FEGAN; PRIOR, 2005). As espécies são identificadas com os primers 759/760 (OPINA et al., 1997). Utilizando a técnica de filotipo multiplex-PCR com os primers da série Nmult da região ITS, os isolados do complexo podem ser divididos em quatro filotipos, altamente relacionados com a origem geográfica: filotipo I contendo isolados da Ásia; filotipo II (II-A e IIB), isolados das Américas; filotipo III, isolados da África; e filotipo IV, isolados da Indonésia, Japão, Filipinas, Coréia e Austrália (FEGAN; PRIOR, 2005). Isolados de *R. solanacearum* são encontrados nos filotipos I, II, III e IV, enquanto que os isolados de *Ralstonia syzygii* e BDB, apenas no filotipo IV. Esses quatro grupos genéticos em geral refletem as relações ancestrais e o provável local de origem das linhagens (CHAMPOISEAU, JONES; ALLEN, 2009) demonstrando que diferentes forças ecológicas seletivas operam em cada habitat (KINKEL et al., 1987; POZO et al., 2012; WHIPPS et al., 2008).

Diante da diversidade existente na população do complexo *R. solanacearum* o sequenciamento parcial dos genes *egl* (endoglucanase) e/ou *mutS* (reparo de DNA mismatch) tornou possível separar os isolados de cada filotipo em sequevares. Uma sequevar é definida como um grupo de isolados com a maior conservação de sequência dentro da região gênica estudada (FEGAN; PRIOR, 2005) com divergência menor que 1%, sendo determinadas por relacionamento filogenético dos genes *egl* e/ou *mutS*, e só podem ser definidas, se dois ou mais isolados sequenciados apresentarem sequências similares (FEGAN; PRIOR, 2005; VILLA et al., 2003; WICKER et al., 2007; XU et al., 2009). Atualmente já foram identificadas 63 sequevares (FEGAN; PRIOR, 2005; GUTARRA et al., 2017; SANTIAGO et al., 2016; SILVA, 2014; XU et al., 2009). Por sua vez, cada sequevar pode ser composta por linhas clonais (clones), identificadas através de perfis genômicos utilizando métodos como rep-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic PCR*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e PFGE (*Pulsed-field Gel Electrophoresis*) (FEGAN; PRIOR, 2005).

Baseado em análises de sequências multilocus (MLSA) de isolados representativos dos quatro filotipos, Wicker et al. (2012) separaram os mesmos em oito grupos com distinto

padrão evolucionário, denominando-os de clados. O clados 1 e 6, relacionado ao filotipo III; os clados 2 e 3 ao filotipo IIA, e 4 e 5 ao filotipo IIB; e os clados 7 e 8 ao filotipo IV.

A partir de dados de sequenciamento de genoma, características bioquímicas, culturais, fisiológicas e de hibridização DNA-DNA, Safni et al. (2014) propuseram uma reclassificação taxonômica do complexo *R. solanacearum*, em três espécies independentes e subespécies, sendo *R. pseudosolanacearum* constituída de isolados pertencentes aos filotipos I e III; *R. solanacearum*, pelos isolados do filotipo II (IIA e IIB); *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., agrupou os isolados de *R. solanacearum* causadores de murcha em solanáceas, anteriormente pertencentes ao filotipo IV, composto principalmente por isolados da Indonésia, Japão, Austrália e Filipinas; *R. syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov. Safni et al. agrupou os isolados de *R. syzygii* e como *R. syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. Safni et al. os anteriormente classificados como BDB. Utilizando análises de genoma, filogenômica e proteômica essa nova classificação também foi apoiada pelas pesquisas conduzidas por Prior et al. (2016) e Zhang e Qiu (2016), que detectaram a diferenciação entre os isolados dos filotipos II e IV e a relação entre os isolados dos filotipos I e III. No Brasil a doença é causada apenas por *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* (SANTIAGO et al., 2016).

A reclassificação do complexo *R. solanacearum* nas três espécies propostas por Safni et al. (2014) não exclui a utilização dos filotipos, clados e sequevares como marcadores de diversidade genética de *Ralstonia* spp., os quais continuam sendo estimados em diversos trabalhos (CHESNEAU et al., 2018; GUTARRA et al., 2017; RAVELOMANANTSOA et al., 2018; SANTIAGO et al., 2016) e podem ser utilizados para esclarecer as características de todas as espécies que causam a murcha bacteriana.

A maioria dos trabalhos desenvolvidos no Brasil com o objetivo de caracterizar os isolados do complexo *R. solanacearum* quanto a filotipos e sequevares foram realizados antes da reclassificação de Safni et al. (2014). No Brasil são encontrados os filotipos I e II (IIA e IIB), com elevada diversidade na população, ocorrendo 13 sequevares em solanáceas (I-17, I-18, IIA-41, IIA-50, IIA-58, IIA-59, IIB-2, IIB-25, IIB-28, IIB-54, IIB-55, IIB-56 e IIB-57), dos quais seis foram detectadas em tomateiro: I-18, IIA-41, IIA-50, IIA-58, IIA-59 e IIB-54. As sequevares I-18 e IIB-54 ocorrem apenas nas regiões Norte/Nordeste e Sul/Sudeste do Brasil, respectivamente; a sequevar IIA-41 nas regiões Central, Norte e Nordeste; IIA-50 em todas as regiões brasileiras (ALBUQUERQUE et al., 2016; SANTIAGO et al., 2016); e as sequevares, IIA-58 e IIA-59 foram relatadas apenas em Pernambuco, excetuando-se a IIA-59 que também foi encontrada em pepineiro (*Cucumis sativus* L.) no Amazonas (J. R. Silva, comunicação pessoal, fev, 2017). No entanto, é possível correlacionar os filotipos a todas as

espécies causadoras de murcha bacteriana, estando assim presentes no Brasil em solanáceas *R. pseudosolanacearum* (filotipo I) e *R. solanacearum* (filotipo II).

Apesar de todo conhecimento adquirido ao longo dos anos sobre a murcha bacteriana e diversidade genética do seu agente causal, poucos estudos investigaram como está estruturada a população da bactéria no Brasil (SANTIAGO, 2014).

### **3. Estrutura genética de população**

Define-se como estrutura genética a quantidade e distribuição da variação existente entre e dentro das populações, sendo resultante da interação entre as forças que atuam na evolução, seleção, mutação, deriva, fluxo gênico e recombinação (MCDONALD; LINDE, 2002). A quantidade de variação genética entre indivíduos de uma mesma população, a distribuição da variação no tempo e no espaço e as relações genéticas entre os indivíduos dentro e entre linhagens, podem ser determinadas. É possível, também, demonstrar se a fonte de inóculo encontra-se a curtas ou longas distâncias, detectar o movimento e a dinâmica das populações de diferentes genótipos e, em alguns casos, descrever a origem de um fitopatógeno (MILGROOM, 2015; SCORTICHINI, 2005).

O estudo de estrutura genética objetiva a quantificação espacial e temporal da distribuição heterogênea dos alelos e genótipos (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). A determinação da estrutura populacional de patógenos é um passo crucial para a previsão de sua variabilidade genética, da origem de uma epidemia, a disseminação de linhagens clonais, o surgimento ou o ressurgimento de novas populações, a eficácia das medidas de controle (HALLIN; DEPLANO; STRUELENS, 2012) e a adequação dos protocolos de detecção do fluxo de patógenos fitopatogênicos (FERRANTE; SCORTICHINI, 2015).

Tradicionalmente, a estrutura genética de populações é estudada por meio da abordagem frequentista de Wright (1931, 1949) ou de Nei (1978). Uma vez realizada a determinação das populações, a frequência dos alelos e genótipos em cada uma destas populações é analisada (MANK; AVISE, 2004). Tais análises podem ser conduzidas através de diferentes técnicas moleculares. A técnica de reação em cadeia da polimerase em sequências palindrômicas extragênicas repetidas (rep-PCR) tem sido descrita como um método que gera perfis gnômicos de DNA para diferenciação genotípica de isolados de *Ralstonia* spp. (XU, 2010; STEVENS; ELSAS, 2010). O método baseia-se na amplificação do DNA e constitui-se como uma técnica extremamente confiável, reprodutível, rápida e altamente discriminatória (VERSALOVIC et al., 1994; LOUWS et al., 1996). Segundo Rademaker et al. (2000) métodos que geram perfis genômicos, como rep-PCR, apresentam



elevada correlação com a homologia DNA-DNA reafirmando a especificidade e eficiência dessa técnica na identificação de espécies bacterianas.

A técnica de rep-PCR faz uso de marcadores moleculares atuando como iniciadores de DNA complementares àqueles de ocorrência natural, altamente conservado, com sequências repetitivas de DNA, presente em múltiplas cópias do genoma da maioria das bactérias Gram negativas e em muitas bactérias Gram positivas (LUPSKI; WEINSTOCK, 1992). Três famílias de sequências repetitivas têm sido identificadas, incluindo sequências repetitivas extragênicas palindrômicas (REP), sequências consenso intergênica repetitivas enterobacterianas (ERIC) e elemento BOX (VERSALOVIC et al., 1994). Estas sequências parecem estar localizadas em diferentes posições intergênicas ao redor do genoma. 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). O uso destes marcadores e a PCR levam à amplificação seletiva de regiões genômicas distintas localizadas entre os elementos REP, ERIC e BOX. Os protocolos correspondentes são referidos como REP-PCR, ERIC-PCR ou BOX-PCR (VERSALOVIC et al., 1994). Os fragmentos amplificados podem ser visualizados em gel de agarose, produzindo um perfil genômico (VERSALOVIC et al., 1994).

Marcadores genéticos atuam como ferramentas moleculares fornecendo aos fitopatologistas a possibilidade de avaliar a estrutura populacional de patógenos, incluindo bactérias fitopatogênicas (FRANCISCO et al., 2016; LEHNER et al., 2017; SANTIAGO, 2014). Através do uso de marcadores moleculares, como o BOX, é possível constatar como a variabilidade está distribuída entre as populações e a partir de então realizar inferências quanto aos padrões de cruzamentos e dispersão, fluxo gênico e histórico biogeográfico da espécie (SCHNABEL et al., 1998). Tais marcadores também podem possibilitar o rastreamento da epidemia e a disseminação pandêmica de isolados particulares, proporcionando uma visão geral em longo prazo dos padrões epidemiológicos (ACHTMAN, 2008) reconstruindo assim a história evolutiva do patógeno.

Diversidade genética deve ser compreendida a partir dos parâmetros riqueza e equitabilidade, sendo estes definidos como o número de genótipos presentes em uma população e a forma com a qual os genótipos estão distribuídos dentro das populações, respectivamente (LEHNER, 2011). Segundo McDonald e Linde (2002) a estrutura de uma população é influenciada por dois tipos de diversidade genética: diversidade gênica que infere sobre o número e frequência de alelos em locos individuais numa população e diversidade

genotípica, referente ao número e a frequência de combinações alélicas que pode ser feita entre locos diferentes, resultando em genótipos ou indivíduos geneticamente distintos em uma população. Grünwald et al. (2003) afirmam que em populações de micro-organismos os índices de diversidade gênica e genotípica são necessários para estimar a diversidade genética.

A estrutura genética é estimada por meio do  $F_{ST}$  ou pela AMOVA e ambos geram resultados semelhantes (NYBOM; BARTISH, 2000). Wright (1931) desenvolveu um quadro conceitual e matemático para descrever a distribuição da variação genética dentro de uma espécie utilizando uma série de coeficientes de endogamia:  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  e  $F_{IT}$ , atualmente conhecidas como estatísticas F. Tais medidas calculam o déficit de heterozigotos em relação às proporções esperadas de Hardy-Weinberg na população-base especificada (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Ou seja, F é a proporção pela qual a heterozigosidade da população analisada é reduzida em relação à heterozigosidade de uma população em acasalamento aleatório. O índice  $F_{ST}$  é uma medida da divergência de frequência de alelos entre as subpopulações que determina proporção da variância genética total contida em uma subpopulação em relação a da variância genética total da população (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013).

A análise de variância AMOVA, formulada por Excoffier et al. (1992), caracteriza-se como metodologia de análise da 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. De acordo com Zucchi et al. (2005) a AMOVA é facilmente aplicável em diversas situações, constituindo-se como uma ferramenta coerente e flexível para análise de dados moleculares.

A diversidade genética total ( $H_t$ ) descreve a distribuição da variabilidade genética contida em populações subdivididas (NEI, 1973). De acordo com Hartl e Clark (2010) a equação de Nei pode ser aplicada a diferentes níveis da classificação hierárquica, tais como, populações dentro de uma região geográfica, subpopulações dentro de populações e indivíduos dentro de subpopulações.

O percentual de polimorfismo (P) reflete quantitativamente a proporção de locos polimórficos de uma população ou amostra. Este índice baseia-se na razão do número de locos polimórficos pelo número total de locos analisados da população ou amostra, permitindo a verificação da quantidade existente de variação genética em uma população, bem como a comparação desta com outras populações (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

O índice de Shannon-Wiener (1949) é comumente utilizado em estudos ecológicos para indicar a diversidade de espécies em uma área (LEWONTIN, 1995), sendo adequado para análise de amostras coletadas ao acaso em grandes comunidades (BROWN; WEIR, 1983). Esse índice é bastante interessante como medida de diversidade populacional, quando se utiliza dados dominantes, ou seja, não permite a detecção de genótipos heterozigotos (PAIVA, 2014).

Desequilíbrio de ligação é um fenômeno biológico onipresente, entendido como estatística associação entre alelos em diferentes loci, que pode ser provocada por diferentes processos biológicos. De acordo com Agapow e Burt (2001) estes processos incluem a diferenciação da população e o isolamento pela distância, reprodução assexuada e seleção natural. Uma métrica comum para desequilíbrio de ligação de multilocus, o índice de associação ou  $I_A$  (MAYNARD SMITH et al., 1993), baseia-se na variância de distâncias emparelhadas entre os indivíduos, ou seja, o número de loci em que eles diferem, comparando a variância dessas distâncias com àquelas esperadas se não houvesse desequilíbrio gamético entre os pares de loci e é dependente do tamanho da amostra. Uma modificação de  $I_A$  que remove essa dependência é o  $r_{barD}$  ( $r_d$ ), pois em grande parte é independente do tamanho da amostra, sendo menos sensível à variação no número de locos e devendo, portanto, facilitar comparações entre populações (AGAPOW; BURT, 2001).

A análise discriminante de componentes principais (DAPC) é um método multivariado concebido para identificar e descrever grupos de indivíduos geneticamente relacionados, permitindo a caracterização da subdivisão da população e a visualização da diferenciação entre populações, bem como a contribuição de alelos individuais para a estruturação da população (JOMBART et al., 2010).

O conhecimento da estrutura genética possibilita a compreensão dos processos evolutivos que moldaram uma população no passado e pode mensurar seu potencial evolutivo, sendo útil para a compreensão e desenvolvimento de estratégias de controle e programas de melhoramento que visam desenvolver cultivares com resistência durável, aprimorando o uso de genes de resistência e minimizando as perdas que resultam da redução de eficácia dos métodos convencionais de controle (MCDONALD; LINDE, 2002; MILGROOM; FRY, 1997).

Alguns estudos sobre estrutura genética de bactérias fitopatogênicas já foram realizados para *Xylela fastidiosa* (Wells et al.), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel), *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Starr e Garces) e *R. solanacearum* (FRANCISCO et al., 2016; MELO, 2016; OGUNJOBI; FAGADE; DIXON, 2006;

SANTIAGO, 2014).

A estrutura de população de *R. solanacearum* no Brasil foi avaliada por Santiago (2014), que neste estudo considerou o complexo *R. solanacearum*, incluindo espécies dos filotipos I e II em uma mesma população e, além disso, foram utilizados poucos isolados da região do Nordeste do Brasil, restritos a tomateiro, batateira e eucalipto. Assim, é importante conhecer a estrutura da população de *R. pseudosolanacearum* das principais solanáceas cultivadas nas mesorregiões de Pernambuco. Compreender a estrutura genética da população da bactéria é epidemiologicamente importante e tem implicações diretas no manejo da doença.

Este trabalho teve como objetivo determinar a estrutura genética de populações *de R. pseudosolanacearum* oriundas de solanáceas no estado de Pernambuco (Nordeste, Brasil) de acordo com as diferentes mesorregiões e hospedeiros de origem dos isolados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHTMAN, M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 62, n. 1, p. 53-70, 2008.
- AGAPOW, P.M.; BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Notes**, Malden, v.1, n. 1-2, p.101-102. 2001.
- ALBUQUERQUE, G. M. R.; SILVA, A. M. F.; SILVA, J. R.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R. First Report of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* on *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 11, p. 2319, 2016.
- 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. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2011. 704 p.
- BALLOUX, F.; LUGON- MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 155-165, 2002.
- BERGEY, D. H. (Ed.). **Manual of systematic bacteriology: the Proteobacteria**. 1 ed. New York: Springer-Verlag, 1923. v. 2, 442p.
- BRINGEL, J. M.; BEDENDO, I. P.; GUIMARÃES, P. M.; LOPES, C. A. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 isolates of potato and eggplant from Brazil by PCR. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 30, n. 3, p. 350-355, 2004.
- BROWN, A. H.; WEIR, B. S. **Measuring genetic variability in plant populations**. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding, part A**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1983. v.1, cap.3, p.219-239.
- BUDDENHAGEN, I. W. **Bacteria wilt revisited**. In: PERSLEY, G. J.; BATUGAL, P. A. **Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific: Proceedings of an International Workshop**, PCARRD, Los Banos, Philippines. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1986. v. 1, n. 13, p. 126-143.
- CALDERÓN, R.; CASTRO, O.; ARAUZ, F.; BONATTI, J. Use of infrared sensors for early detection of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato Plants. **World Conference on Computers in Agriculture and Natural Resources**, San Jose, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2014.
- CHAMPOISEAU, P. G.; JONES, J. B.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. **Plant Health Progress**, Saint Paul, v. 10, p. 1-10, 2009.
- CHESNEAU, T.; MAIGNIEN, G.; BOYER, C.; CHERON, J. J.; ROUX-CUVELIER, M.; VANHUFFEL, L.; POUSSIER, S.; PRIOR, P. Sequevar diversity and virulence of *Ralstonia solanacearum* phylotype I on Mayotte Island (Indian Ocean). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, p. 1-10, 2018.
- COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 2, n. 3, p. 113-121, 1989.
- COOK, D.; SEQUEIRA, L. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. CAB International, Wallingford, 1994. p. 77-93.
- 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.
- CRUZ, C.; FERREIRA, F.; PESSONI, L. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: Editora UFV, v. 1, 2011. 620 p.

- DALSING, B.L.; ALLEN, C. Nitrate assimilation contributes to *Ralstonia solanacearum* root attachment, stem colonization, and virulence. **Journal of bacteriology**, Poznań, v. 196, n. 5, p. 949-960, 2014.
- DANNON, E.A.; WYDRA, K. Interaction between silicon amendment, bacterial wilt development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Michigan, v. 64, n. 5, p. 233-243, 2004.
- DENNY, T. P. **Plant pathogenic *Ralstonia* species**. In: GNANAMANICKAM S.S. **Plant-associated bacteria**. Dordrecht: Springer Publishing, v. 1, 2007. p. 573-644.
- 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.
- FEGAN, M; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. Saint Paul: APS Press, 2005. 449-461 p.
- FERRANTE, P.; SCORTICHINI, M. Redefining the global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* based on pathogenic, molecular and phenotypic characteristics. **Plant Pathology**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 51-62, 2015.
- FRANCISCO, C.S.; ALMEIDA, R.; CERESINI, P.; COLETTA-FILHO, H. D. Spatial genetic structure of coffee-associated *Xylella fastidiosa* populations indicates that cross-infection does not occur with sympatric citrus orchards. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 107, n. 4, p. 395-402, 2016.
- 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.
- GILLINGS, M.; FAHY, P.; DAVIES, C. Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 44-48, 1993.
- 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.
- GUTARRA, L.; HERRERA, J.; FERNANDEZ, E., KREUZE, J.; LINDQVIST-KREUZE, H. Diversity, Pathogenicity, and Current Occurrence of Bacterial Wilt Bacterium *Ralstonia solanacearum* in Peru. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 8, p. 1-12, 2017.
- HALLIN, M.; DEPLANO, A.; STRUELENS, M. J. **Molecular typing of bacterial pathogens: a tool for the epidemiological studies and control of infectious diseases**. In MORAND, S.; BEAUDEAU, F.; CABARET, J. **New frontiers of molecular epidemiology of infectious diseases**. Netherlands: Springer Science & Business media. 2012. p. 9-25.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de População**. 4º ed. Sunderland: Sinauer associates Sunderland. 2010. 659 p.
- HAYWARD, A. C. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In HARTMAN, G. L.; HAYWARD, A. C. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. CAB International, Wallingford, 1994. p. 123-136.
- JOMBART, T. Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, Oxford: v. 24, n. 11, p. 1403-1405, 2010.
- KADO, C. **Plant bacteriology**, St. Paul: APS Press, 2010. 336 p.
- KINKEL, L. L.; ANDREWS, J. H.; BERBEE, F. M.; NORDHEIM, E. V. Leaves as islands for microbes. **Oecologia**, Berlin, v. 71, n. 3, p. 405-408. 1987.

- LEE, J. M.; BANG, H. J.; HAM, H. S. Grafting of Vegetables (Grafting and Raising of Seedlings, For Further Development of Horticulture in East Asia). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 67, n. 6, p. 1098-1104, 1998.
- LEFEUVRE, P.; DE CAMBIAIRE, J. C.; LEMAIRE, C.; POUSSIER, S.; PRIOR, P. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. **International Society for Microbial Ecology Journal**, England, v. 6, n. 5, p. 961-974, 2012.
- LEHNER, M. S. **Estrutura genética da população de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoados de Minas Gerais**. 2011, 42 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2011.
- LEHNER, M. S.; DE PAULA JÚNIOR, T. J.; DEL PONTE, E. M.; MIZUBUTI, E. S.; PETHYBRIDGE, S. J. Independently founded populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from a tropical and a temperate region have similar genetic structure. **PLoS one**, San Francisco, v. 12, n. 3, p. e0173915, 2017.
- LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary biology**. Chicago: Springer, 1995. p. 381-398.
- LIU, H. L.; ZHANG, S. P.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Pyramiding, unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall degrading enzymes contribute to virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 12, p. 1296-1305, 2005.
- LOPES, C. A. **Murcha bacteriana ou murchadeira: uma inimiga do tomateiro em climas quentes**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. 8 p. (Circular Técnica, 67).
- LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S.; ESCHEMBACH, V. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 125-130, 2015.
- LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças - diagnose e controle**. Brasília: Embrapa - CNPH, 2001. 72 p.
- LOUWS, F. J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J. Assessing genetic diversity of microbes using repetitive sequence-based PCR (rep-PCR). In: TORANZOS, G. (Eds.) **Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Environmental Samples**. Lancaster: Technomic Publishing, 1996. 63-94 p.
- LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of bacteriology**, Poznań, v. 174, n. 14, p. 4525, 1992.
- MANK, J. E.; AVISE, J. C. Individual organisms as units of analysis: Bayesian clustering alternatives in population genetics. **Genetical Research**, London, v. 84, n. 3, p. 135-143, 2004.
- MARIANO, R. L. R.; CABRAL, G. B.; SILVA, M. S. S. G. Levantamento das fitobacterioses do Estado de Pernambuco em 1987. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13 (Supl.), p. 130, 1988.
- MARIANO, R. L. R.; MELO, R. A. G.; HOLANDA, V. T.; CABRAL, G. B.; SILVA, M. S. S. G. Levantamento das fitobacterioses do estado de Pernambuco no biênio 1987-1988. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 158, 1989.
- MAYNARD SMITH, J.; SMITH, N.H.; O'ROURKE, M.; SPRATT, B.G. How clonal are bacteria?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 90, n. 10, p. 4384-4388, 1993.
- 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.
- MELO, E. A. **Estrutura de população e caracterização filogenética de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do Estado de Pernambuco**. 2016, 91f., Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.
- MILGROOM, M. G. **Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology and Evolution**. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, 2015. 399 p.

MILGROOM, M. G.; FRY, W. E. Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. **Advances in Botanical Research**, Birmingham, v. 24, p. 1-30, 1997.

NAKAHO, K.; SEO, S.; OOKAWA, K.; INOUE, Y.; ANDO, S.; KANAYAMA, Y.; MIYASHITA, S.; TAKAHASHI, H. Involvement of a vascular hypersensitive response in quantitative resistance to *Ralstonia solanacearum* on tomato rootstock cultivar LS-89. **Plant Pathology**, Oxford, v. 66, n. 1, p. 150-158, 2017.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

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.

OGUNJOBI, A. A.; FAGADE, O. E.; DIXON, A. G. O. Molecular variation in population structure of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in the South-eastern Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 20, p. 1868-1872, 2006.

OPINA, N.; TAVNER, F.; HOLLOWAY, G.; WANG, J.F.; LI, T.H.; MAGHIRANG, R.; FEGAN, M.; HAYWARD, A.C.; KRISHNAPILLAI, V.; HONG, W.F.; HOLLOWAY, B.W.; TIMMIS, J.N. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, Serdang, v. 5, n. 1, p. 19-30, 1997.

PAIVA, B. A. R. **Caracterização fenotípica e molecular de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* procedentes de regiões produtoras de feijoeiro-comum no Brasil**. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

PALLERONI, N. J.; DOUDOROFF, M. Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Bacteriology**, Poznań, v. 107, n. 3, p. 690-696, 1971.

PEETERS, N.; GUIDOT, A.; VAILLEAU, F.; VALLS, M. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. **Molecular plant pathology**, Chichester, v. 14, n. 7, p. 651-662, 2013.

POUEYMIRO, M.; CAZALÉ, A. C.; FRANÇOIS, J. M.; PARROU, J. L.; PEETERS, N.; GENIN, S. A *Ralstonia solanacearum* Type III Effector Directs the Production of the Plant Signal Metabolite Trehalose-6-Phosphate. **mBio**, Washington, v. 5, n. 6, p. 1-9, 2014.

POZO, M. I.; LACHANCE, M.A.; HERRERA, C. M. Nectar yeasts of two southern Spanish plants: the roles of immigration and physiological traits in community assembly. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 80, n. 2, p. 281-293, 2012.

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. 1-11, 2016.

RADEMAKER, J.L.W.; HOSTE, B.; LOUWS, F.J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; DE BRUIJIN, F.J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 50, n. 2, p. 665-677, 2000.

RAVELOMANANTSOA, S.; VERNIERE, C.; RIEUX, A.; COSTET, L.; CHIROLEU, F.; ARRIBAT, S.; CELLIER, G.; PRUVOST, O.; POUSSIER, S.; ROBÈNE, I.; GUÉRIN, F.; PRIOR, P. Molecular Epidemiology of Bacterial Wilt in the Madagascar Highlands Caused by Andean (Phylotype IIB-1) and African (Phylotype III) Brown Rot Strains of the *Ralstonia Solanacearum* Species Complex. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, n. 2258, p. 1-17, 2018.



- REMENANT, B.; COUPAT-GOUTALAND, B.; ALICE GUIDOT, A.; CELLIER, G.; WICKER, E.; ALLEN, C.; FEGAN, M.; PRUVOST, O.; ELBAZ, M.; CALTEAU, A.; SALVIGNOL, G.; MORNICO, D.; MANGENOT, S.; BARBE, V.; MÉDIGUE, C.; PRIOR, P. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. **BMC genomics**, London, v. 11, n. 1, p. 379, 2010.
- RUEDA-PUENTE, E.O.; HERNÁNDEZ-MONTIEL, L.G.; HOLGUÍN-PEÑA, R. J.; RUIZ ESPINOZA, F. H.; LÓPEZ ELÍAS, J.; HUEZ LOPEZ, M.A.; JIMÉNEZ LEÓN, J.; BORBOA FLORES, J.; ORTEGA-GARCÍA, J. *Ralstonia solanacearum*: Una enfermedad bacteriana de importancia cuarentenaria en el cultivo de *Solanum tuberosum*. **Editorial UNISON**, Caborca, v. 9, n. 1, p. 24-36, 2014.
- SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN M.; SLY, L.; KAPPLER, U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *Syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **International Journal Systematic Evolution Microbiology**, Reading, v. 64, n. 9, p. 3087-3103, 2014.
- SANTIAGO, T. R. **A deep analysis of the genetic structure of *Ralstonia solanacearum* in brazil reveals not much sex in the population.** 2014, 85f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- SANTIAGO, T. R.; LOPES, C. A.; CAETANO- ANOLLÉS, G.; MIZUBUTI, E. S. G. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. **Plant Pathology**, Oxford, v. 66, n. 3, p. 383-392, 2016.
- SCHNABEL, A.; BEERLI, P.; ESTOUP, A.; HILLIS, D. **A guide to software packages for data analysis in molecular ecology.** In: CARVALHO, G.R. **Advances in Molecular Ecology.** Amsterdam: NATO Science Series, 1998. v. 306, cap. 18, p. 291-297.
- SCORTICHINI, M. The population structure of some plant pathogenic bacteria: an ecological and adaptive perspective. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 87, n. 1, p. 5-12, 2005.
- SEAL, S. E.; JACKSON, L. A.; DANIELS, M. J. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3759-3761, 1992.
- SILVA, E.S. **Enxertia no controle da murcha bacteriana na atividade de enzimas e produção em tomateiro.** 2013. x, 86 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2013.
- SILVA, J. R. **Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões Norte e Nordeste do Brasil.** 2014. 48f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.
- SIRI, M. I.; SANABRIA, A.; BOUCHER, C.; PIANZZOLA, M. J. New Type IV Pili-Related Genes Involved in Early Stages of *Ralstonia solanacearum* Potato Infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 27, n. 7, p. 712-724, 2014.
- SMITH M.J.; SMITH, N.H.; O'ROURKE, M.; SPRATT, B.G. How clonal are bacteria?. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p.4384-4388. 1993.
- SMITH, E. F. (Ed.). *Bacteria in relation to plant disease.* Washington: Carnegie Institution, 1914. v. 1, 309p.
- SMITH, E. W. A Bacterial disease of the Tomato, Eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.) U. S. Department of Agriculture, Division of Vegetable **Physiology and Pathology**. Bulletin 12, p. 1-28, 1896.
- STEVENS, P.; ELSAS, J.D. Genetic and phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 strains obtained from Dutch waterways. **Antonie Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.97, n.2, p. 171-188. 2010.

- SUDO, S.; OLIVEIRA, G. H. N.; PEREIRA, A. C. Eucalipto (*Eucalyptus* sp) e Bracatinga (*Mimosa escabrela*), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* EF Smith. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, p. 631, 1983.
- SUPRIADI D.; MULYA K.; SIPETU D. Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Ralstonia solanacearum*: a review. **Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian**, Bogor, v. 20, n. 3, p. 106-112, 2001.
- TAGHAVI, M.; HAYWARD, C.; SLY, L. I.; FEGAN, M. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 46, n. 1, p. 10-15, 1996.
- TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 3, p. 170-177, 1997.
- TEBALDI, N. D.; LEITE, L. N.; MARQUES, J. M. D.; FURLANETTO, M. C. A.; MOTA, L. C. B. M. Occurrence of *Ralstonia solanacearum* on olive tree in Brazil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 4, n. 2, p. 185, 2014.
- 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.
- VILLA, J.; TSUCHIYA, K.; HORITA M.; NATURAL M.; OPINA N.; HYAKUMACHI, M. DNA analysis of *Ralstonia solanacearum* and related bacteria on 282-pb PCR amplified fragment. **Plant Disease**, Saint Paul v. 87, n. 11, p. 1337-1343, 2003.
- WHIPPS, J. M.; HAND, P.; PINK, D.; BENDING, G. D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 105, n. 6, p.1744-1755, 2008.
- 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.; LEMAIRE, C.; POUSSIER, S.; PRIOR, P. (2012). Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. **Journal of the International Society for Microbial Ecology**, Wageningen, v. 6, n. 5, p. 961, 2012.
- WRIGHT, S. Statistical methods in biology. **Journal of the American Statistical Association**, New York, v. 26, n. 173A, p. 155-163, 1931.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of eugenics**, London, v. 15, n. 1, p. 323-354, 1949.
- XU, J. **Molecular plant breeding**. Wallingford: CAB International, 734 p. 2010.
- 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, n. 4, p. 641-653, 2009.
- YABUUCHI, E.; KOSARO, Y.; OYIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.
- YABUUCHI, E.; 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, 1996.

ZHANG, Y.; QIU, S. Phylogenomic analysis of the genus *Ralstonia* based on 686 single-copy genes. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 109, n. 1, p. 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 genética de *Ralstonia pseudosolanacearum* no estado de Pernambuco, Brasil**

*Submeter à European Journal of Plant Pathology*

1 **Estrutura genética de *Ralstonia pseudosolanacearum* no estado de Pernambuco,**  
2 **Brasil**

3  
4 Rayanne F. de Moraes, Greecy M. R. Albuquerque, Adriano M. F. Silva, Marco A.  
5 Siqueira Gama, Elineide B. Souza

6 Primeiro ao quarto autor: Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de  
7 Pernambuco, Recife-PE, Brasil; quinto autor: Departamento de Biologia, Universidade  
8 Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

9 Autor para correspondência: Elineide B. Souza; E-mail: elineidebs@yahoo.com.br

10  
11 **Resumo**

12 Este trabalho teve por objetivo determinar a estrutura genética de populações de  
13 *Ralstonia pseudosolanacearum* oriundas de solanáceas em Pernambuco, região  
14 Nordeste, Brasil, de acordo com as diferentes mesorregiões (Mata, Agreste e Sertão) e  
15 hospedeiros de origem dos isolados (tomate, pimentão e berinjela). O estudo foi  
16 realizado com 105 isolados com base em dados de BOX-PCR. Nas subpopulações das  
17 diferentes mesorregiões foram formados 37 haplótipos. Altos índices de riqueza e  
18 diversidade genotípicas foram encontrados. Quando comparada com as demais  
19 subpopulações, a da mesorregião Sertão apresentou a menor proporção de clones e os  
20 mais altos valores de diversidade gênica, diversidade genotípica e riqueza genotípica.  
21 As subpopulações estão em desequilíbrio de ligação, não havendo recombinação entre  
22 elas. Observou-se considerável variação entre subpopulações de diferentes  
23 mesorregiões, ainda que a variação dentro de subpopulações tenha sido maior. Os  
24 índices de diferenciação genética indicaram que a subpopulação do Sertão apresenta  
25 significativa diferenciação em relação às populações do Agreste e Mata e que as duas  
26 últimas não diferem entre si. A ocorrência de fluxo gênico entre as subpopulações  
27 avaliadas foi verificada pelo número de migrantes e haplótipos compartilhados, sendo  
28 consideravelmente menores entre a subpopulação do Sertão e das demais mesorregiões.  
29 Foi observada associação entre distâncias genética e geográfica. A diferenciação da  
30 subpopulação do Sertão em relação às das mesorregiões Agreste e Mata foi comprovada  
31 na análise discriminante dos componentes principais e na rede de haplótipos. Nas  
32 análises de acordo com hospedeiro não foi observada estruturação de acordo com  
33 hospedeiro de origem. O trabalho permitiu melhor compreensão acerca da estrutura  
34 genética de populações de *R. pseudosolanacearum* no estado de Pernambuco

35

36 **Palavras-chave:** Murcha bacteriana, genética populacional, epidemiologia molecular,  
37 variabilidade, diversidade.

38

### 39 **Abstract**

40 The aim of this work was determinate the genetic structure of the populations of *R.*  
41 *pseudosolanacearum* coming from Solanaceae in Pernambuco, Northeast region, Brazil,  
42 according to different mesoregions (Mata, Agreste, and Sertão) and hosts of the strains  
43 (tomato, pepper, and eggplant). This study was carried out with 105 strains based in  
44 BOX-PCR data. In the subpopulations of different mesoregions were established 37  
45 haplotypes. High rate of abundance and genotypic diversities have been found. When  
46 compared with the other subpopulations, that from the mesoregion Sertão presented the  
47 lower proportion of clones and the biggest values of genic and genotypic diversity, and  
48 genotypic wealth. The subpopulations are in imbalance, without recombination among  
49 them. A significant variation among the populations from the different regions was  
50 seen, even though the variation inside the subpopulation has been greater. The genetic  
51 differentiation indices indicated that the subpopulation from the Sertão presents  
52 significant differentiation in relation to the populations of Agreste and Mata, where the  
53 last do not differentiated between them. The occurrence of gene flow among the  
54 subpopulations assessed were detected by the number of migrants and shared  
55 haplotypes, being significantly smaller among the subpopulation of the Sertão and other  
56 mesoregions. Association between genetic and geographic distances were perceived.  
57 The differentiation of the subpopulation of the Sertão in relation to the Agreste and  
58 Mata mesoregions been proven in the discriminant analysis of the main components and  
59 in the network of haplotypes. No arrangement was detected in the analysis according to  
60 the host of origin. This work allowed a better comprehension about the genetic structure  
61 of populations of *R. pseudosolanacearum* in the Pernambuco state.

62

63 **Keywords:** bacterial wilt, Solanaceae, population genetics, variability, diversity.

64

### 65 **Introdução**

66

67 A murcha bacteriana destaca-se como uma das principais doenças das  
68 solanáceas em todo mundo, sendo capaz de provocar prejuízos significativos em  
69 culturas de alto valor econômico, como tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pimentão  
70 (*Capsicum annuum* L.) e berinjela (*Solanum melongena* L.) (Lopes et al. 2015; Garcia  
71 et al. 2013; Mariano et al. 1989). O uso estratégico de cultivares resistentes constitui  
72 uma forma viável para o manejo da doença, no entanto, depende de informações sobre a  
73 estrutura e variabilidade genética da população do patógeno (Santiago, 2014).

74 A doença é casada por espécies do complexo *Ralstonia solanacearum* (Smith)  
75 Yabuuchi et al. que inclui *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* Safni et al. e *R.*  
76 *syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov. Safni et al. (Safni et al. 2014), sendo que no  
77 Brasil foram relatadas apenas as duas primeiras espécies (Santiago et al. 2016). Em  
78 Pernambuco há prevalência da espécie *R. pseudosolanacearum*, representando cerca de  
79 92,5% dos isolados de *Ralstonia* spp. encontrados nas mesorregiões Agreste e Mata  
80 (Silva, 2014).

81 A sobreposição geográfica de *R. pseudosolanacearum* em relação a outras  
82 espécies do complexo indica que esta linhagem apresenta algumas características  
83 genéticas específicas que impulsionam sua distribuição, relacionadas não apenas à  
84 capacidade de disseminação, mas também à aptidão ecológica para se estabelecer em  
85 novos ambientes (Wicker et al. 2012). A alta capacidade de recombinação de *R.*  
86 *pseudosolanacearum* (Coupat et al. 2008), juntamente com seu padrão de  
87 disseminação, sua ampla gama de hospedeiros e plasticidade de agressividade  
88 (Wicker et al. 2012), indicam que a espécie possui maior potencial evolutivo  
89 (McDonald e Linde, 2002).

90 A diversidade de espécies de *Ralstonia* spp. em Pernambuco vem sendo  
91 investigada nos últimos anos. Trabalhos anteriores caracterizaram a distribuição de  
92 diferentes grupos de isolados, classificando-os ao nível de espécie/filotipo, sequevar e  
93 biovar e/ou biótipo (Albuquerque, 2017; Garcia et al. 2013; Silva, 2014), tornando  
94 possível observar a distribuição das espécies do complexo *R. solanacearum* ao longo do  
95 território pernambucano. Entretanto, tais estudos não determinaram a quantidade e  
96 distribuição da variação existente entre e dentro das populações do patógeno.

97 Estrutura genética da população de um patógeno refere-se à quantidade e  
98 distribuição da variação genética nos indivíduos, entre os indivíduos e entre populações.

99 Essa variação é determinada pela história evolutiva dessa população, resultante da  
100 atuação combinada das forças evolutivas de seleção, mutação, deriva, fluxo gênico e  
101 recombinação (McDonald e Linde, 2002).

102 O conhecimento da estrutura populacional de patógenos é um passo crucial  
103 para a previsão de sua diversidade genética, da origem de uma epidemia, da  
104 disseminação de linhagens clonais, do surgimento ou do ressurgimento de novas  
105 populações, da eficácia das medidas de controle (Hallin et al. 2012 ) e da adequação  
106 dos protocolos de detecção do fluxo de fitopatógenos (Ferrante e Scortichini, 2015 ).

107 No Brasil a estrutura de população de *R. solanacearum* foi avaliada por Santiago  
108 (2014), que neste estudo considerou todos os isolados do complexo *R. solanacearum*,  
109 em uma mesma população e, além disso, foram utilizados poucos isolados da região  
110 Nordeste do Brasil, restritos a tomate, batata (*Solanum tuberosum* L.) e eucalipto, não  
111 considerando a ampla distribuição e variabilidade dos isolados de *R.*  
112 *pseudosolanacearum* existentes na região.

113 Compreender a estrutura genética da população de *R. pseudosolanacearum* é  
114 epidemiologicamente importante e apresenta implicações diretas no manejo da doença.  
115 Este trabalho teve como objetivo determinar a estrutura genética de populações de *R.*  
116 *pseudosolanacearum* oriundas de solanáceas no estado de Pernambuco (Nordeste,  
117 Brasil) de acordo com as diferentes mesorregiões e hospedeiros de origem dos isolados.

118

## 119 **Material e Métodos**

120

### 121 Seleção de isolados

122

123 Para análise de estrutura da população de *Ralstonia pseudosolanacearum*  
124 (filotipo I) foram utilizados 105 isolados coletados nas principais áreas produtoras de  
125 solanáceas do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, situadas nas mesorregiões da  
126 Mata, Agreste e Sertão (Fig. 1), oriundos de solanáceas (tomate, berinjela, pimentão e  
127 jiló) (Tabela 1). Os isolados utilizados neste estudo foram previamente identificados e  
128 caracterizados filogeneticamente quanto a espécie/filotipo e sequevares (Albuquerque  
129 2017; Silva 2014) e estão depositados na Coleção de Culturas Rosa Mariano do  
130 Laboratório de Fitobacteriologia, do Departamento de Agronomia da UFRPE.

131 Para separação das subpopulações de acordo com regiões geográficas, as



132 mesorregiões de origem dos isolados foram utilizadas como critério, considerando as  
133 diferenças ambientais, de clima e disponibilidade hídrica características destas regiões.  
134 Conforme dados da Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC 2017), a  
135 mesorregião Mata caracteriza-se por apresentar umidade variando de 30 a 100% com  
136 níveis de precipitação podendo ultrapassar 2500 mm e temperaturas de 15° a 36°C. Na  
137 mesorregião Agreste a umidade varia entre 10 e 100% e precipitação de 300 a 1200 mm  
138 com temperaturas mais amenas, variando de 15° a 32°C. Na mesorregião Sertão a  
139 umidade varia entre 5 e 90% a precipitação entre 400 e 800mm e a temperatura entre  
140 15° e 41°C.

141

#### 142 Extração de DNA

143

144 A extração de DNA genômico dos isolados bacterianos foi realizada através do  
145 kit de extração HiPurA™ (Hi Media Laboratories, Mumbai, Índia), de acordo com as  
146 instruções fornecidas pelo fabricante. A quantificação do DNA genômico foi  
147 determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (BioChrome WPA, Biowave  
148 DNA Spectrophotometer, Harvard, USA). Para verificação da integridade das amostras,  
149 uma mistura contendo 4 µl de DNA concentrado, adicionado de 2 µl do tampão 6X  
150 DNA LoadingDye (Fermentas Life Sciences, Canadá) e 1,5 µl de SYBER® Safe DNA  
151 Gel Stain (10X) (Life Technologies, Brasil) foi submetida a eletroforese (80V) em gel  
152 de agarose a 1% por 1,5 h, em seguida, o gel foi visualizado através de  
153 fotodocumentador (Analítica, Brasil). Após este procedimento as amostras foram  
154 armazenadas a -20 °C.

155

#### 156 Genotipagem com BOX-PCR

157

158 As reações de BOX-PCR foram compostas por uma mistura contendo 2X PCR  
159 Master Mix, 2 µM do *primer* e 200 ng de DNA. Foi utilizado o *primer* BOXAIR (5'-  
160 CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Louws et al. 1994). As condições de  
161 amplificação consistiram de uma desnaturação inicial de 95 °C por 7 min; seguida por  
162 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min, 53 °C por 1 min e 65 °C por 8 min, e  
163 uma extensão final a 65 °C por 15 min. De cada amostra, 10 µL foram corados com  
164 Syber Gold, submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 3 h e visualizados

165 em fotodocumentador. Foi construída uma matriz binária, onde cada banda foi marcada  
166 como presente (1) ou ausente (0) para cada isolado.

167

168 Análise da estrutura genética

169

170 A variabilidade e estrutura genética da população para diferentes mesorregiões e  
171 hospedeiros foi inferida através de vários parâmetros que indicam a diversidade  
172 genotípica natural, tais como, diversidade genotípica ( $G$ ), calculada conforme o índice  
173  $G$  de Stoddart e Taylor (1998) para cada local de amostragem, com *bootstrap* de 1000  
174 repetições; diversidade gênica ( $H_e$ ) calculada pelo índice de Shannon-Wiener (1949);  
175 fração clonal estimada pela fórmula  $(N-G)/G$ , em que  $N$  é o tamanho da amostra e  $G$  o  
176 número de genótipos (Zhan et al. 2002); riqueza genotípica  $E(g_n)$  utilizando curvas de  
177 rarefação (Grünwald et al. 2003); equitabilidade genotípica ( $E_5$ ), a qual mede como os  
178 genótipos estão distribuídos na amostra (Ludwig e Reynolds 1988; Grünwald et al.  
179 2003); número de haplótipos e índice de diversidade de Simpson ( $\lambda$ ) (He e Hu  
180 2005).

181 Para analisar o desequilíbrio de ligação em todas as subpopulações foi calculado  
182 o índice de associação ( $I_A$ ) (Smith et al. 1993) e o índice alternativo  $r_{barD}$  ( $r_d$ ), que é  
183 menos sensível à variação do número de locos (Agapow e Burt 2001). Também foi  
184 realizada a construção de redes de haplótipos e a análise de discriminante de  
185 componentes principais (DAPC) (Jombart et al. 2010). A dependência entre distância  
186 genética e geográfica das subpopulações de *R. pseudosolanacearum* foi analisada  
187 usando o teste de Mantel Parcial (Smouse et al. 1986).

188 As análises de populações supracitadas foram executadas no programa R versão  
189 2.15.0 (R Development Core Team 2011). Além disso, também foram analisadas a  
190 diferenciação genética par a par entre populações pelo índice  $F_{ST}$  (Wright 1931) e a  
191 análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o software Arlequin versão 3.5.2.2  
192 (Excoffier et al. 2005).

193

## 194 **Resultados**

195

196 Nos perfis genômicos dos 105 isolados de *R. pseudosolanacearum* utilizando  
197 BOX-PCR foram detectados 18 loci, variando de 200 a 3500 bp. Os índices de

198 diversidade genética para as subpopulações de diferentes mesorregiões de Pernambuco  
199 estão apresentados na Tabela 2. Foram formados 47 haplótipos, distribuídos entre as  
200 subpopulações da Mata (17), Agreste (13) e Sertão (17). A fração clonal entre essas  
201 subpopulações foi de 60, 53, 29%, respectivamente. Maior riqueza genotípica foi  
202 estimada para mesorregião Sertão ( $E(g_{24}) = 17$ ). Níveis elevados de diversidade  
203 genotípica ( $G$ ) foram detectados nas populações, variando de 5,87 a 13,09. A menor  
204 diversidade genotípica foi detectada na mesorregião Agreste e a maior no Sertão. O  
205 índice de equitabilidade genotípica ( $E_5$ ) variou de 0,86 (Sertão) a 0,68 (Agreste). Foram  
206 observados altos valores de diversidade gênica ( $H_E$ ) para as populações do Agreste ( $H_E$   
207  $= 2,10$ ), Mata ( $H_E = 2,45$ ) e Sertão ( $H_E = 2,72$ ).

208 O índice de Associação  $I_A$  e o índice alternativo  $r_{bD}$  ( $r_d$ ) para todas as  
209 mesorregiões avaliadas foram significativamente diferentes de 0 ( $P < 0,0001$ ) (Tabela  
210 2). Sendo assim, não há evidências de recombinação na população de *R.*  
211 *pseudosolanacearum*.

212 A partir da rede de haplótipos constatou-se alta frequência de haplótipos  
213 compartilhados apenas entre as subpopulações do Agreste e Mata (Figura 2a). Foram  
214 encontrados quatro haplótipos compartilhados entre subpopulações dessas mesorregiões  
215 (MLG23, MLG17, MLG35 e MLG25) e um haplótipo compartilhado entre  
216 subpopulações da Mata e Sertão (MLG33). Apenas dois haplótipos estiveram presentes  
217 em todas as subpopulações estudadas (MLG18 e MLG24), estando em baixa frequência  
218 na subpopulação do Sertão. Os haplótipos da subpopulação Sertão foram na sua maioria  
219 (76,47%) exclusivamente dessa mesorregião. Haplótipos unitários foram encontrados  
220 nas subpopulações das três mesorregiões: Mata (10 haplótipos), Agreste (7 haplótipos) e  
221 Sertão (13 haplótipos).

222 Os resultados da AMOVA para *R. pseudosolanacearum* de diferentes  
223 mesorregiões de Pernambuco revelaram a ocorrência de uma variação considerável  
224 entre subpopulações (33,51%), ainda que a variação dentro das subpopulações tenha  
225 sido maior (66,49%) (Tabela 3), indicando que a população está estruturada de acordo  
226 com a região geográfica.

227 Análise de DAPC (Figura 3a) ilustrou a presença de grupos diferenciais com  
228 nítida separação da subpopulação do Sertão em relação às demais, confirmando a  
229 estruturação anteriormente observada na rede de haplótipos.

230 A diferenciação genética da subpopulação do Sertão foi de 0,49 e 0,40, em  
231 relação às subpopulações do Agreste e Mata, respectivamente. Não foi constatada  
232 diferenciação genética significativa entre as subpopulações do Agreste e Mata (Tabela  
233 4). A ocorrência de fluxo gênico entre as subpopulações avaliadas foi verificada pelo  
234 número de migrantes ( $N_m$ ) e haplótipos compartilhados, sendo consideravelmente  
235 menores entre a subpopulação do Sertão e das demais mesorregiões.  
236 O teste de Mantel indicou associação entre distância genética e geográfica ( $r = 0,39$ ;  $P =$   
237  $0,0001$ ) (Fig. 4).

238 Os índices de diversidade genética para subpopulações de *R.*  
239 *pseudosolanacearum* de diferentes hospedeiros estão apresentados na Tabela 5. Para  
240 melhor balanceamento dos dados entre as subpopulações de hospedeiros, considerando  
241 a estruturação da subpopulação do Sertão em relação a população das demais  
242 mesorregiões de Pernambuco, foram selecionados 72 isolados oriundos das  
243 mesorregiões Agreste e Mata para realização das análises de BOX-PCR. Foram  
244 observados 24, 30 e 18 haplótipos nas subpopulações de tomate, berinjela e pimentão,  
245 respectivamente. Uma vez que havia um número limitado de isolados de jiló, a  
246 diversidade genotípica para subpopulação desse hospedeiro não foi estimada. Os valores  
247 do índice de Simpson variaram de 0,82 para a subpopulação de berinjela a 0,87 na  
248 subpopulação de pimentão. O maior valor de diversidade genotípica foi determinado  
249 para subpopulação de pimentão ( $G = 7,71$ ). O índice de equitabilidade genotípica ( $E_5$ )  
250 variou de 0,77 a 0,92, sendo maior na subpopulação de pimentão. A fração de clones  
251 nas subpopulações foi de 41% em tomate, 36% em berinjela e 50% em pimentão. O  
252 índice de Associação  $I_A$  e o índice alternativo  $r_{bD}$  ( $r_d$ ) foram determinados para a  
253 população total e indicaram que a população não está em equilíbrio de ligação.

254 Dos haplótipos identificados, apenas cinco (MLG7, MLG8, MLG11, MLG16,  
255 MLG12) (Fig. 2b) são compartilhados entre todas as subpopulações avaliadas, contudo,  
256 tais haplótipos aparecem em maior frequência na população, representando 69,44% dos  
257 isolados avaliados. Na análise DAPC (Fig. 3b) não foi observado grupos geneticamente  
258 estruturados.

259 A maior variação foi observada dentro das subpopulações de *R.*  
260 *pseudosolanacearum* de diferentes hospedeiros (95,80%) e não entre subpopulações  
261 (4,20%) (Tabela 6), indicando ausência de estruturação das populações de acordo com

262 os hospedeiros de origem. Não foi constatada diferenciação genética entre as  
263 subpopulações avaliadas por meio do índice  $F_{ST}$ .

264

## 265 **Discussão**

266

267 Este trabalho se constitui como o primeiro estudo de estrutura de populações de  
268 *R. pseudosolanacearum* (filotipo I) realizado no estado de Pernambuco e no Brasil. Os  
269 isolados utilizados nesta pesquisa foram obtidos das principais espécies de solanáceas  
270 cultivadas nas mesorregiões Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco, onde a murcha  
271 bacteriana é uma importante doença limitando a produção em algumas áreas (Silva  
272 2014).

273 A ampla distribuição de *R. pseudosolanacearum* no estado de Pernambuco é  
274 justificável, uma vez que os isolados desta espécie são bioquimicamente versáteis,  
275 utilizando ampla gama de compostos orgânicos (Hayward 1994; Silva 2014); possuem  
276 habilidade de infectar múltiplos hospedeiros (Hayward 1994; Wicker et al. 2012); e têm  
277 capacidade de induzir infecções latentes em material vegetal (Wicker et al. 2012).  
278 Tais fatores têm favorecido a colonização e estabelecimento da bactéria em diversos  
279 ambientes.

280 Os perfis de BOX-PCR registraram a ocorrência de 38 haplótipos de *R.*  
281 *pseudosolanacearum*, sendo 14 haplotipos na sequevar I-17, 14 haplótipos na sequevar  
282 I-18 e 10 haplotipos em isolados de *R. pseudosolanacearum* cuja sequevar ainda não  
283 foram determinados, revelando alto grau de variabilidade em todas as mesorregiões  
284 avaliadas. A riqueza e a diversidade genotípica observadas foram consideradas altas  
285 para todas as subpopulações. Em contraste, a diversidade de *R. pseudosolanacearum* é  
286 caracterizada em termos quantitativos de sequevares como relativamente baixa no  
287 Brasil, sendo considerada a existência de 15 haplótipos entre os isolados da espécie,  
288 todos atribuídos a sequevar I-18 (Santiago et al. 2016). Trabalhos de diversidade de  
289 *Ralstonia* spp. em Pernambuco registraram a existência de apenas um haplótipos (gene  
290 *egl*) nas sequevares I-17 e I-18 (Albuquerque, 2017; Silva, 2014). Os índices de  
291 diversidade genética refletiram a variabilidade das populações de *R.*  
292 *pseudosolanacearum* nas diferentes mesorregiões de Pernambuco. Quando comparada  
293 com as demais subpopulações, a da mesorregião Sertão caracterizou-se por apresentar  
294 menor proporção de clones. Seguindo esta tendência, a população do Sertão apresentou

295 valores mais altos de diversidade gênica, genotípica e riqueza genotípica. A  
296 compreensão da diversidade genética, tanto continental quanto regional, particionada  
297 em estruturas genéticas distintas auxilia na determinação dos fatores bióticos ou  
298 abióticos que afetam a evolução das populações do fitopatógeno (Lin et al. 2014).

299 Isolados de *R. pseudosolanacearum* do filotipo I apresentam alta capacidade de  
300 recombinação gênica (Coupat et al. 2008). Entretanto, as estimativas de desequilíbrio de  
301 ligação obtidas para todas as subpopulações de *R. pseudosolanacearum* do estado de  
302 Pernambuco indicam que a recombinação entre as subpopulações tem sido  
303 relativamente rara e que as populações estão em desequilíbrio de ligação. A  
304 recombinação em bactérias não é um processo obrigatório e os mecanismos de  
305 recombinação estão sujeitos a muitos fatores biológicos e ecológicos que podem variar  
306 mesmo em diferentes populações da mesma espécie (Tang et al. 2009). A frequência de  
307 eventos de recombinação é também determinada pela disponibilidade e eficiência dos  
308 mecanismos de troca genética, incluindo a transformação, transdução e conjugação (Feil  
309 e Spratt 2001).

310 A ausência de recombinação nas populações de *R. pseudosolanacearum* em  
311 Pernambuco indica que este não é o principal mecanismo responsável por gerar  
312 variabilidade na espécie. Santiago (2014) afirmou que além da recombinação, os  
313 mecanismos de mutação e fluxo gênico parecem ser os principais mecanismos  
314 evolucionários que contribuem para moldar a população de *Ralstonia* spp., sendo a  
315 mutação o principal fator gerador de variabilidade dessas fitobactérias no Brasil.

316 A conjunção de alta diversidade genética e ausência de recombinação  
317 encontrada no presente estudo sugere que a estrutura genética desta bactéria em  
318 Pernambuco não está em concordância com o modelo epidêmico proposto por Maynard  
319 Smith et al. (1993), onde o cruzamento aleatório fornece variabilidade genética, mas  
320 múltiplos ciclos assexuados levam a desequilíbrios de ligação e uma tendência à  
321 clonalidade.

322 A variação foi maior dentro das subpopulações de *R. pseudosolanacearum* de  
323 cada mesorregião, entretanto, o elevado nível de variação entre subpopulações serve de  
324 indicativo para a estruturação entre elas. Os resultados dos índices de diferenciação  
325 genética entre populações ( $F_{ST}$ ) confirmaram que a população de *R.*  
326 *pseudosolanacearum* está estruturada de acordo com a região geográfica, sendo que a

327 subpopulação do Sertão apresenta significativa diferenciação genética em relação a  
328 subpopulações do Agreste e Mata e que as duas últimas não diferem entre si. Esta  
329 diferenciação pode ser justificada pelas características ambientais, as quais são bem  
330 distintas na mesorregião Sertão, como já mostrado.

331 A ocorrência de migração foi detectada entre as subpopulações e indica a  
332 disseminação da bactéria entre as mesorregiões avaliadas. A disseminação de *R.*  
333 *pseudosolanacearum* pode ocorrer a longa distância, principalmente a partir de material  
334 vegetal infectado (Hayward 1991), inclusive com infecção latente (Wicker et al. 2012).  
335 É de conhecimento que tomaticultores das mesorregiões da Mata e Agreste se deslocam  
336 durante a estação de estiagem para áreas de cultivo irrigado na mesorregião Sertão,  
337 levando mudas, utensílios e materiais de irrigação com solo aderido, representando a  
338 introdução de novos haplótipos na mesma. Entretanto, o número de migrantes é menor  
339 entre o Sertão e as demais mesorregiões (0,27 e 0,36) permitindo a divergência entre as  
340 populações, pois o fluxo gênico entre as mesmas é insuficiente para contrapor os efeitos  
341 da deriva. Tal fato se deve muito possivelmente a dificuldade de migrantes oriundos das  
342 mesorregiões Mata e Agreste se estabelecerem no Sertão. Dependendo de sua  
343 capacidade adaptativa, um organismo pode apresentar maior ou menor chance de  
344 sobreviver e se reproduzir, assim ocorre a seleção dos que sobrevivem e,  
345 consequentemente produzem descendentes (Milgroom 2015).

346 A ausência de diferenciação genética entre as subpopulações do Agreste e Mata  
347 está relacionada a ocorrência de alto fluxo gênico e pode ser explicada, entre outros  
348 fatores, pela proximidade entre as duas mesorregiões. Estudo de estrutura de população  
349 de isolados do complexo *R. solanacearum* realizado em diferentes regiões da ilha de  
350 Trinidad, Trinidad e Tobago, mostrou que a proximidade entre as regiões foi  
351 responsável pela não estruturação da população, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico,  
352 seja por meio de redes de irrigação ou pelo movimento de pessoas, equipamentos e  
353 materiais vegetais (Ramsubhag et al. 2012).

354 No presente estudo, foi observada associação entre distância genética e  
355 geográfica. A distância geográfica tem sido apontada como determinante para o  
356 aumento da diferenciação genética, uma vez que pode influenciar na variação e na  
357 estrutura genética da população devido à redução no fluxo gênico (Liu et al. 2009;  
358 Norman et al. 2009; Toukam et al. 2009). A diminuição da semelhança entre membros

359 de uma comunidade com o aumento da distância geográfica é um padrão biogeográfico  
360 universal, observado para todos os domínios da vida, principalmente em organismos  
361 com dispersão limitada (Martiny et al. 2011) como bactérias habitantes do solo. A  
362 estruturação da subpopulação do Sertão em relação às das mesorregiões da Agreste e  
363 Mata foi observada na comparação par a par de populações ( $F_{ST}$ ) e nas análises DAPC e  
364 rede de haplótipos. Além do já discutido, também teorizamos que a ocorrência de  
365 diferentes eventos de introdução possa ter interferido na estruturação das subpopulações  
366 de *R. pseudosolanacearum* em Pernambuco.

367 Considerando o tomateiro como um dos principais hospedeiros de *Ralstonia*  
368 spp., sendo extensivamente produzido no estado de Pernambuco, é natural que o  
369 histórico de introdução da bactéria confunda-se com a evolução da tomaticultura  
370 pernambucana. O primeiro grande ciclo produtivo de tomate no Estado teve início na  
371 mesorregião Agreste no ano de 1914 e se consolidou durante a primeira metade do  
372 século. O início do cultivo e industrialização de tomate em Pernambuco ocorreu na  
373 cidade de Pesqueira (mesorregião Agreste) (Camargo et al. 2006; Silva Junior et al.  
374 2015). A tomaticultura no Agreste se intensificou após os anos vinte, mas começou a  
375 decair na década de 1950, levando ao fechamento das principais indústrias de  
376 processamento na região. O segundo ciclo produtivo de tomate em Pernambuco teve  
377 início apenas em meados da década de 1970, desta vez na mesorregião Sertão, no Vale  
378 do São Francisco e em Perímetros Irrigados do Departamento Nacional de Obras Contra  
379 as Secas (Dnocs) (Melo 2014; Oliveira et al. 1998; Silva Junior et al. 2015). Acredita-se  
380 que a introdução de *R. pseudosolanacearum* no Brasil possa ter ocorrido durante o  
381 período da imigração asiática e o estabelecimento de colônias japonesas no país,  
382 inclusive em Pernambuco, através de mudas infectadas ou solos infestados (Garcia et al.  
383 2013). Este período coincide com o início da tomaticultura no Agreste de Pernambuco,  
384 onde a bactéria foi introduzida inicialmente e se estabeleceu ao encontrar condições  
385 propícias. Os isolados obtidos no Sertão desenvolveram-se, provavelmente, a partir de  
386 um segundo evento de introdução e a população formada foi moldada por características  
387 ambientais mais extremas que as da mesorregião Agreste.

388 Uma vez reconhecida a diferenciação entre subpopulações de *R.*  
389 *pseudosolanacearum* do Sertão de Pernambuco em comparação as subpopulações da  
390 Mata e Agreste, fez-se necessário a investigação acerca da influência do hospedeiro de



391 origem na diferenciação das populações da bactéria. O estudo de estrutura da população  
392 foi realizado com isolados de diferentes hospedeiros das mesorregiões do Agreste e  
393 Mata (pimentão, tomate e berinjela), a fim de investigar se a oferta deste hospedeiro é  
394 determinante para o desenvolvimento da variabilidade do patógeno e se exerce  
395 influência na quantidade e distribuição da variação existente entre e dentro das  
396 subpopulações de *R. pseudosolanacearum*.

397 Os índices de diversidade genética de acordo com hospedeiro de origem  
398 descreveram a variabilidade dos isolados com valores muito aproximados, diferente do  
399 que foi observado por Santiago (2014), em que o índice de diversidade genotípica na  
400 subpopulação de tomate foi pelo menos 5 vezes maior do que nas subpopulações de  
401 berinjela e pimentão. Neste mesmo trabalho a subpopulação de tomate apresentou a  
402 maior riqueza genotípica enquanto a de pimentão teve a mais baixa.

403 O baixo nível de variação existente entre as subpopulações avaliadas e a  
404 ausência de diferenciação genética entre as subpopulações indicaram de forma clara a  
405 ausência de estruturação entre subpopulações de *R. pseudosolanacearum* de acordo com  
406 o hospedeiro de origem. Este resultado foi confirmado nas análises DAPC e na rede de  
407 haplótipos, ilustrando a ausência de diferenciação entre subpopulações com a presença  
408 significativa de haplótipos compartilhados.

409 Na região amazônica, também não foi encontrada correlação entre os grupos  
410 genéticos de isolados de *R. solanacearum* formados com os hospedeiros de origem e  
411 origem geográfica (Coelho Netto et al. 2003). Por outro lado, em um estudo de estrutura  
412 de população realizado com isolados de diferentes regiões do Brasil, a população foi  
413 moderadamente estruturada de acordo com o hospedeiro e região geográfica, sendo  
414 constatada diferenciação genética apenas entre isolados de tomate e batata, não sendo  
415 constatada diferenciação significativa entre as demais subpopulações de hospedeiros  
416 (Santiago 2014).

417 A ausência de relação entre grupos genéticos do patógeno e seu hospedeiro de  
418 origem, conforme aqui relatados e os apresentados em pesquisas anteriores (Coelho  
419 Netto et al. 2003; Santiago 2014) demonstra a fraca influência do hospedeiro na  
420 diferenciação da população do patógeno, principalmente ao considerar *R.*  
421 *pseudosolanacearum* como uma bactéria altamente agressiva e com ampla gama de  
422 hospedeiros (Lebeau et al. 2011; Wicker et al. 2012).

423 Os resultados obtidos demonstraram que a população de *R. pseudosolanacearum*  
 424 em Pernambuco não está estruturada de acordo com o hospedeiro de origem, mas  
 425 apresenta significativa diferenciação de acordo com a região geográfica, sendo a  
 426 subpopulação da mesorregião Sertão estruturada em relação as subpopulações da Mata e  
 427 Agreste. Esta pesquisa permitiu uma melhor compreensão da estrutura da população de  
 428 *R. pseudosolanacearum* em Pernambuco e sobre os fatores que promovem a adaptação  
 429 ao hospedeiro e a dinâmica pela qual ele evolui. Esse conhecimento contribuirá na  
 430 obtenção de estratégias eficientes para o manejo da murcha bacteriana.

431

### 432 **Literatura citada**

433

- 434 Agapow, P. M., & Burt, A. (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium.  
 435 *Molecular Ecology Resources*, 1(1-2), 101-102.
- 436 Albuquerque, G. M. R. (2017). Diversidade de *Ralstonia* spp. em Pernambuco, seleção  
 437 de acessos silvestres e caracterização genética da resistência. Tese (Doutorado em  
 438 Fitopatologia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.
- 439 APAC - Agência Pernambucana de Águas e Climas. (2017). Sistema de Geoinformação  
 440 Hidrometeorológico de Pernambuco. Consulta online. <http://www.apac.pe.gov.br>.  
 441 Acesso em 7 de janeiro, 2017.
- 442 Camargo, F. P., Alves, H. S., de Camargo Filho, W. P., & Vilela, N. J. (2006) Cadeia  
 443 produtiva de tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional  
 444 e perspectivas. *Informações econômicas*, 36(11), 7-20.
- 445 Coelho Netto, R. A., Noda, H., Boher, B., & Araújo, B. G. P. (2003). Caracterização de  
 446 isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme,  
 447 no Estado do Amazonas. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 362-366.
- 448 Coupat, B., Chaumeille-Dole, F., Fall, S., Prior, P., Simonet, P., & Nesme, X. (2008).  
 449 Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and  
 450 size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiology Ecology*, 66, 14-24.
- 451 Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated  
 452 software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics*  
 453 *online*, 1, 47-50.
- 454 Feil, E. J. & Spratt, B. G. (2001). Recombination and the population structures of  
 455 bacterial pathogens. *Annual Reviews of Microbiology*. 55, 561-590.
- 456 Ferrante, P., & Scortichini, M. (2015). Redefining the global populations of  
 457 *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae based on pathogenic, molecular and phenotypic  
 458 characteristics. *Plant Pathology*, 64(1), 51-62.
- 459 Garcia, A. L., Lima, W. G., Souza, E. B., Michereff, S. J., & Mariano, R. L. R. (2013).  
 460 Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt in bell pepper in the  
 461 state of Pernambuco, Brazil. *Bari: Journal of plant pathology*, 95(2), 237-245.
- 462 Grünwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G., & Fry, W. E. (2003). Analysis of  
 463 genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology*, 93(6),  
 464 738-746.
- 465 Hallin, M., Deplano, A., & Struelens, M. J. (2012). *Molecular typing of bacterial*  
 466 *pathogens: a tool for the epidemiological study and control of infectious diseases*. In S.

- 467 Morand, F. Beaudou & J. Cabaret (Eds.). *New frontiers of molecular epidemiology of*  
468 *infectious diseases* (pp. 9-25). Netherlands: Springer Science & Business media.
- 469 Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by  
470 *Pseudomonas solanacearum*. *Annual review of phytopathology*, 29(1), 65-87.
- 471 Hayward, A. C. (1994). The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In A. C. Hayward &  
472 G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas*  
473 *solanacearum* (pp. 9-24). Wallingford: CAB International.
- 474 He, F., & Hu, X. S. (2005). Hubbell's fundamental biodiversity parameter and the  
475 Simpson diversity index. *Ecology Letters*, 8(4), 386-390.
- 476 Jombart, T. (2010). ADEGENET: A R package for the multivariate analysis of genetic  
477 markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405.
- 478 Lebeau A, Daunay M-C, Frary A, Palloix P, Wang J-F, Dintinger J et al.  
479 (2011). Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources  
480 respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species  
481 complex. *Phytopathology*, 101: 154–165.
- 482 Lin, C. H., Tsai, K. C., Prior, P., & Wang, J. F. (2014). Phylogenetic relationships and  
483 population structure of *Ralstonia solanacearum* isolated from diverse origins in  
484 Taiwan. *Plant pathology*, 63(6), 1395-1403.
- 485 Liu, Y., Kanda, A., Yano, K., Kiba, A., Hikichi, Y., Aino, M., Kawaguchi, A.;  
486 Mizoguchi, S.; Nakaho, K.; Shiomi, H.; Takikawa, Y. & Ohnishi, K. (2009). Molecular  
487 typing of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum* in relation to the ability to induce  
488 a hypersensitive reaction in tobacco. *Journal of general plant pathology*, 75(5), 369-  
489 380.
- 490 Lopes, C. A., Boiteux, L. S., & Eschemback, V. (2015). Eficácia relativa de porta-  
491 enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. Brasília:  
492 *Horticultura Brasileira*, 33(1), 125-130.
- 493 Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., & De Bruijn, F. J. (1994). Specific  
494 genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars  
495 and strains generated with repetitive sequences and PCR. Washington: *Applied and*  
496 *environmental microbiology*, 60(7), 2286-2295.
- 497 Ludwig, J. A., & Reynolds, J. F. (1988). *Statistical ecology: a primer in methods and*  
498 *computing* (Vol. 1). New York: John Wiley & Sons, 1988. 85-103
- 499 Mariano, R. L. R., Melo, R. A. G., Holanda, V. T.; Cabral, G. B. & Silva, M. S. S. G.  
500 (1989). Levantamento das fitobacterioses do estado de Pernambuco no biênio 1987-  
501 1988. Brasília: *Fitopatologia Brasileira*, 14(2), 158.
- 502 Martiny, J. B., Eisen, J. A., Penn, K., Allison, S. D., & Horner-Devine, M. C. (2011).  
503 Drivers of bacterial  $\beta$ -diversity depend on spatial scale. *Proceedings of the National*  
504 *Academy of Sciences*, 108(19), 7850-7854.
- 505 Maynard Smith J., Smith N.H., O'rourke M., & Spratt B.G. (1993). How clonal are  
506 bacteria?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(10), 4384-4388.
- 507 McDonald, B. A., & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary  
508 potential, and durable resistance. Palo alto: *Annual review of phytopathology*, 40(1),  
509 349-379.
- 510 Melo, P. C. T. (2014). Agroindústria de tomate no Brasil: 100 anos de história e  
511 evolução. Documento online. 7. Congresso Brasileiro de tomaticultura industrial.  
512 [http://www.congressotomate.com.br/2011/palestras/Tomaticultura-industrial-no-](http://www.congressotomate.com.br/2011/palestras/Tomaticultura-industrial-no-cerrado-25-anos.pdf)  
513 [cerrado-25-anos.pdf](http://www.congressotomate.com.br/2011/palestras/Tomaticultura-industrial-no-cerrado-25-anos.pdf). Acesso em 9 de novembro, 2017.
- 514 Milgroom, M. G. (2015).: Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology,

- 515 and Evolution. *Plant disease*, 1(1), 1-399.
- 516 Norman, D. J., Zapata, M., Gabriel, D. W., Duan, Y. P., Yuen, J. M., Mangravita-Novo,  
517 A., & Donahoo, R. S. (2009). Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia*  
518 *solanacearum* strains entering North America. *Phytopathology*, 99(9), 1070-1077.
- 519 Oliveira, J.R.B., Lopes, G.M.B., Borba, E.R., Holanda, M.C. de. (1998). Estudo da  
520 Cadeia Produtiva do Tomate no Vale do São Francisco. In: A.M.G. de, Castro, S.M.V.,  
521 Lima, W.J., Goedert, A., & Freitas Filho, J.R.P., Vasconcelos (Eds.) *Cadeias*  
522 *Produtivas e Sistemas Naturais: Prospecção Tecnológica*. (pp. 511-525). Brasília:  
523 Embrapa-SPI/Embrapa-DPD.
- 524 Ramsubhag, A., Lawrence, D., Cassie, D., Fraser, R., Umaharan, P., Prior, P., &  
525 Wicker, E. (2012). Wide genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains affecting  
526 tomato in Trinidad, West Indies. *Plant pathology*, 61(5), 844-857.
- 527 Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., & Kappler, U. (2014).  
528 Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex:  
529 proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii*  
530 and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *Syzygii* subsp. nov.,  
531 *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp.  
532 nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*  
533 subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia*  
534 *pseudosolanacearum* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary*  
535 *microbiology*, 64(9), 3087-3103.
- 536 Santiago, T. R. A deep analysis of the genetic structure of *Ralstonia solanacearum* in  
537 Brazil reveals not much sex in the population. (2014), Tese (Doutorado em  
538 Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- 539 Santiago, T. R., Lopes, C. A., Caetano- Anollés, G., & Mizubuti, E. S. G. (2016).  
540 Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient  
541 centre of diversity of the pathogen. *Plant Pathology*, 66(3), 383-392.
- 542 Shannon, C., & Weaver, W. (1949). *The mathematical theory of communication*.  
543 Urbana: University of Illinois Press.
- 544 Silva Junior, A. R., Ribeiro, W. M., Nascimento, A. & Souza, C. B. (2015). Cultivo do  
545 Tomate Industrial no Estado de Goiás: Evolução das Áreas de Plantio e Produção.  
546 *Conjuntura Econômica Goiana*, 34, 97-109.
- 547 Silva, J. R. (2014). Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões  
548 Norte e Nordeste do Brasil. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade  
549 Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.
- 550 Smith, J. M., Smith, N. H., O'Rourke, M., & Spratt, B. G. (1993). How clonal are  
551 bacteria?. Washington: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(10), 4384-  
552 4388.
- 553 Smouse, P. E., Long, J. C., & Sokal, R. R. (1986). Multiple regression and correlation  
554 extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic zoology*, 35(4), 627-  
555 632.
- 556 Stoddart, J. A., & Taylor, J. F. (1988). Genotypic diversity: estimation and prediction in  
557 samples. Madison: *Genetics*, 118(4), 705-711.
- 558 Tang, J., Hanage, W. P., Fraser, C., & Corander, J. (2009). Identifying currents in the  
559 gene pool for bacterial populations using an integrative approach. *PLoS computational*  
560 *biology*, 5(8), 1-18.
- 561 Toukam, G. M. S., Cellier, G., Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C., Prior, P.  
562 (2009). Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. *Plant*

- 563 *disease*, 93(11), 1123-1130.
- 564 Wicker, E., Lefeuvre, P., De Cambiaire, J. C., Lemaire, C., Poussier, S., & Prior, P.  
565 (2012). Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant  
566 pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. England: *International Society*  
567 *for Microbial Ecology Journal*, 6(5), 961-974.
- 568 Wright, S. (1931). Statistical methods in biology. *Journal of the American Statistical*  
569 *Association*, 26(173A), 155-163.
- 570 Zhan, J., Mundt, C. C., Hoffer, M. E., & McDonald, B. A. (2002). Local adaptation and  
571 effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant  
572 pathosystem. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(4), 634-647.
- 573

574 **Tabela 1** Isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* do estado de Pernambuco, região  
 575 Nordeste do Brasil, utilizados no estudo

Isolado	Município	Mesorregião	Hospedeiro	Haplótipo	MLG <sup>a</sup>	MLG <sup>b</sup>
CRMRS30	Bezerros	Agreste	Pimentão	17	MLG17	MLG7
CRMRS36	Garanhuns	Agreste	Pimentão	17	MLG17	MLG7
CRMRS102	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	23	MLG23	MLG11
CRMRS108	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	23	MLG23	MLG11
CRMRS113	Gravatá	Agreste	Berinjela	23	MLG23	MLG11
CRMRS114	Gravatá	Agreste	Tomate	23	MLG23	MLG11
CRMRS115	Gravatá	Agreste	Tomate	23	MLG23	MLG11
CRMRS116	Gravatá	Agreste	Tomate	17	MLG17	MLG7
CRMRS117	Gravatá	Agreste	Tomate	17	MLG17	MLG7
CRMRS118	Gravatá	Agreste	Tomate	25	MLG25	MLG12
CRMRS119	Gravatá	Agreste	Tomate	7	MLG7	MLG3
CRMRS202	Gravatá	Agreste	Tomate	25	MLG25	MLG12
CRMRS205	Gravatá	Agreste	Tomate	25	MLG25	MLG12
CRMRS212	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	17	MLG17	MLG7
CRMRS213	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	9	MLG9	MLG9
CRMRS216	Camocim de S. Félix	Agreste	Berinjela	25	MLG25	MLG12
CRMRS217	Camocim de S. Félix	Agreste	Berinjela	25	MLG25	MLG12
CRMRS218	Camocim de S. Félix	Agreste	Berinjela	23	MLG23	MLG11
CRMRS219	Camocim de S. Félix	Agreste	Berinjela	23	MLG23	MLG11
CRMRS220	Camocim de S. Félix	Agreste	Berinjela	23	MLG23	MLG11
CRMRS221	Camocim de S. Félix	Agreste	Berinjela	32	MLG32	MLG14
CRMRS29	Bezerros	Agreste	Pimentão	27	MLG27	MLG20
CRMRS41	Caruaru	Agreste	Pimentão	25	MLG25	MLG12
CRMRS42	Caruaru	Agreste	Pimentão	32	MLG32	MLG14
CRMRS43	Caruaru	Agreste	Pimentão	23	MLG23	MLG11
CRMRS46	Sairé	Agreste	Pimentão	23	MLG23	MLG11
CRMRS47	Sairé	Agreste	Pimentão	25	MLG25	MLG12
CRMRS86	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	18	MLG18	MLG8
CRMRS87	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	20	MLG20	MLG1
CRMRS88	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	18	MLG18	MLG8
CRMRS89	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	25	MLG25	MLG12
CRMRS90	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	3	MLG3	MLG4
CRMRS91	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	24	MLG24	MLG13
CRMRS95	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	23	MLG23	MLG11
CRMRS96	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	7	MLG7	MLG3
CRMRS97	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	25	MLG25	MLG12
CRMRS98	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	35	MLG35	MLG16
CRMRS99	Camocim de S. Félix	Agreste	Tomate	2	MLG2	MLG2

CRMRs31	Chã Grande	Mata	Pimentão	37	MLG37	MLG18
CRMRs32	Chã Grande	Mata	Pimentão	37	MLG37	MLG18
CRMRs35	Chã Grande	Mata	Pimentão	21	MLG21	MLG10
CRMRs28	Chã Grande	Mata	Pimentão	37	MLG37	MLG18
CRMRs33	Chã Grande	Mata	Pimentão	25	MLG25	MLG12
CRMRs34	Chã Grande	Mata	Pimentão	38	MLG38	MLG19
CRMRs37	Chã Grande	Mata	Pimentão	35	MLG35	MLG16
CRMRs38	Chã Grande	Mata	Pimentão	35	MLG35	MLG16
CRMRs39	Chã Grande	Mata	Pimentão	38	MLG38	MLG19
CRMRs40	Chã Grande	Mata	Pimentão	35	MLG35	MLG16
CRMRs53	Chã Grande	Mata	Berinjela	37	MLG37	MLG18
CRMRs54	Chã Grande	Mata	Berinjela	18	MLG18	MLG8
CRMRs55	Chã Grande	Mata	Berinjela	8	MLG8	MLG15
CRMRs56	Chã Grande	Mata	Berinjela	25	MLG25	MLG12
CRMRs57	Chã Grande	Mata	Berinjela	18	MLG18	MLG8
CRMRs58	Chã Grande	Mata	Berinjela	18	MLG18	MLG8
CRMRs60	Chã Grande	Mata	Berinjela	29	MLG29	MLG6
CRMRs61	Chã Grande	Mata	Berinjela	18	MLG18	MLG8
CRMRs62	Chã Grande	Mata	Berinjela	35	MLG35	MLG16
CRMRs63	Chã Grande	Mata	Berinjela	18	MLG18	MLG8
CRMRs64	Chã Grande	Mata	Berinjela	17	MLG17	MLG7
CRMRs65	Chã Grande	Mata	Berinjela	35	MLG35	MLG16
CRMRs66	Chã Grande	Mata	Berinjela	25	MLG25	MLG12
CRMRs67	Chã Grande	Mata	Berinjela	25	MLG25	MLG12
CRMRs68	Chã Grande	Mata	Berinjela	25	MLG25	MLG12
CRMRs69	Chã Grande	Mata	Berinjela	17	MLG17	MLG7
CRMRs70	Chã Grande	Mata	Berinjela	17	MLG17	MLG7
CRMRs71	Chã Grande	Mata	Berinjela	17	MLG17	MLG7
CRMRs72	Chã Grande	Mata	Berinjela	25	MLG25	MLG12
CRMRs73	Chã Grande	Mata	Berinjela	23	MLG23	MLG11
CRMRs83	Chã Grande	Mata	Berinjela	12	MLG12	MLG5
CRMRs84	Chã Grande	Mata	Berinjela	33	MLG33	MLG17
CRMRs85	Chã Grande	Mata	Berinjela	35	MLG35	MLG16
CRMRs82	Chã Grande	Mata	Jiló	35	MLG35	ND
CRMRs75	Chã Grande	Mata	Jiló	36	MLG36	ND
CRMRs76	Chã Grande	Mata	Jiló	5	MLG5	ND
CRMRs74	Chã Grande	Mata	Jiló	18	MLG18	ND
CRMRs77	Chã Grande	Mata	Jiló	18	MLG18	ND
CRMRs79	Chã Grande	Mata	Jiló	18	MLG18	ND
CRMRs80	Chã Grande	Mata	Jiló	11	MLG11	ND
CRMRs81	Chã Grande	Mata	Jiló	13	MLG13	ND
CRMRs78	Chã Grande	Mata	Jiló	24	MLG24	ND

CRMRS141	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	24	MLG24	ND
CRMRS148	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	24	MLG24	ND
CRMRS130	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	26	MLG26	ND
CRMRS138	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	26	MLG26	ND
CRMRS125	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	28	MLG28	ND
CRMRS126	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	33	MLG33	ND
CRMRS131	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	14	MLG14	ND
CRMRS128	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	30	MLG30	ND
CRMRS134	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	30	MLG30	ND
CRMRS135	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	30	MLG30	ND
CRMRS136	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	30	MLG30	ND
CRMRS139	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	19	MLG19	ND
CRMRS140	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	6	MLG6	ND
CRMRS143	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	16	MLG16	ND
CRMRS145	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	34	MLG34	ND
CRMRS151	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	34	MLG34	ND
CRMRS147	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	18	MLG18	ND
CRMRS150	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	15	MLG15	ND
CRMRS152	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	22	MLG22	ND
CRMRS132	Belém de S. Francisco	Sertão	Tomate	31	MLG31	ND
CRMRS158	Floresta	Sertão	Tomate	31	MLG31	ND
CRMRS245	Mirandiba	Sertão	Tomate	1	MLG1	ND
CRMRS246	Mirandiba	Sertão	Tomate	10	MLG10	ND
CRMRS252	Mirandiba	Sertão	Tomate	4	MLG4	ND

576 H, haplótipos determinados neste estudo; MLG<sup>a</sup>, genótipos multilocus observados na análise por  
577 mesorregião; MLG<sup>b</sup>, genótipos multilocus observados na análise por hospedeiro; ND, não determinados

578

579



580 **Tabela 2** Índices de diversidade genética e estimativa de desequilíbrio de ligação para  
 581 populações de *Ralstonia pseudosolanacearum* de diferentes mesorregiões de  
 582 Pernambuco

População	Mata	Agreste	Sertão
N	43	38	24
Nº de haplótipos	17	13	17
E ( $g_{24}$ )	11,9	10	17
G	8,85 (5,76 - 10,60)	5,87 (4,11 – 7,38)	13,09
E <sub>5</sub>	0,74 (0,73 - 0,87)	0,68 (0,64 – 0,80)	0,86
H <sub>E</sub>	2,45 (1,94 - 2,51)	2,10 (1,69 - 2,21)	2,72
Índice de Simpson	0,88 (0,82 - 0,90)	0,83 (0,75 – 0,86)	0,92
Fração Clonal	0,60	0,53	0,29
I <sub>A</sub>	1,51**	1,94**	1,79**
rbarD ( $r_d$ )	0,09**	0,18**	0,18**

583 N, o tamanho da amostra; E ( $g_N$ ), riqueza genotípica estimada o menor N; G, diversidade genotípica;  
 584 Índice dimensionado; E<sub>5</sub>, Índice de equitabilidade genotípica; H<sub>E</sub>, Diversidade gênica; e intervalos de  
 585 confiança (entre parênteses); Índice de diversidade genotípica. (I<sub>A</sub>) índice de associação; rbarD ( $r_d$ ), índice  
 586 alternativo. \*\* Significativo a 1% de probabilidade.

587

588 **Tabela 3** Análise de variância molecular (AMOVA) em subpopulações de *Ralstonia*  
 589 *pseudosolanacearum* de diferentes mesorregiões

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre subpopulações	2	57,68	0,79 Va	33,51
Dentro de subpopulações	102	161,89	1,58 Vb	66,49
Total	104	219,58	1,41629	

590  
591

592 **Tabela 4** Diferenciação genética entre populações ( $F_{ST}$ ) de *Ralstonia*  
 593 *pseudosolanacearum*<sup>a</sup> de diferentes mesorregiões de Pernambuco (diagonal inferior) e  
 594 número de migrantes ( $Nm$ )<sup>b</sup> (diagonal superior).

População	Mata	Agreste	Sertão
Mata		3,59 <sup>b</sup>	0,37
Agreste	0,06 <sup>a</sup>		0,26
Sertão	0,40**	0,49**	

595 \*\* Significativo a 1% de probabilidade

596

597 **Tabela 5** Índices de diversidade genética e estimativas de desequilíbrio de ligação para  
 598 populações de *Ralstonia pseudosolanacearum* de diferentes hospedeiros de origem.

População	Tomate	Berinjela	Pimentão
N	24	30	18
Nº de haplótipos	10	11	9
E ( $g_{24}$ )	8,68	8,42	9
G	6,55 (4,91 - 7,71)	6,43 (4,15 - 7,71)	7,71
E <sub>5</sub>	0,81 (0,75 - 0,90)	0,77 (0,71 - 0,90)	0,92
H <sub>E</sub>	2,06 (1,73 - 2,17)	2,08 (1,63 - 2,16)	2,11
Índice de Simpson	0,84 (0,79 - 0,87)	0,824 (0,76 - 0,87)	0,87
Fração Clonal	0,41	0,36	0,50
População total	I <sub>A</sub>	0,88**	
	rbarD ( $r_d$ )	0,07	

599 N, o tamanho da amostra; E ( $g_N$ ), riqueza genotípica estimada o menor N; G, diversidade genotípica;  
 600 Índice dimensionado; E<sub>5</sub>, Índice de equitabilidade genotípica; H<sub>E</sub>, Diversidade gênica; e intervalos de  
 601 confiança (entre parênteses); Índice de diversidade genotípica. (I<sub>A</sub>) índice de associação; rbarD ( $r_d$ ), índice  
 602 alternativo. \*\* Significativo a 1% de probabilidade.

603

604 **Tabela 6** Análise de variância molecular (AMOVA) em subpopulações de *Ralstonia*  
605 *pseudosolanacearum* de diferentes hospedeiros.

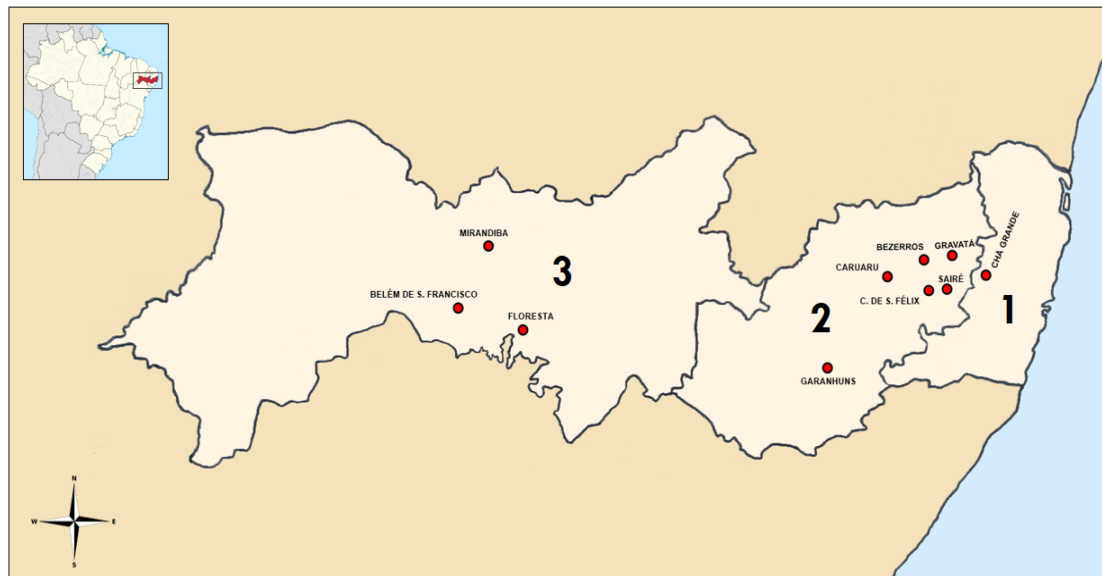
Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre subpopulações	2	5,31	0,05 Va	4,2
Dentro de subpopulações	69	90,07	1,31 Vb	95,8
Total	71	95,37	1,36	

606

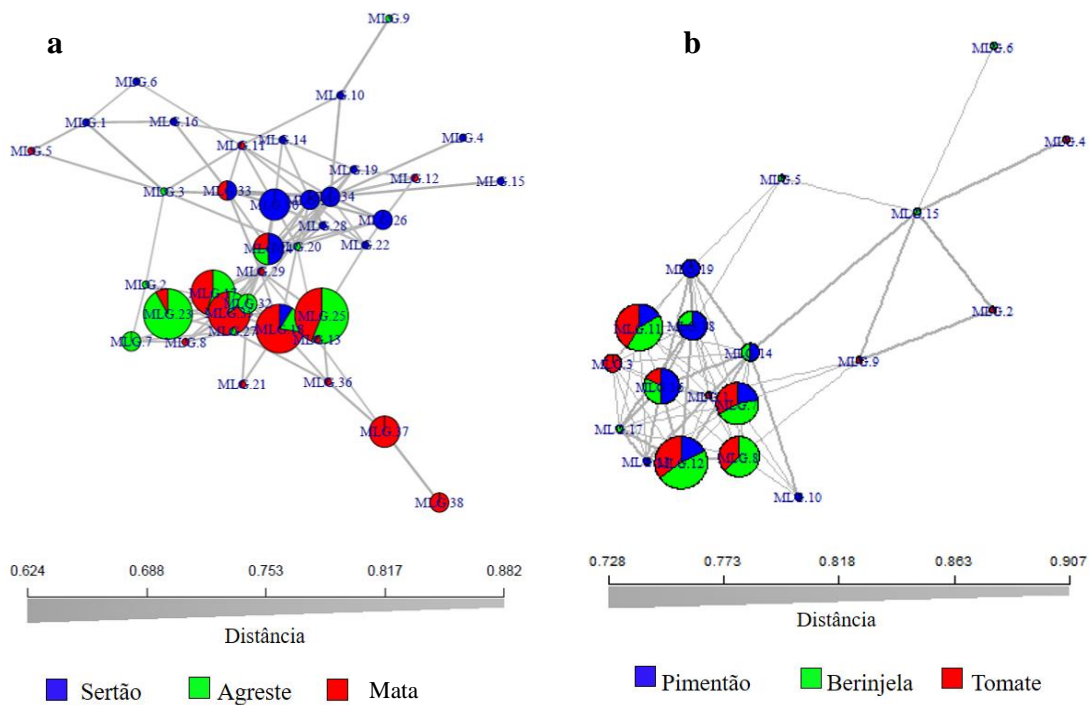
607 **Tabela 7** Diferenciação genética entre populações ( $F_{ST}$ ) de *Ralstonia*  
608 *pseudosolanacearum* de diferentes hospedeiros

População	Tomate	Berinjela	Pimentão
Tomate			
Berinjela	0,00		
Pimentão	0,09	0,00	

609 \*\* Significativo a 1% de probabilidade



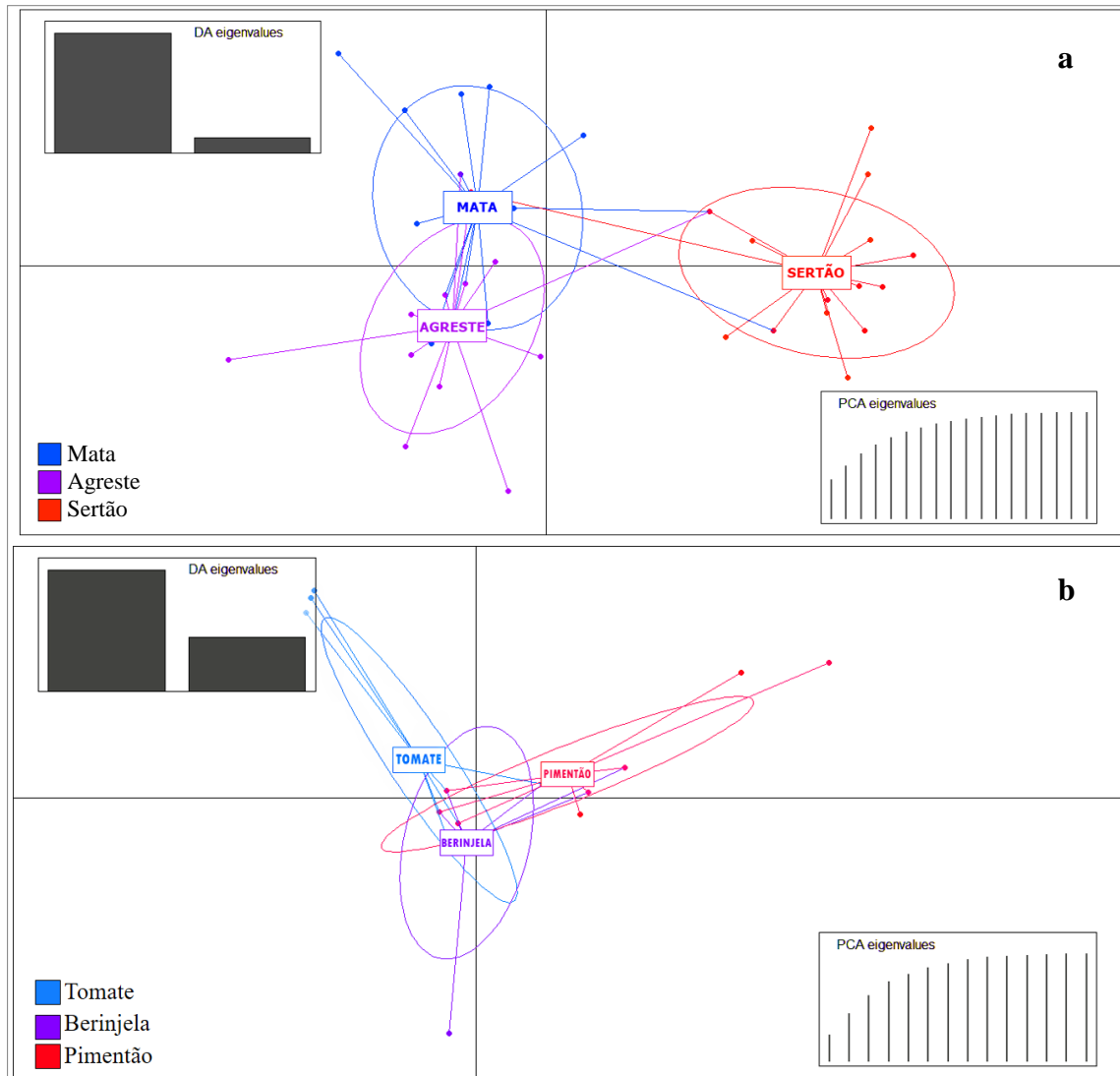
610  
611 **Fig. 1** Mapa de Pernambuco, Nordeste do Brasil, apresentando a origem dos isolados e  
612 distribuição das subpopulações. Mesorregiões: Mata (1), Agreste (2) e Sertão (3).  
613



614  
615  
616  
617  
618

**Fig. 2** Rede de haplótipos de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* de acordo com origem geográfica (a) e hospedeiro de origem (b). Cada círculo identificado corresponde a um haplótipo (MLG), cujo tamanho é proporcional à sua frequência na população.

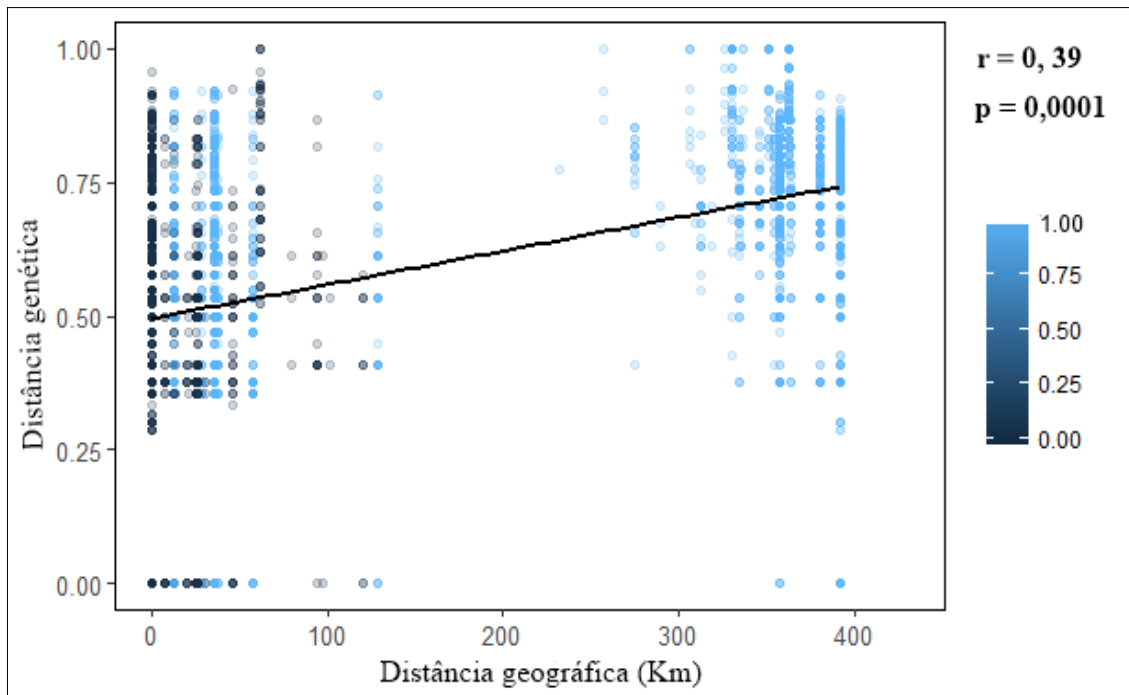




619

620 **Fig. 3** Análise discriminante de componentes principais (DAPC) para populações de  
 621 isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* de acordo com origem geográfica (a) e  
 622 hospedeiro de origem (b).

623



624 **Fig. 4** Correlação entre distância genética e distância geográfica de populações de  
625 *Ralstonia pseudosolanacearum* por meio do teste de Mantel Parcial.

## CONCLUSÕES GERAIS



## CONCLUSÕES GERAIS

A população de *Ralstonia pseudosolanacearum* em Pernambuco possui alta variabilidade genética, sendo encontrada evidência da formação de grupos genéticos separados geograficamente;

A subpopulação da mesorregião do Sertão está estruturada em relação as subpopulações das mesorregiões do Agreste e Mata;

Não existe diferenciação genética entre as subpopulações de *R. pseudosolanacearum* de acordo com o hospedeiro de origem;

A recombinação não atua na geração de variabilidade na população de *R. pseudosolanacearum* em Pernambuco;

Migração, seleção, mutação e deriva são forças evolutivas que moldam a população de *R. pseudosolanacearum* em