



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

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**DIVERSIDADE DE *Ralstonia* spp. em PERNAMBUCO,
RESISTÊNCIA DE TOMATEIROS SILVESTRES À
MURCHA BACTERIANA E EXPRESSÃO GÊNICA NA
QUEBRA DE RESISTÊNCIA**

Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque

RECIFE-PE

2017

GREECY MIRIAN RODRIGUES ALBUQUERQUE

**DIVERSIDADE DE *Ralstonia* spp. em PERNAMBUCO,
RESISTÊNCIA DE TOMATEIROS SILVESTRES À
MURCHA BACTERIANA E EXPRESSÃO GÊNICA NA
QUEBRA DE RESISTÊNCIA**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza – Orientadora
Profa. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano – Coorientadora

RECIFE-PE

FEVEREIRO-2017

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

A345d Albuquerque, Greecy Mirian Rodrigues
 Diversidade de *Ralstonia* spp. em Pernambuco,
 resistência de tomateiros silvestres à murcha bacteriana e
 expressão gênica na quebra de resistência / Greecy Mirian
 Rodrigues Albuquerque. – 2017.
 119 f. : il.

 Orientadora: Elineide Barbosa de Souza.
 Coorientadora: Rosa de Lima Ramos Mariano.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
 Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
 Recife, BR-PE, 2017.
 Inclui referências.

 1. *Ralstonia solanacearum* 2. *R. pseudosolanacearum*
 3. Resistência isolado-específica 4. Transcriptoma 5.

RNASeq I. Souza, Elineide Barbosa de, orient. II. Mariano, Rosa de
Lima Ramos, coorient III. Título

CDD 632

DIVERSIDADE DE *Ralstonia* spp. em PERNAMBUCO, RESISTÊNCIA DE TOMATEIROS SILVESTRES À MURCHA BACTERIANA E EXPRESSÃO GÊNICA NA QUEBRA DE RESISTÊNCIA

GREECY MIRIAN RODRIGUES ALBUQUERQUE

Tese defendida e aprovada a Banca Examinadora em 23 de fevereiro de 2017.

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Dimas Menezes (UFRPE)

Profa. Dr^a Kátia Cilene da Silva Félix (FASETE)

Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)

Prof. Dr. Alessandro Nicolli (UFRPE)

Recife-PE

FEVEREIRO-2017

A minha querida família pelo amor, apoio, incentivo e confiança em todos os momentos da minha vida. As professoras Elineide Souza e Rosa Mariano pela formação e amizade.

DEDICO

À infinita Misericórdia de Jesus

À Deus, meu tudo.

OFEREÇO

“Tudo o que é nobre e belo está em Deus (...). Ó sábios do mundo e grandes inteligências, conheci que a verdadeira grandeza está em amar à Deus. ”

(Diário de Santa Faustina, 990)

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora pela presença constante em minha vida, pelo seu eterno amor, força e sustento em todos os momentos da minha vida;

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

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação, pela formação oferecida no curso de Doutorado em Fitopatologia, aos professores e funcionários;

As Profas. Dra. Elineide Souza e Dra. Rosa Mariano, pelas orientações ao longo da minha vida acadêmica, pelo exemplo de profissionais, apoio, paciência, atenção, amizade, carinho e delicadeza;

Ao Dr. Leonardo Boiteux, Dra. Maria Esther Fonseca Boiteux e Dr. Carlos Lopes da Embrapa Hortaliças, pela parceria, atenção e ensinamentos prestados;

Aos extensionistas, técnicos e engenheiros agrônomos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) de Belém do São Francisco, Petrolina e Salgueiro, da Embrapa Semiárido e da Agência de Defesa Agropecuária de Pernambuco (ADAGRO), especialmente a Maria Cristina Lemos (IPA-sede) e Edinaldo Ferraz (IPA- Belém do São Francisco), pela colaboração nas visitas às áreas produtoras de tomateiro no semiárido de Pernambuco;

Aos amigos do Laboratório de Fitobacteriologia, Prof. Marco Gama, Jéssica, Emanuel, Joelma, Lendro Victor, Lendro Velez, Ana Dulce, Claudeana, Alessandra, Carla, Pedro e Elias, pela amizade, apoio e ajuda em diversos momentos. E especialmente a Adriano Freire, Edilaine Melo e Walquíria Alves;

Ao colegas e técnicos do Laboratório de Melhoramento e Análises genômicas e do Laboratório Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, pela ajuda, atenção e amizade;

Ao Sr. Luiz Coelho (Lula) e ao Sr. Luís da casa-de-vegetação, pela atenção, amizade e toda ajuda na realização deste trabalho;

As amigas Myrzânia, Leila, Kátia, Meridiana, Liliana, Mirtis e Yrlânia, pela amizade, ajuda e incentivo;

A minha família que esteve comigo incondicionalmente em todos os momentos, amando, formando, orientando, ajudando e vibrando pelas conquistas.

Sumário

RESUMO GERAL	IX
GENERAL ABSTRACT.....	X
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. O tomateiro: de plantas cultivadas a silvestres	2
2. Murcha bacteriana em solanáceas: importância, taxonomia, diversidade, sintomatologia, epidemiologia e controle	5
2.1. Importância.....	5
2.2. Taxonomia de <i>Ralstonia</i> spp.....	6
2.3. Diversidade de <i>Ralstonia</i> spp. em solanáceas no Brasil e em Pernambuco.....	8
2.4. Sintomatologia.....	11
2.5. Epidemiologia.....	14
2.6. Controle da murcha bacteriana em tomateiro	15
3. Resistência à murcha bacteriana em tomateiro e em espécies silvestres de <i>Solanum</i> spp.....	16
4. Caracterização genética da resistência à murcha bacteriana, a partir de estudo do transcriptoma	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO II.....	35
Diversidade de <i>Ralstonia</i> spp. de solanáceas no semiárido de Pernambuco, Brasil	36
Resumo	36
Abstract.....	36
Introdução.....	36
Material e Métodos.....	39
Coleta dos isolados	39

Extração do DNA	39
Identificação da espécie/filótipo por Pmx-PCR	39
Amplificação e sequenciamento parcial dos genes <i>egl</i> e <i>mutS</i>	40
Análises filogenéticas	41
Determinação da biovar	41
Teste de patogenicidade e virulência	41
Resultados.....	42
Isolados bacterianos e Filotipagem.....	42
Análises filogenéticas dos genes <i>egl</i> e <i>mutS</i> e determinação da sequência	43
Distribuição das sequências.....	43
Determinação da biovar	44
Patogenicidade e virulência dos isolados	44
Discussão	44
Agradecimentos	48
Literatura citada.....	49
CAPÍTULO III	67
Resistência de acessos silvestres de tomateiro à murcha bacteriana no Brasil	67
Resumo	68
Abstract.....	69
Introdução.....	69
Material e métodos	72
Isolados bacterianos.....	72
Material vegetal	72
Identificação de fontes de resistência em acessos silvestres de <i>Solanum</i> spp. seção <i>Lycopersicon</i> à murcha bacteriana.....	72
Relação entre resistência ao cancro bacteriano e à murcha bacteriana	74

Resultados.....	75
Identificação de fontes de resistência em acessos silvestres de <i>Solanum</i> spp. secção <i>Lycopersicon</i> à murcha bacteriana.....	75
Relação entre resistência ao cancro bacteriano e à murcha bacteriana	77
Discussão.....	77
Agradecimentos	81
Referências	81
CAPÍTULO IV	96
Genes diferencialmente expressos na quebra de resistência de <i>Solanum lycopersicum</i> linhagem Hawaii 7996 por <i>Ralstonia solanacearum</i>	96
Resumo	68
Abstract.....	98
1. Introdução	98
2. Material e Métodos.....	99
2.1. Material vegetal e isolados bacterianos	99
2.2. Coleta dos tecidos, extração do RNA total e sequenciamento do cDNA.....	99
2.3. Montagem, anotação funcional e análises de expressão de genes do transcriptoma..	100
.....	100
3. Resultados.....	101
3.1. Dados do RNASeq e montagem do transcriptoma	101
3.2. Genes diferencialmente expressos na quebra de resistência de Hawaii 7996	101
3.3. Identificação dos DEGs associados à quebra de resistência de Hawaii 7996	102
4. Discussão	103
5. Conclusão.....	104
6. Agradecimentos	104
7. Referências	105
CONCLUSÕES GERAIS	117

RESUMO GERAL

No Brasil, a murcha bacteriana causada por *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* constitui um sério problema no cultivo do tomateiro. Os objetivos deste trabalho foram (i) analisar a diversidade genética e posicionamento filogenético de isolados de *Ralstonia* spp. no semiárido do estado de Pernambuco (mesorregiões Agreste, São Francisco e Sertão); (ii) identificar em tomateiros silvestres da secção *Lycopersicon*, fontes de resistência local à murcha bacteriana, para as regiões Nordeste e Centro-Sul do Brasil, analisando também a relação entre resistência a esta doença e ao cancro bacteriano e (iii) analisar genes diferencialmente expressos durante a quebra de resistência de Hawaii 7996 pelos isolados CNPH 488 e CRMRS223 de *R. solanacearum*, através de análise do transcriptoma por RNASeq. Dois haplótipos em *R. pseudosolanacearum*, identificados por análise de rede de haplótipos, relacionaram-se filogeneticamente (gene *egl*) às sequevares I-17 e I-18; e cinco haplótipos em *R. solanacearum* relacionados às sequevares IIA-50 (três haplótipos), IIA-58 e IIA-59, sendo as sequevares I-17 e IIA-58 detectadas exclusivamente no semiárido de Pernambuco. Acessos de tomateiros silvestres foram identificados como fontes de resistência local à murcha bacteriana. Quatro acessos de *S. pimpinellifolium* foram selecionados como altamente a moderadamente resistentes (CNPH 597, CNPH 1038, CNPH 1039 e CNPH 1195) à murcha bacteriana para ambas as regiões Nordeste e Centro-Sul do Brasil, contudo, apresentando resistência isolado-específica. Na região Nordeste, os acessos apresentaram resistência a *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum*, enquanto no Centro-Sul, apenas a *R. solanacearum*. Foi relatado o primeiro caso de resistência à murcha bacteriana em *S. chmielewskii* e *S. habrochaites*. A relação entre resistência ao cancro bacteriano e a murcha bacteriana foi comprovada nos genótipos 72-TR-4-4 e IRAT-L3, que não diferiram de Hawaii 7996 (padrão de resistência internacional à murcha bacteriana). A análise do transcriptoma de plantas de Hawaii 7996 com quebra resistência por *R. solanacearum* revelou 3279 e 4179 genes diferencialmente expressos, às 24 e 96 h após a inoculação, respectivamente, dos quais analisaram-se 107 genes relacionados a quebra de resistência. Os principais genes down-regulados compreenderam auxinas (n=34), glucanas (n=33) e ubiquitinas (n=9). Ubiquitinas foram relacionadas a resistência à murcha bacteriana, pela primeira vez. A diversidade de *Ralstonia* spp. foi considerada elevada no semiárido de Pernambuco e foram selecionadas fontes promissoras de resistência à murcha bacteriana no Brasil. Hawaii 7996 foi indicado como a fonte de resistência de maior amplitude no Brasil, podendo ser suplantada por isolados de *R. solanacearum* pela redução da expressão de genes como glucanas, auxinas e ubiquitinas.

Palavras-chave: *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, resistência isolado-específica, transcriptoma, RNASeq

GENERAL ABSTRACT

In Brazil, the bacterial wilt caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* and *R. solanacearum* is a serious problem in tomato crops. This study aimed (i) to analyze the genetic diversity and phylogenetic positioning of *Ralstonia* spp. in the semi-arid region of Pernambuco state (Agreste, São Francisco and Sertão mesoregions); (ii) to select wild tomatoes of *Lycopersicon* section, as sources of local resistance to bacterial wilt, for the Northeast and Center-South regions of Brazil, also analyzing the relationship between resistance to this disease and bacterial canker and (iii) to analyze differentially expressed genes in the breakdown of resistance of Hawaii 7996 by the strains CNPH 488 and CRMRS223 of *R. solanacearum*, through analysis of the transcriptome by RNASeq. Haplotype network analysis identified two haplotypes in *R. pseudosolanacearum* phylogenetically related (*egl* gene) to sequevars I-17 and I-18; and five *R. solanacearum* haplotypes related to sequevar IIA-50 (three haplotypes), IIA-58 and IIA-59. The sequevars I-17 and IIA-58 were detected exclusively in the semi-arid climate of Pernambuco state. Accessions of wild tomatoes were identified as sources of local resistance to bacterial wilt. Four accessions of *S. pimpinellifolium* were selected as highly to moderately resistant (CNPH 597, CNPH 1038, CNPH 1039 and CNPH 1195) to bacterial wilt for both Northeast and Center-South regions of Brazil, but the resistance was strain-specific. In the Northeast, the accessions were resistant to *R. pseudosolanacearum* and *R. solanacearum*, while in the Center-South, only to *R. solanacearum*. For the first time bacterial wilt resistance was detected in *S. chmielewskii* and *S. habrochaites*. The relationship between resistance to bacterial canker and bacterial wilt was confirmed in two genotypes 72-TR-4-4 and IRAT-L3, which did not differ from Hawaii 7996 (international resistance pattern of bacterial wilt resistance). The analysis of the transcriptome of Hawaii 7996 plants with resistance breaking by *R. solanacearum* revealed 3279 and 4179 differentially expressed genes, at 24 and 96 h after inoculation, respectively, of which 107 genes related to resistance breakdown were analyzed. The main down-regulated genes comprised auxins (n = 34), glucans (n = 33) and ubiquitins (n = 9). Ubiquitins were related to resistance to bacterial wilt for the first time. *Ralstonia* spp. showed high diversity in the semi-arid region of Pernambuco and promising sources of bacterial wilt resistance in Brazil were selected. Hawaii 7996 was the resistance source with great spectrum in Brazil, but it was surpassed by strains of *R. solanacearum*, which reduced the expression of genes like glucans, auxins and ubiquitins.

Keywords: *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, strain-specific resistance, transcriptome, RNASeq

CAPÍTULO I

Introdução Geral

DIVERSIDADE DE *Ralstonia* spp. EM PERNAMBUCO, RESISTÊNCIA DE TOMATEIROS SILVESTRES À MURCHA BACTERIANA E EXPRESSÃO GÊNICA NA QUEBRA DE RESISTÊNCIA

INTRODUÇÃO GERAL

1. O tomateiro: de plantas cultivadas a silvestres

O tomateiro pertence à divisão Spermatophyta, Sub-divisão Angiospermae, Sub-classe Malvales-Tubiflorae, Ordem Solanales, Família Solanaceae e gênero *Solanum*. O tomateiro além de *S. lycopersicum* (hortaliça cultivada economicamente), apresenta mais 16 espécies silvestres distribuídas em três secções: *Lycopersicoides*, *Juglandifolium* e *Lycopersicon*. As secções *Lycopersicoides* e *Juglandifolium* abrangem duas espécies cada, sendo *S. lycopersicoides* Dunal e *S. sitiens* Johnst, pertencentes à primeira secção; e *S. juglandifolium* Dunal e *S. ochrantum* Dunal, à segunda (PERALTA; SPOONER; KNAPP, 2008). A secção *Lycopersicon*, mais diversa em termos de quantidade de espécies é dividida em quatro grupos (*Lycopersicon*, *Eryopersicon*, *Arcanum* e *Neolycopersicon*), evoluídos a partir de um ancestral comum há aproximadamente sete milhões de anos (MOYLE, 2008; NESBITT; TANKSLEY, 2002; PERALTA; SPOONER; KNAPP, 2008; SPOONER; PERALTA; KNAPP, 2005).

O grupo *Lycopersicon* é constituído de *S. lycopersicum* e três espécies silvestres: *S. cheesmaniae* (Riley) Fosberg, *S. galapagense* Darwin & Peralta e *S. pimpinellifolium* L.; o grupo *Eryopersicon*, possui o maior número de espécies: *S. chilense* (Dunal) Reich, *S. corneliomuelleri* Macbr., *S. habrochaites* Knapp & Spooner, *S. huaylasense* Peralta & Knapp e *S. peruvianum* L.; o grupo *Arcanum* é formado por *S. arcanum* Peralta, *S. chmielewskii* (Rick et al.) Spooner; Anderson; Jansen e *S. neorickii* Spooner; Anderson; Jansen e como único representante do grupo *Neolycopersicon*, tem-se *S. pennellii* Correll (PERALTA; SPOONER; KNAPP, 2008).

Os tomateiros silvestres são originários da América do Sul apresentando o México como provável centro de domesticação e o Peru como centro de diversidade (LARRY; JOANNE, 2007). Após a domesticação foram introduzidos na Europa, a partir de onde disseminaram-se para a Ásia meridional e oriental, África e Oriente Médio e distribuídos

no Equador, Peru, norte do Chile, Ilhas Galápagos e Cordilheira dos Andes (DARWIN et al., 2003; RICK, 1976). No Brasil, o tomateiro foi introduzido possivelmente pelos portugueses (MADEIRA et al., 2008).

Durante vários anos, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* foi considerado o ancestral silvestre do tomateiro cultivado devido a sua ampla ocorrência na América do Sul, como também pelo encurtamento do estilo da flor (COX; 2000). No entanto, Nesbitt e Tanksley (2002), baseado em estudos genéticos, relataram que as plantas conhecidas por ‘cerasiforme’ não seriam ancestrais do tomateiro, mas sim, uma mistura entre tomateiros cultivados e silvestres.

Solanum lycopersicum apresenta base genética estreita devido ao seu processo de domesticação, possuindo no seu genoma menos de 5% de variação genética proveniente de seus parentes silvestres (MILLER; TANKSLEY, 1990). Dessa forma, as espécies silvestres de tomateiro despontam como as principais fontes de variabilidade para o melhoramento genético do tomateiro, sobretudo visando resistência à doenças e qualidade dos frutos (BAI; LINDOUTH, 2007; RICK; CHETELAT, 1995). Nesse sentido, a maior variabilidade em tomateiro silvestre é encontrada em: *S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. peruvianum* e *S. pennellii*; e as menos variáveis: *S. cheesmaniae* e *S. pimpinellifolium* (RODRIGUEZ, 2013).

Existem mais de 62.000 acessos de tomateiros (silvestres e cultivados) em bancos de genes em todo o mundo (TODOROVSKA et al., 2014) e no Brasil, são mais de 4.000 subamostras conservadas pela Embrapa, Instituto Agrônomo de Campinas e Universidade Federal de Viçosa destinados ao melhoramento vegetal (LOPES; BOITEUX, 2012).

O tomateiro (*S. lycopersicum*) na natureza é uma planta perene, mas comporta-se como anual quando cultivada (FILGUEIRA, 2008). Nutricionalmente, o fruto é constituído de água (93-95%), compostos inorgânicos, ácidos orgânicos, açúcares, sólidos insolúveis em álcool e outros compostos. O tomate é considerado um alimento funcional devido aos altos teores de vitaminas A e C, além de ser rico em licopeno (TODOROVSKA et al., 2014).

Os cultivos de tomateiro são destinados ao consumo in natura (de mesa) e ao abastecimento industrial como decorrência das características intrínsecas na produção, beneficiamento, processamento e comercialização, constituindo-se assim, em duas

cadeias produtivas distintas desde as variedades utilizadas, formas de cultivo e consumo final (CAMARGO et al., 2006).

No cenário agrícola, o tomateiro destaca-se entre as hortaliças cultivadas mais apreciadas no mundo, com aumento de 49% da produção entre 2000 e 2013. Em 2016 a produção mundial situou-se em torno de 130 milhões de toneladas, dos quais 88 e 42 milhões são destinados ao tomate de mesa e indústria, respectivamente. Os principais países produtores foram China, Índia, Estados Unidos, Turquia e o Brasil, que ocupa a oitava posição no *ranking* da produção com 3.737.925 milhões de toneladas, em uma área de 78 mil ha plantados (IBGE, 2017).

No Brasil, configura-se como uma das principais hortaliças em importância econômica devido à multiplicidade de seu aproveitamento na alimentação humana, alternando com a batatateira (*S. tuberosum* L.), a liderança no *ranking* de produção (CARVALHO et al., 2014; SILVA; GIORDANO, 2000). Em 2016 os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais destacaram-se como os principais produtores, enquanto que, Pernambuco ocupou a 11ª posição nacional, com produção de 53.331 toneladas (IBGE, 2017). Nas regiões Norte e Nordeste, a tomaticultura possui grande importância socioeconômica na agricultura familiar (SANTOS et al., 2008).

A tomaticultura é considerada uma cultura de alto risco, devido a uma combinação de vários fatores de ordem econômica, biológica e climática, que a tornam altamente suscetível a desordens fisiológicas e a problemas fitossanitários (LOOS et al., 2008). Dentre as doenças de caráter biótico que podem afetar a produção do tomateiro tem-se as de (a) etiologia fúngica: tombamento de mudas (*Pythium* spp. Pringsheim, *Rhizoctonia solani* Kühn e *Phytophthora* spp. de Bary), pinta preta (*Alternaria solani* (Ellis & Martin) Jones & Grout), requeima (*P. infestans* (Mont.) de Bary), septoriose (*Septoria lycopersici* Spegazzini), mancha de estenfílio (*Stemphylium solani* Weber e *S. lycopersici* (Enjoji) Yamam), mancha de cladospório (*Fulvia fulva* (Cooke) Ciferri), oídio (*Oidium lycopersici* L. e *Oidiopsis sicula* Scalia), bolor cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.), mancha alva (*Corynespora cassiicola* Berk. & Curt.), murcha de esclerócio (*Sclerotium rolfsii* Sacc), podridão de esclerotínia (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), rizoctoniose (*R. solani*), podridão olho-de-veado (*Phytophthora* spp.), murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen) e murcha de verticílio (*Verticillium dahliae* Kleb. e *V. albo-atrum* Reinke & Berthold); (b) etiologia viral: topo-

amarelo (*Potato leafroll virus* (PLRV) e *Tomato yellow top virus* (TYTV)), vira cabeça (*Tomato spotted virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV)), risca-do-tomateiro (*Potato virus Y* (PVY)), mosaico amarelo (*Pepper Yellow mosaic virus* (CSNV)), mosaico do fumo (*Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Tobacco mosaic virus* (TMV)), mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* (CMV)) e mosaico dourado do tomateiro (várias espécies do gênero *Begomovirus*); (c) Nematóides: meloidoginose (*Meloidogyne* spp. Goldi); e (d) etiologia bacteriana: murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum* (Smith; Yabuuchi et al.) Safni et al. e *R. pseudosolanacearum* Safni et al.), cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.), mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp. Dowson), pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al.), talo oco ou podridão mole (*Pectobacterium* spp. Waldee), queima bacteriana (*P. syringae* pv. *syringae* (van Hall) Janse) e necrose seca da medula (*P. corrugata* Roberts & Scarlett) (LOPES; ÁVILA, 2005).

Dentre os problemas fitossanitários destaca-se a murcha bacteriana ou murchadeira, a qual é responsável por grandes prejuízos diretos e indiretos, como as perdas na produção, limitação do plantio de variedades agronomicamente importantes, contudo, suscetíveis ao patógeno, e inviabilização de áreas de cultivo, especialmente em plantios sucessivos, devido à contaminação elevada do solo pela fitobactéria (LOPES; DUVAL, 2007).

2. Murcha bacteriana em solanáceas: importância, taxonomia, diversidade, sintomatologia, epidemiologia e controle

2.1. Importância

A murcha bacteriana apresenta distribuição mundial com ampla e crescente gama de hospedeiros, ocorrendo em mais de 54 famílias botânicas, compreendendo mais de 200 espécies de plantas, entre monocotiledôneas e dicotiledôneas (ELPHINSTONE, 2005; WICKER et al., 2007). Essa característica associada à ampla distribuição geográfica a configura como uma das doenças mais destrutivas do mundo. Por outro lado, o conhecimento sobre o impacto econômico da doença a nível mundial é subestimado, em

função da escassez de informações quanto ao seu efeito na agricultura familiar (ELPHINSTONE, 2005; HAYWARD, 1991). Os prejuízos causados pela murcha bacteriana podem atingir até 100%, sobretudo durante o período chuvoso (LOPES; DUVAL, 2007).

A murcha bacteriana ocorre em solanáceas, em todas as regiões brasileiras, principalmente em áreas com temperatura e umidade elevadas (LOPES, 2009; SANTIAGO et al., 2016). No Brasil, o primeiro relato da doença foi realizado no Rio Grande do Sul, em plantas de tabaco (*Nicotiniana tabacum* L.) em 1922 (TAKATSU; LOPES, 1997) e em Pernambuco, existem relatos da doença desde 1987, em plantas de pimentão na mesorregião Mata (MARIANO; CABRAL; SILVA, 1988; MARIANO et al., 1989) mas, certamente, a presença da doença antecede esta data (MARIANO et al., 1989). Atualmente, a doença tem causado grandes prejuízos econômicos nos municípios produtores das mesorregiões do Agreste, Mata (GARCIA et al., 2013; SILVA, 2014), Sertão e Submédio do Vale do São Francisco (ALBUQUERQUE et al., 2015).

2.2. Taxonomia de *Ralstonia* spp.

A murcha bacteriana foi primeiro atribuída a *Bacillus solanacearum* Smith (1896). Posteriormente, o patógeno foi classificado como *Bacterium solanacearum* (Smith) Chester 1897, *Pseudomonas solanacearum* (Smith, 1896) Smith, 1914, *Phytomonas solanacearum* (Smith, 1896) Bergey et al. (1923), *Burkholderia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi et al. (1992) e enfim, posicionada no gênero *Ralstonia*, espécie *R. solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi et al. (1995) com sua validação publicada em 1996 (Yabuuchi et al., 1996). Em seguida, *R. solanacearum* foi considerada um complexo de espécies (FEGAN; PRIOR, 2005), o qual é definido como um grupo de isolados relacionados, cujos membros individuais podem representar mais de uma espécie. *Ralstonia syzigii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al., agente causal da “doença de Sumatra do cravo da Índia” em Java e Sumatra e a ‘Blood disease bacterium’ (BDB) que ocorre na Indonésia, também fizeram parte deste complexo (FEGAN; PRIOR, 2005), com ocorrências não relatadas no Brasil (ALBUQUERQUE et al., 2014; SANTIAGO et al., 2016; SILVA, 2014).

O complexo *R. solanacearum* era subdivido em um sistema hierárquico de classificação, constituído de quatro filotipos (relacionados à origem geográfica dos isolados), 57 sequevares (SANTIAGO et al., 2016), oito clados (WICKER et al., 2012) e clones (FEGAN; PRIOR, 2005). Além das 57 sequevares, outras quatro sequevares foram identificadas totalizando 61 sequevares, das quais: duas sequevares novas no filotipo IIA (IIA-58 e IIA-59) oriundas de solanáceas na região Nordeste do Brasil (J. R. Silva, comunicação pessoal, fev 2017) e sobreposição de duas sequevares em filotipos diferentes. A sequevar I-54 em tabaco na China (LI et al., 2016) foi sobreposta com a IIB-54 em pimentão (*Capsicum* sp.), gerânio (*Geranium* sp.), tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e batateira (*S. tuberosum*) no Brasil (SANTIAGO et al., 2016), assim como a sequevar I-55 em tabaco na China (LIU et al., 2017), com a IIB-55 em tomateiro e batateira no Brasil (SANTIAGO et al., 2016).

A partir de dados de sequenciamento de genoma, características bioquímicas, culturais, fisiológicas e de hibridização DNA-DNA, Safni et al. (2014) propuseram a reclassificação taxonômica do complexo em três espécies independentes e subespécies. *Ralstonia pseudosolanacearum* Safni et al. consistiu dos isolados pertencentes aos filotipos I e III, originados na Ásia e África e ilhas vizinhas, respectivamente, e às biovares 1, 2, 3, 4 e 5; *R. solanacearum* pelos isolados do filotipo II (IIA e IIB), originados no continente americano e biovares 1 e 2, os quais corresponderiam a duas subespécies (não determinadas). Os isolados do filotipo IV originados na Indonésia e Japão foram reclassificados em três subespécies de *R. syzigii*, onde *R. syzigii* subsp. *indonesiensis* Safni et al. agrupou os isolados de *Ralstonia* causadores de murcha, *R. syzigii* subsp. *syzigii* Safani et al. os isolados anteriormente denominados de *R. syzigii* e como *R. syzigii* subsp. *celebesensis* Safni et al. os de “Blood disease bacterium”.

A recente divisão do complexo em três espécies também foi apoiada por Prior et al. (2016) que evidenciaram a diferenciação entre os isolados dos filotipos II e IV e a proximidade entre os isolados dos filotipos I e III, de acordo com dados do genoma e proteoma de 29 e 73 isolados, respectivamente. Zhang e Qiu (2016) também propuseram que isolados dos filotipos I e III que constituem *R. pseudosolanacearum* poderiam ser classificados em duas subespécies; assim como os dos filotipos IIA e IIB de *R. solanacearum*. E confirmaram a reclassificação do filotipo IV como uma espécie dividida

em três subespécies, através de análise filogenômica de 686 genes de cópia única encontrados nos genomas de 39 isolados.

Outra proposta de reposicionamento do complexo de espécies *R. solanacearum* foi sugerida (embora não adotada) por Genin e Denny (2012), na qual os autores concluíram que o complexo era polifilético, apresentando três grupos de estirpes que excediam o limite aceito para especiação, baseado em estudos prévios de hibridação DNA-DNA (ROBERTS et al., 1990; VANEECHOUTTE et al., 2004). Foi proposta, além de *R. solanacearum*, a criação de duas novas espécies (*Ralstonia sequeirae* e *R. haywardii*) e três subespécies (*R. haywardii* subsp. *celebensis*, *R. haywardii* subsp. *solanacearum*, *R. haywardii* subsp. *syzygii*) (GENIN; DENNY, 2012).

Atualmente, a murcha bacteriana pode ser causada por isolados de *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* e/ou *R. syzygii* subsp. *indonesiensis*, embora não haja ocorrência desta última bactéria no Brasil (SANTIAGO et al., 2016). Em Pernambuco há relatos de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* em solanáceas nas mesorregiões Agreste e Mata (GARCIA et al., 2013; SILVA, 2014) e de *R. pseudosolanacearum* na brassicácea rúcula (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa* Mill) no Agreste (ALBUQUERQUE et al., 2016). Estudos recentes têm apontado o Brasil como o centro de origem de *R. solanacearum* (filotipo II) (WICKER et al., 2012).

Isolados individuais destas espécies variam com respeito à epidemiologia e a gama de hospedeiros, sendo adaptados a solanáceas, bananeira (*Musa* spp. L.), eucalipto (*Eucalyptus* spp. L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), amoreira (*Morus* spp. L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). Isolados de *Ralstonia* spp. compartilham um genoma nuclear conservado que presumivelmente é essencial para a sua biologia comum, como a colonização dos vasos do xilema e a incitação do sintoma de murcha (GUIDOT et al., 2009; REMENANT et al., 2011).

2.3. Diversidade de *Ralstonia* spp. em solanáceas no Brasil e em Pernambuco

As populações de *Ralstonia* spp. possuem elevada diversidade no Brasil, apresentando evidências de mutação, migração, recombinação e seleção, sendo a mutação o principal fator gerador de variabilidade dessas fitobactérias no Brasil (SANTIAGO, 2014).

Ralstonia spp. é caracterizada pela alta diversidade de fenótipos e genótipos, adaptados a uma ampla gama de hospedeiros e condições climáticas, sendo classificada durante vários anos, em nível infraespecífico, em cinco raças e seis biovars. As raças são diferenciadas pela gama de hospedeiros (HE; KELMAN; SEQUEIRAE, 1983) e as biovars têm sido definidas através da utilização de açúcares (maltose, lactose, celobiose e trealose) e álcoois (manitol, sorbitol, dulcitol e inositol) como fontes de carbono e formação de ácidos (HAYWARD, 1994), sendo detectadas em solanáceas as biovars 1, 2 e 3. Esta classificação em raças e biovars tem sido pouco utilizada por alguns pesquisadores, por não refletir a heterogeneidade dos isolados de *Ralstonia* spp. (PINHEIRO et al., 2011).

Com o advento das técnicas moleculares, alguns genes têm sido utilizados na inferência filogenética e caracterização genética de fitobactérias. Genes como *egl* (endoglucanase), *gyrB* (girasse do DNA) e *mutS* (reparo do DNA) têm demonstrado serem informativos nas análises de diversidade genética de espécies relacionadas (HÄNNINEN; HANNULA, 2007; RODRIGUES, 2010).

Apesar da reclassificação do complexo *R. solanacearum* nas três espécies propostas por Safni et al. (2014), a diversidade genética de *Ralstonia* spp. persiste, sendo estimada de acordo com a ocorrência e distribuição de filotipos, clados e sequevars em diversos trabalhos (CARSTENSEN et al. 2017; SANTIAGO et al. 2016; STULBERG; HUANG 2016), associando os filotipos às respectivas espécies de *Ralstonia*.

Os clados são específicos aos filotipos e, conseqüentemente às espécies, onde *R. pseudosolanacearum* compreende os clados 1 (filotipo I) e 6 (filotipo III); *R. solanacearum* os clados 2 e 3 (filotipo IIA) e 4 e 5 (filotipo IIB); e as subespécies de *R. syzigii* constituem os clados 7 (*R. syzigii* subsp. *celebesensis* e *R. syzigii* subsp. *indonesiensis*) e 8 (*R. syzigii* subsp. *syzigii*). Em *R. solanacearum* o clado 2 compreende os isolados causadores de murcha bacteriana e Moko da bananeira (sequevars IIA-6 e IIA-24); clado 3, isolados originados do sudeste dos Estados Unidos; clado 4 é equivalente à sequevar IIB-4 de Moko e isolados emergentes 4NPB; e o clado 5, contém isolados que causam brown-root (raça 3, biovar 2) em batatateira e isolados de Moko (sequevar IIB-3) (WICKER et al., 2012).

As sequevars são definidas 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 apresentarem sequências similares (FEGAN; PRIOR, 2005; VILLA et al., 2005; WICKER et al., 2007; XU et al., 2009). Os filotipos podem ser identificados por meio de Filotipo Multiplex PCR, uma variação da PCR que permite à amplificação simultânea de diferentes sequências com a utilização de múltiplos iniciadores por reação, com os *primers* da série Nmult (FEGAN; PRIOR, 2005).

No Brasil, *Ralstonia* spp. apresenta elevada diversidade, 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) das quais seis são detectadas em tomateiro: I-18, IIA-41, IIA-50, IIA-58, IIA-59 e IIB-54. Nesse sentido, 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 e IIA-50 em todas as regiões brasileiras (RODRIGUES et al., 2012; SANTIAGO et al. 2016); já 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).

Em Pernambuco, a diversidade de *Ralstonia* spp. também tem sido considerada elevada, de acordo com características fenotípicas, epidemiológicas e molecular. Em tomateiros no Município de Camocim de São Félix, Silveira et al. (1998) verificaram predominância da biovar 3 (78%) sobre a biovar 1 (22%) e a identificação de cinco grupos de similaridade em uma população de 28 isolados, de acordo com as variáveis índice de murcha, período de incubação e período latente (PL₅₀). Silva (2014) detectaram a presença de isolados dos filotipos I (91,7%) e II (8,7%) em Pernambuco, os quais apresentaram alta diversidade fenotípica, de acordo com o perfil bioquímico de isolados determinado pelo sistema Biolog Gen III. No entanto, não há estudos relacionados à diversidade genética e análise filogenética de *R. solanacearum* em tomateiro proveniente dos diversos municípios produtores do estado, principalmente das mesorregiões do São Francisco e Sertão (SILVA, 2014; SANTIAGO et al., 2016).

Estudos têm demonstrado que os diferentes processos seletivos ocorridos nas populações bacterianas têm elevado a diversidade genética. A distância geográfica também tem provocado divergências, uma vez que pode influenciar na variação e na

estrutura genética da população devido à redução no fluxo gênico (LIU et al., 2009; NORMAN et al., 2009; TOUKAM et al., 2009). Além disso, a capacidade natural de troca de material genético por meio de transferência horizontal de genes, durante o processo de infecção de *R. solanacearum*, também contribui para a alta diversidade encontrada (BERTOLLA et al., 1999).

Conhecer a estrutura genética da população é fundamental para estudos epidemiológicos e para o controle efetivo de doenças, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de genótipos resistentes (VAN DER WOLF et al., 1998).

2.4. Sintomatologia

A murcha bacteriana é observada em reboleiras (aglomeração de plantas murchas) localizadas nas partes mais baixas e úmidas na área de plantio, ou em manchas onde ocorre acúmulo de água, como em vazamentos de canos de irrigação ou de gotejadores (LOPES, 2009). A expressão dos sintomas da doença varia de acordo com o hospedeiro (cultura e cultivar), isolado (virulência) e condições ambientais (clima, tipo de solo, práticas culturais (ELPHINSTONE, 2005). Ela pode se manifestar em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo o estágio de formação do primeiro cacho de frutos, o mais suscetível à doença (LOPES, 2009).

No tomateiro, o sintoma típico externo é a murcha verde descendente da planta, a qual é resultante da interrupção parcial ou total do fluxo de água desde as raízes até a parte superior da mesma (Figura 1A). Internamente, observa-se escurecimento dos vasos do xilema, evoluindo para porções da medula e do córtex até a necrose completa (KELMAN, 1953) (Figura 1B). O escurecimento é decorrente do transporte de substâncias resultantes da oxidação de fenóis, originando melanina (AMORIM et al., 2011).

Em seções transversais de caules e ramos, observa-se fluxo viscoso em pontos correspondentes aos feixes vasculares (SMITH, 1896). Como consequência, ocorrem o colapso e a morte da planta devido à degradação dos vasos do xilema e à destruição dos tecidos circundantes (KELMAN, 1953). Outros sintomas da murcha são raquitismo, amarelecimento, epinastia foliar e, no caule e ramos, crescimento de raízes adventícias e observação de listras escuras e estreitas sob a epiderme, correspondendo aos feixes

vasculares infectados (Figura 1D) (KELMAN, 1953; ALVAREZ; BIOSCA; LÓPEZ, 2010). Em ambiente controlado, sob condições de elevada umidade e temperaturas mais amenas, a bactéria pode exsudar pus bacteriano externamente no caule ou pecíolo de folhas que apresentem microferimentos (Figura 1C).



Figura 1. Sintomas da murcha bacteriana em tomateiro. A, planta murcha; B, escurecimento dos vasos do xilema; C, exsudação de pus bacteriano em caule infectado (sob alta umidade), em casa de vegetação e D, feixes vasculares infectados sob a epiderme da planta.

No campo, a diagnose pode ser realizada pelo teste do copo que consiste em cortar (em bisel) um fragmento do caule da planta exibindo escurecimento dos feixes, e colocá-lo em um copo transparente com água limpa. O teste é considerado positivo quando, após alguns minutos, houver migração do fluxo bacteriano da extremidade do caule em direção a água (Figura 2A). Outra forma de diagnose é pela observação da presença de pus bacteriano nos tecidos infectados no caule (Figura 2B). No entanto, o diagnóstico da doença deve ser realizado em laboratório através de isolamento do patógeno em meio de cultura específico, como o meio de Kelman (1954), identificando-se colônias típicas de *Ralstonia* spp. (LOPES, 2009).



Figura 2. Diagnose da murcha bacteriana em tomateiro. A, teste do copo apresentando exsudação de fluxo bacteriano (seta); B, pus bacteriano nos tecidos infectados do caule de tomateiro.

O sintoma de murcha é resultante de fatores relacionados à bactéria, como obstrução dos vasos do xilema pelas células bacterianas e pela produção de exopolissacarídeos (EPS), após a colonização sistêmica dos vasos do xilema. A planta também responde à colonização, formando tiloses, dificultando a passagem de água, resultando assim, em um desequilíbrio hídrico e consequente murcha, e por isto, o EPS é considerado o principal fator de virulência de *R. solanacearum* (HIKICHI et al., 2007).

O desequilíbrio dos hormônios auxina e etileno também influencia nos sintomas, provocando redução do crescimento da planta e formação das raízes adventícias

(BUDDENHAGEN; KELMAN, 1964). Dessa forma, a doença é decorrente de ação mecânica da bactéria pela colonização ou pela ação de metabólitos lançados na seiva.

Outros fatores de virulência/patogenicidade são: a motilidade pelos flagelos (KANG et al., 2002; TANS-KERSTEN et al., 2004); a secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares que atuam na degradação dos tecidos vegetais, facilitando a penetração e colonização, tendo sido identificadas as enzimas: β -1,3-endoglucanase (*egl*), exoglucanase (*ChbA*), endopoligalacturonases (*PehA* e *PglA*), exopoligalacturonases (*PehB* e *PehC*) e pectinmetilesterase (*Pme*) (GABRIEL et al., 2006; LIU et al., 2005); o sistema de secreção tipo III, codificado pelos genes *hrp* (GENIN; BOUCHER, 2002) que atuam transcolando um conjunto de proteínas efetoras diretamente dentro da célula hospedeira, as quais modulam as funções das células e alteram o sistema de defesa da planta (ALFANO; COLLMER, 2004).

2.5. Epidemiologia

Isolados de *Ralstonia* spp. sobrevivem no solo saprofiticamente por vários anos. Após a detecção de exsudatos radiculares eles se locomovem em direção às raízes através dos flagelos. Pili e lipopolissacarídeos auxiliam na adesão às superfícies radiculares e na colonização nas zonas de alongamento da raiz (ALVAREZ; BIOSCA; LÓPEZ, 2010).

A bactéria penetra nas raízes das plantas através de ferimentos mecânicos ou naturais formados nas axilas radiculares durante a emergência da raiz lateral, num período de aproximadamente quatro horas (ALVAREZ; BIOSCA; LÓPEZ, 2010; SAILE et al., 1997; VASSE et al., 1995). Após dois ou três dias, coloniza os espaços intercelulares do córtex da raiz, invade os vasos do xilema, e então coloniza os tecidos aéreos da planta (ALVAREZ; BIOSCA; LÓPEZ, 2010; SAILE et al., 1997). Com a morte do tomateiro e elevação do seu processo de decomposição, a bactéria multiplica-se abundantemente, liberando novas células bacterianas para o solo (BEDENDO, 1995).

Além do solo, isolados de *Ralstonia* podem colonizar e sobreviver na rizosfera e em raízes de plantas hospedeiras, plantas voluntárias, plantas não hospedeiras e plantas invasoras (COUTINHO, 2005; GRANADA; SEQUEIRA, 1983; MIRANDA et al., 2004; SEQUEIRA, 1993; WENNEKER et al., 1999). Fatores abióticos como temperatura, pH, umidade e tipo de solo, além de bióticos como a presença e atividade de organismos

predadores, antagonistas e/ou competidores podem influenciar na sobrevivência da bactéria no solo (VAN VEEN et al., 1997). *Ralstonia* spp. também pode infectar sementes de pimenta (UMESHA; KAVITHA; SHETTY, 2005) e ser transmitida por sementes de berinjela (SHARMA; SHARMA, 2014) e amendoim (MACHMUD; MIDDLETON, 1991).

A alta capacidade saprofítica desta fitobactéria é decorrente da grande versatilidade no uso de compostos orgânicos como fonte de energia, tais como açúcares, ácidos graxos e compostos aromáticos derivados da degradação da lignina, além de possuir a habilidade de entrar em uma fase dormente (GENIN; BOUCHER, 2002).

A disseminação de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* a longa distância ocorre principalmente através de material vegetal infectado (HAYWARD, 1991), inclusive com infecção latente (WICKER et al., 2012). Em novas áreas, a bactéria também pode ser introduzida através de ferramentas e máquinas agrícolas contaminadas, água de irrigação e no movimento de solo (HAYWARD, 1994).

A murcha é favorecida por condições de umidade e temperatura altas e chega a inviabilizar o cultivo de diversas espécies em regiões com clima temperado quente, tropical ou subtropical (HAYWARD, 1991). Em cultivos irrigados, canos e gotejadores com vazamento podem provocar o aparecimento de focos da doença, devido ao molhamento excessivo do solo. Por outro lado, plantios conduzidos a baixas temperaturas podem escapar à doença, mesmo com a bactéria presente no solo (LOPES, 2009).

Espécies de *Ralstonia* têm a capacidade de colonizar até mesmo genótipos altamente resistentes, como verificado por Grimault et al. (1994). Eles observaram colonização na região inferior dos caules de cultivares de tomateiro com 0% de incidência da murcha bacteriana. Nakaho et al. (2004) também relataram em cultivares resistentes limite da colonização do patógeno ao protoxilema, não sendo capaz de se expandir para o tecido primário e outros tecidos do xilema.

2.6. Controle da murcha bacteriana em tomateiro

Assim, como para a maioria das fitobacterioses, o controle da murcha bacteriana, após sua manifestação no campo, torna-se muito difícil. Por isso, é recomendada a adoção do manejo integrado, pela adoção de medidas preventivas e complementares de controle,

uma vez que a prática de medidas isoladas não é eficiente para evitar as perdas, sobretudo quando as condições ambientais forem favoráveis à doença (LOPES, 2009).

Algumas medidas preventivas de controle da murcha bacteriana que têm sido preconizadas são: 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 rotação de culturas, por no mínimo um ano, com gramíneas (LOPES; QUEZADO SOARES, 2000).

O melhoramento para resistência à murcha bacteriana é considerado uma medida eficiente para um controle duradouro. No entanto, existem poucas cultivares comerciais de solanáceas com nível adequado de resistência à murcha bacteriana, embora a sua busca tenha sido uma prioridade em vários programas de melhoramento (LOPES, 1994; WICKER et al., 2007). Variedades comerciais de tomateiro porta-enxerto, como os híbridos Guardiã e Muralha (Takii®) e Magnet (Sakata®), apresentam resistência a murcha bacteriana, sendo recomendados para uso em condições normais de cultivo, sem a presença de isolados de *Ralstonia* spp. altamente virulentos (LOPES; BOITEUX; ESCHEMBACH, 2015).

3. Resistência à murcha bacteriana em tomateiro e em espécies silvestres de *Solanum* spp.

A resistência do hospedeiro à murcha bacteriana é a capacidade da planta limitar a colonização do patógeno, nas partes inferiores do caule ou ainda, está associada à infecção latente (LEBEAU et al., 2011).

A fonte mais estável de resistência mundial tem sido a linhagem de *S. lycopersicum* Hawaii 7996, apresentando maior estabilidade e amplitude de resistência a diferentes isolados (LEBEAU et al., 2011). No entanto, alguns isolados têm suplantado esta resistência como os isolados pertencentes à sequevar IIA-4NPB em Martinica (WICKER et al., 2007), o isolado Pss190 (*R. pseudosolanacearum*, biovar 1) em Taiwan (HAI et al., 2008) e no Brasil, o isolado CNPH 488 (*R. solanacearum*, biovar 2A), obtido de tomateiro no estado do Maranhão (LOPES; BOITEUX; ESCHEMBACH, 2015).

No Brasil, dentre as cultivares comerciais de tomateiro com resistência à murcha tem-se a cv. Majestade que é indicada para o estado de Roraima (LIMA et al, 2010) e a variedade Yoshimatsu desenvolvida pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) para as condições amazônicas (CAMPOS et al., 1998). A resistência genética à murcha bacteriana existente na variedade Yoshimatsu foi confirmada no estado de Tocantins, para isolados locais de *R. solanacearum* (CAMPOS et al.,1998).

As principais fontes de resistência para tomateiros cultivados são encontradas em tomateiros silvestres, principalmente em *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (KIM et al., 2016; LEBEAU et al., 2011), sendo relatadas também em *S. pennelli* (HAI et al., 2008) e *S. peruvianum* (CARMEILLE et al., 2006; KIM et al., 2016).

Em *S. pennelli*, Hai et al. (2008) detectaram cinco acessos (LA1943, LA716, LA1656, LA1732 e TL01845) resistentes ao isolado Pss186 (*R. pseudosolanacearum*, filotipo I, biovar 4). Esses acessos também apresentaram resistência de alta a moderada ao isolado Pss190 (*R. pseudosolanacearum*, filotipo I) e elevada suscetibilidade ao isolado Pss4 (*R. pseudosolanacearum*, filotipo I). Neste trabalho, os autores selecionaram estes acessos de uma coleção de 252 materiais silvestres de *Solanum* spp., da coleção do AVRDC, em Taiwan, e da coleção da Universidade da Califórnia, Davis.

Kim et al. (2016) analisaram a resistência à murcha bacteriana em 285 acessos de tomateiro na fase de plântulas, em casa de vegetação na Coreia, provenientes do Banco de Germoplasma do Centro Nacional de Agrobiodiversidade de Desenvolvimento Rural, dos quais 97,9% foram suscetíveis à *R. solanacearum*. Desta coleção foram selecionados como altamente resistentes quatro acessos, provenientes de *S. lycopersicum* (n = 3) e *S. peruvianum* (n = 1). Resistência em *S. peruvianum* também foi reportada por Carmeille et al. (2006) em um acesso proveniente de um conjunto de 82 acessos da Coleção de Germoplasma de Tomate das Ilhas Reunião, à *R. solanacearum* (filotipo II, biovar 2) sendo a resistência caracterizada como parcial. Neste estudo os autores também relataram a resistência parcial em um acesso de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*.

Um conjunto formado de 10 acessos de cada solanácea (tomateiro, berinjela - *S. melongena* L. e pimentão - *Capsicum annuum* L.), denominado de Core-TEP, foi analisado quanto à resistência a um conjunto de 12 isolados de *Ralstonia* spp. (Core-Rs2) representativo da diversidade, em Camarões, por Lebeau et al. (2011). Neste estudo foram selecionados oito acessos das três solanáceas que apresentaram maior espectro de

resistência ao Core-Rs2, dos quais TML46 e Hawaii 7996 foram os únicos acessos de tomateiro selecionados.

Acessos silvestres de tomateiro também podem apresentar resistência a outros fitopatógenos, como verificado em *S. chilense* a *P. infestans*, *F. oxysporum* e *A. solani* (STAM; SCHEIKL; TELLIER, 2017) e *S. lycopersicoides* a *Botrytis cinerea* (SMITH et al., 2014). Além disso, genótipos resistentes ao cancro bacteriano (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis*) também podem apresentar resistência à murcha bacteriana (JAHR et al., 2000; LATERROT, 1999; LATERROT; KAN, 1978). Lebeau et al. (2011) verificaram esta relação no genótipo Okitsu Sozai n. 1 de *S. hirsutum* var. *glabratum* que apresentou resistência a dois isolados de *R. pseudosolanacearum* (CMR 134, sequevar I-13 e CMR32, sequevar III-29) e um isolado de *R. solanacearum* (CFBP2957, sequevar IIA-36). Os acessos MR-4 e 72-TR-4.4 resistentes ao cancro bacteriano também apresentaram resistência à *R. solanacearum* e à *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, raça 2 (LATERROT; KAN, 1978).

Resistência à murcha bacteriana do tipo imunidade também tem sido identificada em acessos de duas espécies de jurubeba, *S. scuticum* Nee (n=15) e *S. stramonifolium* Jacq (n=26), provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças, no Brasil, visando o uso desses acessos como porta-enxerto para tomateiro (LOPES; MENDONÇA, 2016). Contudo, os autores relataram certa incompatibilidade na enxertia destes acessos em tomateiro.

Diversos autores têm defendido que o melhoramento vegetal visando a resistência à murcha bacteriana em solanáceas deve ser regional ou relacionado a condições climáticas (HAYWARD, 1991) devido à resistência ser isolado-específica (CARMEILLE et al., 2006; HAI et al., 2008; KIM et al., 2016; LEBEAU et al., 2011) e influenciada pelas condições ambientais (HAYWARD, 1991). As dificuldades na obtenção de cultivares resistentes muitas vezes residem (i) no insuficiente conhecimento dos mecanismos que caracterizam a fonte de resistência, tais como infecção latente ou ausente; (ii) nas características genéticas dos isolados utilizados no programa de melhoramento; e (iii) nas interações entre os fatores genéticos envolvidos na resistência do hospedeiro e patogenicidade da bactéria (JAUNET; WANG, 1999).

4. Caracterização genética da resistência à murcha bacteriana, a partir de estudo do transcriptoma

Na caracterização da resistência, sobretudo comparando-se variedades resistentes e suscetíveis tem-se utilizado análise do transcriptoma. Esta análise pode fornecer informações sobre potenciais alvos genômicos e melhorar a capacidade de interpretação de vias funcionais críticas e os mecanismos moleculares subjacentes à sua regulação (NANDETY et al., 2013).

O transcriptoma é um conjunto completo de transcrições de RNA produzido no interior de um organismo em um determinado momento e representa um projeto genômico desse organismo. Desvendar a complexidade do transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais de um genoma que podem ser utilizados para obter aplicações mais eficazes, incluindo o desenvolvimento de estratégias de controle, como os baseados na interferência de RNA e principalmente conhecer os mecanismos moleculares na resposta de resistência. A tecnologia de análise do transcriptoma por RNASeq tem sido usada para muitos organismos para revelar um número crescente de novos transcritos, identificar novos genes e variações de sequência que resultam de splicing alternativo e eventos de fusão de genes (GUO et al., 2013).

O primeiro trabalho sobre transcriptoma para resistência à murcha bacteriana em tomateiro foi realizado por Ishihara et al. (2012), analisando a expressão de genes em uma cultivar suscetível ('Ponderosa') e outra resistente (LS-89) à *R. solanacearum*, a fim de elucidar as características da resistência, no início da interação. A partir de dados analisados por tecnologia de microarranjos, um dia após inoculação da bactéria no caule das plantas, os autores detectaram aumento na expressão de 140 genes na cultivar LS-89, o que não foi verificado na cultivar Ponderosa. Esses genes foram relacionados à patogenicidade, sinalização hormonal, lignina e β -1,3-glucanase. Neste trabalho os autores também avaliaram, por microchips, a expressão de genes das classes acídica III, básica III e II β -1,3-glucanase, em quatro cultivares resistentes (Hawaii 7996, Volante, Anchor T e Ganbarune) e quatro suscetíveis (Bonny Best, Micro-Tom, Momotaro e House-Momotaro), verificando aumento da expressão de genes destas classes nas cultivares resistentes em detrimento das suscetíveis.

Outros estudos relacionados à resistência à murcha bacteriana, através de análise do transcriptoma, foram analisados em *S. commersonii* Dun. (ZULUAGA et al., 2015), gengibre e cúrcuma (*Curcuma longa* L.) por RNASeq (PRASATH et al., 2014) e em pimentão, por microarranjo (HWANG et al., 2011), comparando cultivares resistentes e suscetíveis.

Em *S. commersonii*, uma espécie silvestre utilizada como fonte de introgressão de genes em batata cultivada, foram analisados os genes diferencialmente expressos em raízes de um acesso resistente (F118) e outro suscetível (F97). Foram diferencialmente expressos 221 (F118) e 644 (F97) genes relacionados a estresses bióticos, sendo up-regulados nos dois acessos, genes relacionados a PR-proteínas, metabolismo de auxina, defesa da planta e outros genes com função desconhecida, com variação nos níveis de expressão. Também foi verificado altos níveis de expressão de ácido jasmônico (AJ) no acesso suscetível comparado ao resistente, sendo o AJ antagonista ao ácido salicílico, o qual é necessário para resistência sistêmica (ZULUAGA et al., 2015).

Em pimentão 115 genes foram unicamente expressos no genótipo KC350, resistente à murcha bacteriana, em comparação a 109 genes expressos especificamente no genótipo suscetível Chilbok. No genótipo KC350 muitos genes de resistência foram relacionados a biossíntese de xiloglicanas e na organização da parede celular, enquanto em Chilbok, a suscetibilidade foi associada a genes envolvidos na resposta a estresse e morte celular. Neste trabalho os autores propuseram que a rápida indução de xiloglucana endotransglicosilase/hidrolase 7 (XTH-7) no genótipo resistente pode iniciar um importante papel na reestruturação e reforçar a parede celular, restringindo o movimento da bactéria nos vasos do xilema (HWANG et al., 2011).

Considerando a importância da murcha bacteriana em tomateiro no Brasil e no estado de Pernambuco e que o controle genético da doença é limitado e influenciado pela diversidade do fitopatógeno, ambiente e características das cultivares plantadas, os objetivos deste trabalho foram: (i) analisar a diversidade genética e o posicionamento filogenético de isolados de *Ralstonia* spp. do semiárido do estado de Pernambuco (mesorregiões Agreste, São Francisco e Sertão), visando auxiliar os programas de melhoramento para resistência à murcha bacteriana no Brasil; (ii) selecionar acessos silvestres de tomateiro secção *Lycopersicon*, como fontes de resistência local à murcha bacteriana para as regiões Nordeste e Centro-Sul do Brasil, bem como analisar a relação

entre resistência a esta doença e ao cancro bacteriano, em genótipos de tomateiro resistentes ao cancro; e (iii) analisar a expressão diferencial e temporal de genes em plantas da linhagem Hawaii 7996 de *S. lycopersicum* (padrão de resistência mundial à murcha bacteriana) com suplantação da resistência por isolados de *R. solanacearum*, através da expressão de transcritos obtidos por RNASeq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, G. M. R.; SILVA, SANTOS, L. A.; FELIX, K. C. S.; ROLLEMBERG, C. L.; SILVA, A. M. F.; SOUZA, E. B.; CELLIER, E.B.; PRIOR, P.; MARIANO, R. L. R. Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, n. 11, p. 1175-1182, 2014.

ALBUQUERQUE, G. M. R.; SILVA, A. M. F.; SILVA, J. R.; MARIANO, R. L. R.; FERRAZ, E.; SILVA, M. C. L.; SOUZA, E. B. In: JORNADA DE ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO, 15., 2015, Recife. **Anais...Recife: EDUFRPE**, 2015.p.762.

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.

ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. **Annual Review Phytopathology**, Saint Paul, v. 42, n. 3, p. 385-414, 2004.

ALVAREZ, B.; BIOSCA, E. G.; LOPEZ, M. M. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current research, technology and education topics** in applied microbiology and microbial biotechnology. 2. ed. Badajoz: Formatex, 2010. v. 1, p. 267-279.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN, F. (Eds.). **Manual de Fitopatologia. Piracicaba**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, p. 383-387.

BAI, Y.; LINDHOUT, P. Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future?. **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 1, p. 1085-1094, 2007.

BEDENDO, I. P. Ambiente e Doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). *Manual de Fitopatologia*. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 331-341.

BERGEY, D. H. (Ed.). **Manual of systematic bacteriology**: the Proteobacteria. 1 ed. New York: Springer-Verlag, 1923. v. 2, 442 p.

BERTOLLA, F.; FROSTEGARD, A.; BRITO, B.; NESME, X.; SIMONET, P. During infection of its hosts, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, n. 5, p. 467-472, 1999.

BUDDENHAGEN, I.; KELMAN, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 2, n. 1, p. 203-230, 1964.

CAMARGO, F. P.; ALVES, H. S.; CAMARGO FILHO, W. P.; VILELA, N. J. Cadeia produtiva do tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 36, n. 11, p. 7-20, 2006.

CARMEILLE, A.; CARANTA, C.; DIITINGER, J.; PRIOR, P.; LUISETTI, J.; BESSE, P. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo-type II resistance in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 113, n. 1, p. 110-121, 2006.

CAMPOS, G. A.; SILVEIRA, M. A.; AZEVEDO, S. M.; MALUF, W. R.; RESENDE, J. T. V. Resistência de linhagens de tomateiro à murcha bacteriana no Estado do Tocantins. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 46, 1998.

CARSTENSEN, G. D.; VENTER, S. N.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T. A. 2016. Two *Ralstonia* species associated with bacterial wilt of *Eucalyptus*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 66, n. 3, p. 393-403, 2017.

CARVALHO, C. R. F.; PONCIANO, N. J.; SOUZA, P. M.; SOUZA, C. L. M.; SOUSA, E. F. Viabilidade econômica e de risco da produção de tomate no município de Cambuci/RJ, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 12, p. 2293-2299, 2014.

COUTINHO, T. A. Introduction and prospectus on the survival of *Ralstonia solanacearum*. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt**

disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. 2. ed. Saint Paul: APS Press, 2005. v. 1, p. 29-38.

COX, S. 2000. I Say Tomayto, You Say Tomahto. Disponível em: <<http://lamar.colostate.edu/~samcox/Tomato.html>>. Acesso em: 14 dez 2016.

DARWIN, S. C.; KNAPP, S.; PERALTA, I. E. Taxonomy of tomatoes in the Galapagos Islands: native in introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). **Systematics Biodiversity**, London, v. 1, n. 1, p. 29-53, 2003.

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

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. 1 ed. Saint Paul: APS Press, 2005. v. 1, p. 449-461.

FILGUEIRA, F. A. R. (Ed.). **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. 402 p.

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.

GABRIEL, D. W.; ALLEN, C.; SCHELL, M.; DENNY, T. P.; GREENBERG, J. T.; DUAN, Y. P.; et al. Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 19, n. 1, p. 69-79, 2006.

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

GENIN, S.; DENNY, T. P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Annual Review Phytopathology**, Saint Paul, v. 50, n. 1, p. 67-89, 2012.

GRANADA, G. A., SEQUEIRA, L. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and, plant roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, n. 4, p. 433- 440, 1983.

GRIMAUDT, V.; PRIOR, P. Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Pathology**, Dordrecht, v. 42, n. 4, p. 589-594, 1993.

GUIDOT, A.; ELBAZ, M.; SIRI, M. I.; PIANZZOLA, M. J.; PRIOR, P.; BOUCHER, C. Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and potential use for strain detection. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 9, p. 1105-1112, 2009.

GUO, X.; LI, Y.; LI, C.; LUO, H.; WANG, L.; QIAN, J.; LUO, X.; XIANG, L.; SONG, J.; SUN, C.; XU, H.; YAO, H.; CHEN, S. Analysis of the *Dendrobium officinale* transcriptome reveals putative alkaloid biosynthetic genes and genetic markers. **Gene**, Amsterdam, v. 527, n. 1, p. 131-138, 2013.

HAI, T. T. H.; ESCH, E.; WANG, E. Resistance to Taiwanese race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in wild tomato germplasm. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, n. 3, p. 471-479, 2008.

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

HAYWARD, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.) **Bacterial wilt** -The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. 1 ed. Wallingford: CAB International, 1994. v. 1, p. 9-24.

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

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

HIKICHI, Y.; YOSHIMOCCHI, T.; TSUJIMOTO, S.; SHINOHARA, R.; NAKAHO, K.; KANDA, A.; KIBA, A.; OHNISHI, K. Global regulation of pathogenicity mechanism

of *Ralstonia solanacearum*. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 24, n. 1, p. 149-154, 2007.

HWANG, B. F.; LEE, Y. L.; JAAKKOLA, J. J. Air pollution and stillbirth: a population-based case-control study in Taiwan. **Environmental Health Perspectives**, Duke, v. 119, n. 9, p. 1345-1349, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA)**. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p.1-81, 2017.

ISHIHARA, T.; MITSUHARA, I.; TAKAHASHI, H.; NAKAHO, K. Transcriptome analysis of quantitative resistance specific response upon *Ralstonia solanacearum* infection in tomato. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 10, p. 1-14, 2012.

JAHR, H.; DREIER, J.; MELETZUS, D.; BAHRO, R.; EICHENLAUB, R. The endo- β -1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, n. 7, p. 703-714, 2000.

JAUNET, T. X.; WANG, J. F. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 4, p. 320-327, 1999.

KANG, Y.; LIU, H.; GENIN, S.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 46, n. 4, p. 427-437, 2002.

KELMAN, A. (Ed.). **The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum***. A literature review and bibliography. Raleigh, N. C.: North Carolina State College, 1953. v. 1, 194 p.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 44, n. 12, p. 693-695, 1954.

KELMAN, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 10, n. 2, p. 203-230, 1964.

KIM, S. G.; HUR, O-S.; RO, N-Y.; KO, H-C.; RHEE, J-H.; SUNG, J. S.; RYU, K-Y.; LEE, S-Y.; BAEK, H. J. Evaluation of resistance to *Ralstonia solanacearum* in tomato genetic resources at seedling stage. **Plant Pathology**, Dordrecht, v. 32, n. 1, p. 58-64, 2016.

LARRY, R.; JOANNE, L. Genetic resources of tomato. In: RAZDAN, M. K.; MATTOO, A. K. (Eds.). **Genetic improvement of solanaceous crops**. 1. ed. New Hampshire: Science Publishers, 2007. v. 2, p. 25-75.

LATERROT, H. Resistance to bacteria in tomato. In: MUGNOZZA, G. T. S.; PORCEDDU, E.; PAGNOTTA, M. A. (Eds.) **Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance**. 1. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. v. 8, p. 103-110.

LATERROT, H.; KAAAN, F. Resistance to *Corynebacterium michiganense* of lines bred for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Tomato Genetics Cooperative**, Gainesville, v. 28, n. 1, p. 8-9, 1978.

LEBEAU, A.; DAUNAY, M. C.; FRARRY, A.; PALLOIX, A.; WAMG, J. F.; DINTINGER, J.; CHIROLEU, F.; WICKER, E.; PRIOR, P. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 1, p. 154-165, 2011.

LI, Y.; FENG, J.; LIU, H.; WANG, L.; HSIANG, T.; LI, X.; HUANG, J. Genetic Diversity and Pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* Causing Tobacco Bacterial Wilt in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 7, p. 1288-1296, 2016.

LIMA, H. E.; RÊGO, E. R.; CAVALCANTE, G. P.; RÊGO, M. M.; COTA, L. V. Reação em campo à murcha bacteriana de cultivares de tomate em Roraima. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 227-231, 2010.

LIU, Y.; KANDA, A.; YANO, K.; KIBA, A.; HIKICHI, Y.; AINO, M.; KAWAGUCHI, A.; MIZOGUCHI, S.; NAKAHO, K.; SHIOMI, H.; TAKIKAWA, Y.; OHNISHI, K. Molecular typing of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum* in relation to the ability to induce a hypersensitive reaction in tobacco. **Journal of General Plant Pathology**, Dordrecht, v. 75, n. 5, p. 369-380, 2009.

LIU, Y.; WU, D.; LIU, Q.; ZHANG, S.; TANG, Y.; JIANG, G.; LI, S.; DING, W. The sequevar distribution of *Ralstonia solanacearum* in tobacco-growing zones of China is structured by elevation. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 147, n. 3, p. 541-551, 2017.

LIU, H.; ZHANG, S.; SCHELL, M. A.Y.; 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.

LOOS, R. A.; SILVA, D. J. H.; FONTES, P. C. R.; PICANÇO, M. C. Identificação e quantificação dos componentes de perdas de produção do tomateiro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 281-286, 2008.

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.; ÁVILA, A. C. (Eds.). **Doenças do tomateiro**. 2. ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. v. 1, 151 p.

LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S. Melhoramento para Resistência a Doenças Bacterianas. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Eds.). **Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Bióticos**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. v. 1, p. 61-88.

LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S.; ESCHEMBACK, V. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 125-130, 2015.

LOPES, C. A.; DUVAL, A. M. Q. Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças. In: ZAMBOLIM, L.; LOPES, C. A.; PICANÇO, M. C.; COSTA, H. (Eds.). **Manejo Integrado de Doenças e Pragas**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007. v. 1, p. 115-162.

LOPES, C. A.; MENDONÇA, J. L. Reação de acessos de jurubeba à murcha bacteriana para uso como porta-enxerto em tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 356-360, 2016.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO do VALE, F. X.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas hortaliças**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2000. v. 2, p.757-799.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M.; MELO, P. E. Differential resistance of tomato cultigens to biovars I and III of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 11, p. 1091-1094, 1994.

MACHMUD, M.; MIDDLETON, K. J. Transmission of *Pseudomonas solanacearum* through groundnut seeds. **Bacterial Wilt Newsletter**, St. Lucia, v. 7, n. 1, p. 4-5, 1991.

MADEIRA, A. A. C.; VARENNES, B. A.; ABREU, C. M. M.; ESTEVES, C. C.; MAGALHÃES, M. C. F. Tomato and parsley growth, arsenic uptake and translocation in a contaminated amended soil. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p.114-121, 2008.

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, n. 2, 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.

MIRANDA, E.F.O.; TAKATSU, A.; UESUGI, C.H. Colonização de raízes de plantas daninhas cultivadas *in vitro* e em vasos por *Ralstonia solanacearum*, biovars 1, 2 e 3. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 121-127, 2004.

MOYLE, L.C. Ecological and evolutionary genomics in the wild tomatoes (*Solanum* sect. *Lycopersicon*). **Evolution**, Lancaster, v. 62, n. 12, p. 2995-3013, 2008.

NAKAHO, K.; INOUE, H.; TAKAYAMA, T.; MIYAGAWA, H. Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* in tomato with resistance derived from different origins. **Journal of Genetics Plant Pathology**, Switzerland, v. 70, n. 1, p. 115-119, 2004.

NANDETY, R. S.; KAMITA, S. G.; HAMMOCK, B. D.; FALK, B. W. Sequencing and De Novo Assembly of the Transcriptome of the Glassy-Winged Sharpshooter (*Homalodisca vitripennis*). **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. 1-13, 2013.

- NESBITT, T. C.; TANKSLEY, S. D. Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. **Genetics**, Austin, v. 162, n. 1, p. 365-379, 2002.
- NORMAN, D. J.; ZAPATA, M.; GABRIEL, D. W. DUAN, Y. P.; YUEN, J. M. F.; MANGRAVITA-NOVO, A.; DONAHOO, R. S. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 9, p. 1070-1077, 2009.
- PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M.; KNAPP, S. (Eds.). **Systematic botany monographs**: Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Jugandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). Laramie: The American Society of Plant Taxonomists, 2008. v. 84, 186 p.
- PINHEIRO, C. R.; AMORIM, J. A. E.; DINIZ, L. E. C.; SILVA, A. M. F.; TALAMINI, V.; SOUZA JÚNIOR, M. T. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto à filotipos e sequevares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 5, p. 593-602, 2011.
- PRASATH, D.; KARTHIKA, R.; HABEEBA, N. T.; SURABY, E. J.; ROSANA, O. B.; et al. Comparison of the Transcriptomes of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and Mango Ginger (*Curcuma amada* Roxb.) in Response to the Bacterial Wilt Infection. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. 1-13, 2014.
- PRIOR, P.; AILLOUD, F.; DALRING, B. L.; REMENANT, B.; SANCHEZ, B.; ALLEN, C. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC Genomics**, London, v. 17, n. 1, p. 90-101, 2016.
- REMENANT, B.; CAMBIAIRE, J. C.; CELLIER, G.; JACOBS, J. M.; MANGENOT, S.; BARBE, V.; et al. *Ralstonia syzygii*, the Blood Disease Bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. 1-10, 2011.
- RICK, C. M. Tomato *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). In: SIMMONDS, N.W. (Ed.). **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1976. v. 1, p. 268-273.
- RICK, C. M.; CHETELAT, R. T. Utilization of related wild species for tomato improvement. **Acta Horticulturae**, Netherlands, v. 412, n. 1, p. 21-38, 1995.

ROBERTS, S.; EDEN-GREEN, S.; JONES, P.; AMBLER D. *Pseudomonas syzygii* sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1990.

RODRIGUES, L. M. R.; DESTEFANO, S. A. L.; SILVA, M. J.; COSTA, G. G. L.; MARINGONI, A. C. Characterization of *Ralstonia solanacearum* from Brazil using molecular methods and pathogenicity tests. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 94, n. 3, p. 505-516, 2012.

RODRIGUEZ, O. J. **Exploitation of *Solanum chilense* and *Solanum peruvianum* in tomato breeding for resistance to Tomato yellow leaf curl disease**. 2013, 175f. Tese. (Doutorado em Biotecnologia) - Universitat Politècnica de València, València, 2013.

SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L.; KAPPLER, U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *R. solanacearum* and *R. syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii*, *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotypes I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 64, n. 9, p. 3087-103, 2014.

SAILE, E.MCGARVEY, J.; SCHELL, M.; DENNY, T. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 12, 1264–71, 1997.

SANTIAGO, T. R.; LOPES, C. A.; CAETANO-ANOLLES, G.; MIZUBUTI, E. S. G. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. **Plant Pathology**, 2016. Online: <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12586>. Acesso em: 03 dez 2016.

SANTIAGO, T. R. **A deep analysis of the genetic structure of *Ralstonia solanacearum* in Brazil reveals not much sexin the population!**. 2014, 74 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Viçosa, Viçosa, 2014.

SANTOS, J. A. N. (Coord.). **A agroindústria de alimentos de frutas e hortaliças no Nordeste e demais áreas de atuação do BNB: desempenho recente e possibilidades de políticas**. 1 ed. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2008. v. 24, 324 p.

SEQUEIRA, L. Bacterial wilt: past, present and future. In: Hartman, G. L.; Hayward, A. C. (Eds.). **Bacterial Wilt**. Canberra: ACIAR Proceedings, 1993. v. 45, p. 12-21.

SHARMA, N.; SHARMA, D. K. Incidence and Seed Transmission of *Ralstonia solanacearum* (Smith) in Brinjal (*Solanum melongena* L.) Seeds. **International Journal of Plant Pathology**, Malaysia, v. 5, n. 1, p. 63-69, 2014.

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

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. Produção mundial e nacional. In: Silva, J. B. C.; Giordano, L. B. (Eds.). **Tomate para processamento Industrial**. 1. ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. v. 1, p. 8-11.

SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Variability of *Ralstonia solanacearum* populations causing wilt of tomato in Agreste of Pernambuco, Brazil. **Bacterial Wilt Newsletter**, St. Lucia, v. 15, n. 1, p. 8-10, 1998.

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

SMITH, E. F. (Ed.). **Bacteria in relation to plant disease**. Washington: Carnegie Institution, 1914. v. 3, 309 p.

SMITH, J. E.; MENGESHA, B.; TANG, H.; MENGISTE, T.; BLUHM, B. H. Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* involves widespread transcriptional reprogramming. **BMC Genomics**, London, v. 15, n. 5, p. 334-351, 2014.

SPOONER, D. M.; PERALTA, I. E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum L. section Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. **Taxon**, Utrecht, v. 54, n. 1, p. 43-61, 2005.

STAM, R.; SCHEIKL, D.; STAM, A. T. The wild tomato species *Solanum chilense* shows variation in pathogen resistance between geographically distinct populations. **PeerJ**, London, v. 18, n. 1, p. 5-25, 2017.

STULBERG, M. J.; HUANG, Q. A computer program for fast and easy typing of a partial endoglucanase gene sequence into genospecies and sequevars 1&2 of the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Journal Microbiology Methods**, Netherlands, v. 123, n. 1, p. 101-107, 2016.

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

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

TODOROVSKAA, E.; IVANOVA, A.; GANEVA, D.; PEVICHAROVAB, G.; MOLLEC, E.; BOJINOVD, B.; RADKOVAA, M.; DANAILOVE, Z. Assessment of genetic variation in Bulgarian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes, using fluorescent SSR genotyping platform. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Sofia, v. 28, n. 1, p. 68-76, 2014.

TOUKAM, M. S.; CELLIER, G.; WICKER, E.; GUILBAUD, C.; KAHANE, R.; ALLEN, C.; PRIOR, P. Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 11, p. 1123-1130, 2009.

UMESHA, S.; KAVITHA, R.; SHETTY, H. S. Transmission of seed-borne infection of chilli by *Burkholderia solanacearum* and effect of biological seed treatment on disease incidence', **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Berlin, v. 38, n. 4, p. 281-293, 2005.

VAN DER WOLF, J. M.; BONANTS, P. J.; SMITH, J. J.; HAGENAAR, M.; NIJHUIS, E.; VAN BECKHOVEN, J. R.C. M.; SADDLER, G. S.; TRIGALET, A.; FEUILLADE, R. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. In: **International Bacterial Wilt Symposium**, 2., Guadeloupe. Reports... Paris: INRA, p. 44-49, 1998.

VAN VEEN, B. D.; VAN DRONGELEN, W.; YUCHTMAN, M.; SUZUKI, A. Localization of brain electrical activity via linearly constrained minimum variance spatial filtering. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, New York, v. 44, n. 9, p. 867- 880, 1997.

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

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

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.

WENNEKER, M.; VERDEL, M.; GROENEVELD, R.; KEMPENAAR, C.; VAN BEUNINGEN, A.; JANSE, J. *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: first report on stinging nettle (*Urtica dioica*). **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 105, n. 3, p. 307-315, 1999.

WICKER, E.; GRASSART, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 21, p. 6790-6801, 2007.

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

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, 1995.

XU, J. O.; PAN, Z. C.; XU, J. S.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, L. Q.; HE, L. Y.; FENG, J. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, n. 4, p. 641-653, 2009.

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

ZULUAGA, A. P.; SOLÉ, M.; LU, H.; GÓNGORA-CASTILLO, E.; VAILLANCOURT, B.; COLL, N.; BUELL, C. R.; VALLS, M. Transcriptome responses to *Ralstonia solanacearum* infection in the roots of the wild potato *Solanum commersonii*. **BMC Genomics**, London, v. v. 16, n. 3, p. 246-261, 2015.

CAPÍTULO II

**Diversidade de *Ralstonia* spp. de solanáceas no semiárido de
Pernambuco, Brasil**

1 **Diversidade de *Ralstonia* spp. de solanáceas no semiárido de Pernambuco, Brasil**

2
3 Greecy M. R. Albuquerque, Jéssica R. da Silva, Edilaine A. Melo, Adriano M. F. Silva, Rosa
4 de L. R. Mariano, Maria C. Lemos, Edinaldo Ferraz, Elineide B. de Souza

5 Primeiro ao quinto autor: Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de
6 Pernambuco, Recife-PE, Brasil; sexto e sétimo autores: IPA, Instituto Agrônômico de
7 Pernambuco, Recife-PE, Brasil; oitavo 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

11 **Resumo**

12 A diversidade genética e relacionamento filogenético de *Ralstonia* spp. foram analisados em
13 108 isolados obtidos de solanáceas cultivadas no clima semiárido (mesorregiões Agreste, São
14 Francisco e Sertão), o qual representa 88% do estado de Pernambuco, Brasil. *R.*
15 *pseudosolanacearum* (Filotipo I, biovar 3) prevaleceu no Agreste (78,6%) e *R. solanacearum*,
16 (Filotipo II, biovar 1), nas mesorregiões São Francisco (67,8%) e Sertão (71,4%). Através de
17 análise de rede de haplótipos, foram identificados dois haplótipos em *R. pseudosolanacearum*
18 que se relacionaram filogeneticamente (gene *egl*) às sequevares I-17 e I-18; e cinco haplótipos
19 em *R. solanacearum* relacionados às sequevares IIA-50 (três haplótipos), IIA-58 e IIA-59. As
20 sequevares I-17 e IIA-58 foram detectadas exclusivamente no clima semiárido de Pernambuco,
21 ao contrário de I-18, IIA-50 e IIA-59 também relatadas em outras regiões do Brasil. No Sertão
22 foi diagnosticada a sequevar de apenas um isolado (IIA-50, haplótipo 1) e registrada a
23 ocorrência de *R. pseudosolanacearum* (filotipo I). Enfatiza-se o caráter endêmico das
24 sequevares I-17 e IIA-58 em Pernambuco e a alta diversidade patogênica dos isolados em
25 tomateiro. Este é o primeiro trabalho que retrata a diversidade de *Ralstonia* spp., associando-a
26 ao clima semiárido de Pernambuco no Brasil.

28 **Abstract**

29 The genetic diversity and phylogenetic relationship of *Ralstonia* spp. were analyzed in 108
30 strains obtained from solanaceae grown in the semi-arid climate (Agreste, São Francisco and
31 Sertão mesoregions), which represent 88% of the Pernambuco state, Brazil. *R.*
32 *pseudosolanacearum* (phyloptype I, biovar 3) prevailed in mesoregion Agreste (78.6%) and *R.*

33 *solanacearum* (phylotype II, biovar 1) in São Francisco (67.8%) and Sertão (71.4%). Haplotype
34 network analysis identified two haplotypes in *R. pseudosolanacearum* phylogenetically related
35 (*egl* gene) to sequevars I-17 and I-18; and five *R. solanacearum* haplotypes related to sequevar
36 IIA-50 (three haplotypes), IIA-58 and IIA-59. The sequevars I-17 and IIA-58 were detected
37 exclusively in the semi-arid climate of Pernambuco state, unlike the sequevars I-18, IIA-50 and
38 IIA-59 also reported in other regions of Brazil. In the Sertão mesoregion it was diagnosed only
39 one strain (IIA-50, haplotype 1) and recorded the occurrence of *R. pseudosolanacearum*
40 (phylotype I). It is emphasized the endemic character of the sequevars I-17 and IIA-58 in
41 Pernambuco and the high pathogenic diversity of the tomato strains. This is the first work that
42 shows the diversity of *Ralstonia* spp., associating it with the semi-arid climate of Pernambuco
43 state in Brazil.

44

45

46 O estado de Pernambuco, localizado na região Nordeste do Brasil é dividido
47 geograficamente em cinco mesorregiões (Sertão, São Francisco, Agreste, Mata e Metropolitana
48 do Recife) influenciadas pelos climas tropical e semiárido. O “semiárido Pernambucano” (Fig.
49 1), como é designado o conjunto das mesorregiões Agreste, Sertão e São Francisco, ocupa 88%
50 da extensão territorial do estado e apresenta clima quente de úmido a seco, com temperatura
51 média anual de 25 a 28 °C (1,29), precipitação pluviométrica média anual inferior a 800 mm,
52 índice de aridez de Thorntwaite de até 0,50 e risco de seca superior a 60% (28). Os municípios
53 localizados no semiárido são os principais produtores de solanáceas, especialmente de tomate
54 (21), sendo a murcha bacteriana uma das principais doenças da cultura.

55 A murcha bacteriana ocorre em todas as regiões brasileiras (8,40) causando grandes perdas
56 na produção, podendo chegar a 100% e condenar os campos, principalmente em plantios
57 sucessivos, devido à capacidade da bactéria sobreviver no solo por longo período (26). Em
58 Pernambuco, a doença é causada por *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* (15),
59 as quais foram recentemente reclassificadas como espécies independentes do complexo de
60 espécies *R. solanacearum* (38). Este complexo era subdividido em um sistema hierárquico de
61 classificação, constituído de quatro filotipos (relacionados à origem geográfica dos isolados),
62 oito clados (48), 61 sequevares (J. R. Silva, comunicação pessoal, fev 2017) e clones (13). As
63 sequevares correspondem a grupos de isolados com variação < 1% na sequência do gene
64 endoglucanase (*egl*) e reparo do DNA (*mutS*) (13,34), sendo denominadas no esquema filotipo-

65 número, onde o número é crescente. Atualmente, dentre as 61 sequevares existem 59 sequevares
66 relatadas na literatura e mais duas sequevares novas no filotipo IIA (IIA-58 e IIA-59)
67 identificadas em solanáceas na região Nordeste do Brasil (J. R. Silva, comunicação pessoal, fev
68 2017). As 59 sequevares descritas foram identificadas até a numeração IIB-57 (40), com duas
69 sequevares sobrepostas em filotipos diferentes: i) I-54 em tabaco na China (24) com IIB-54 em
70 pimentão (*Capsicum* sp.), gerânio (*Geranium* sp.), tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e
71 batateira (*S. tuberosum*) no Brasil (40); e ii) I-55 em tabaco na China (25) com IIB-55 em
72 tomateiro e batateira no Brasil (40).

73 A partir de dados de sequenciamento do genoma, características bioquímicas, culturais,
74 fisiológicas e de hibridização DNA-DNA, Safni et al. (38) propuseram a reclassificação do
75 complexo em três espécies, sendo *R. pseudosolanacearum* constituída dos isolados
76 pertencentes aos filotipos I (Ásia) e III (África e ilhas vizinhas); *R. solanacearum* constituída
77 pelos isolados do filotipo II (IIA e IIB), originados no continente americano. Os isolados do
78 filotipo IV causadores de murcha foram reclassificados como *R. syzigii* subsp. *indonesiensis* e
79 os demais isolados deste filotipo, como *R. syzigii* subsp. *syzigii* (doença do cravo de Sumatra)
80 e *R. syzigii* subsp. *celebesensis* (“Blood disease bacterium” – BDB). O recente
81 reposicionamento taxonômico do complexo de espécies *R. solanacearum* em três espécies
82 independentes também foi apoiado por Prior et al. (35) através de análises genômicas e
83 proteômicas de 29 e 73 isolados, respectivamente. Zhang e Qiu (49) de acordo com análises de
84 filogenômica envolvendo 686 genes de cópia única, concluíram que os isolados de *R.*
85 *pseudosolanacearum* filotipos I e III podem representar duas subespécies, bem como os de *R.*
86 *solanacearum* filotipos IIA e IIB; e confirmaram a reclassificação do filotipo IV como uma
87 espécie dividida em três subespécies.

88 A diversidade de *Ralstonia* spp. é considerada elevada no Brasil (2,8,15,36,42). O estudo
89 mais recente analisou uma coleção de 301 isolados provenientes de todas as regiões brasileiras
90 e detectou alta diversidade na população, com a proposição de quatro novas sequevares para *R.*
91 *solanacearum* (IIB-54, IIB-55, IIB-56 e IIB-57) (40). Estudo similar analisou a diversidade
92 genética, bioquímica e patogênica de isolados de *Ralstonia* spp., das regiões Norte e Nordeste
93 do Brasil, constatando duas sequevares novas no filotipo IIA e a ocorrência da sequevar I-17,
94 exclusivamente no Nordeste brasileiro (42). Nenhum estudo analisou a diversidade de isolados
95 provenientes das mesorregiões Sertão e São Francisco, no semiárido do estado de Pernambuco,
96 Brasil.

97 O Brasil é considerado o centro de origem e de diversidade de *R. solanacearum* (40,48).
98 Conhecer as variações genéticas das populações de *Ralstonia* spp. que aqui ocorrem é de
99 fundamental importância para entender como a bactéria evoluiu. Para o estado de Pernambuco,
100 conhecer a diversidade destas fitobactérias nas principais mesorregiões produtoras de
101 solanáceas é imprescindível para auxiliar nas medidas de controle, sendo um pré-requisito
102 fundamental no sucesso dos programas de melhoramento vegetal visando resistência à doença.
103 O uso de cultivares resistentes é preconizado como a melhor estratégia no manejo da doença.
104 Assim, este estudo teve por objetivo detectar a diversidade de isolados de *Ralstonia* spp. em
105 solanáceas no clima semiárido, nas mesorregiões Sertão e São Francisco, bem como ampliar o
106 conhecimento sobre a diversidade da bactéria na mesorregião Agreste de Pernambuco, a fim de
107 auxiliar nos programas de melhoramento para resistência à murcha bacteriana no Brasil.

108

109 **Material e Métodos**

110 **Coleta dos isolados.** Os isolados de *Ralstonia* spp. foram obtidos de solanáceas (tomateiro
111 e berinjaleira) apresentando sintomas de murcha bacteriana, nos principais municípios
112 produtores do semiárido do estado de Pernambuco, Nordeste, Brasil: mesorregião Agreste
113 (Camocim de São Félix, Chã Grande e Gravatá), mesorregião São Francisco (Belém do São
114 Francisco, Floresta, Lagoa Grande, Santa Maria da Boa Vista e Petrolina) e mesorregião Sertão
115 (Cedro, Mirandiba e São José do Belmonte) (Fig. 1). Os isolamentos foram realizados em meio
116 TZC (tetracloro de trifenil tetrazólio), onde colônias circulares irregulares, fluidas, com
117 consistência cremosa e de coloração branca com centro róseo (22) (características de *Ralstonia*
118 spp.) foram purificadas e preservadas em tubos de criogenia contendo água esterilizada. Os
119 isolados foram depositados na Coleção de Culturas Rosa Mariano do Laboratório de
120 Fitobacteriologia (CRM), Área de Fitossanidade, Departamento de Agronomia, da
121 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil.

122 **Extração do DNA.** O DNA genômico de todos os isolados foi extraído a partir do
123 crescimento bacteriano em meio TZC a 30°C por 36-48 h, utilizando-se o Kit para extração de
124 DNA genômico de bactérias (Norgen Biotek, Ontario, Canadá), conforme metodologia do
125 fabricante. O DNA foi eluído em água miliQ, quantificado em espectrofotômetro (BioDrop,
126 Cambridge, Reino Unido) e armazenado a -20°C.

127 **Identificação da espécie/filótipo por Pmx-PCR.** Os *primers* da série Nmult, gerados a
128 partir da região intergênica espaçadora 16S-23S (13) foram combinados com os *primers*

129 espécie-específicos 759/760 para o complexo de espécies *R. solanacearum* (31) e utilizados na
130 reação filotipo multiplex-PCR (Pmx-PCR) para identificação da espécie/filotipo. As reações
131 foram preparadas em PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, San Jose, EUA) contendo mix
132 dos *primers* (1x), DMSO (5%) e DNA (100 ng) e ajustadas com água miliQ (vf = 25 µl). As
133 condições de amplificação foram desnaturação inicial a 96°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por
134 15 s, 59°C por 90 s e 72°C por 90 s e extensão final de 72°C por 10 min, realizada em
135 termociclador (modelo SimpliAmp™; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) (13). Os
136 produtos de PCR foram corados com SYBR Gold (Invitrogen™, Carlsbad, EUA), submetidos
137 a eletroforese em gel de agarose 1,5% (TBE 0,5 X) e visualizados em Fotodocumentador
138 (modelo Digi Doc-It®; UVP, Upland, Canadá). O tamanho dos fragmentos amplificados foi
139 estimado com o marcador 100 pb DNA ladder (Thermo Scientific, San Jose, EUA).

140 **Amplificação e sequenciamento parcial dos genes *egl* e *mutS*.** A amplificação dos
141 fragmentos de 750 pb (*egl*) e 758 pb (*mutS*) foi realizada utilizando os pares de *primers*: Endo-
142 F (5'-ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3') e Endo-R (5'-GCGTTG
143 CCCGGCACGAACACC-3') para o gene *egl* (34) e mutSRsF1570 (5'-
144 ACAGCGCCTTGAGCCGTACA-3') e mutSRsR1926 (5'
145 GCTGATCACCGGCCCGAACAT-3') para *mutS* (47). Para o gene *egl* a reação (50 µl) foi
146 preparada em 2X PCR Master Mix (Thermo Scientific, San Jose, USA), contendo 0,5 mM de
147 cada *primer*, 100 ng de DNA e ajustada com água miliQ (2). As condições de amplificação das
148 amostras consistiram de desnaturação inicial a 96 °C por 9 min; seguida de 30 ciclos (95°C por
149 1 min; 55°C por 40 s e 72°C por 2 min) e extensão final a 72°C por 10 min (12). Para o gene
150 *mutS*: 1,25 U *Taq* DNA polimerase, 1X tampão de reação KCl, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM
151 de cada *primer*, 1,5 mM MgCl₂, 2,5% de DMSO e ajustada com água miliQ para um volume
152 final de 50 µl. O programa de amplificação das amostras consistiu de desnaturação inicial a
153 96°C por 5 min; seguida de 35 ciclos (94°C por 1 min; 66°C por 1 min e 72°C por 90 s) e
154 extensão final a 72°C por 5 min (47). Os produtos da PCR foram corados com SYBR Gold,
155 submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (TBE 0,5X) com o marcador 100 pb DNA
156 ladder. Os produtos da PCR foram purificados com kit de purificação de produtos da PCR
157 (Norgen Biotek, Ontario, Canadá) e sequenciados pela MacroGen (Seul, Coréia do Sul). Foram
158 sequenciados 102 isolados de *Ralstonia* para o gene *egl*, os quais foram analisados por rede de
159 haplótipos através do software DnaSP (versão 5.10.1; Universidade de Barcelona, Barcelona,

160 Espanha), dos quais 24 isolados representativos dos haplótipos foram sequenciados para o gene
161 *mutS*.

162 **Análises filogenéticas.** As sequências parciais dos genes *egl* e *mutS* foram analisadas e os
163 contigs montados através do software Staden Package versão 2.0 (43). As sequências parciais
164 montadas foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W (46) pelo software MEGA versão
165 5.0. Árvores filogenéticas foram construídas por (i) distância genética pelo método Neighbor-
166 Joining (39) utilizando o algoritmo de Jukes e Cantor com 2000 bootstrap, para testar a
167 topologia das árvores no MEGA 5.0 (45); (ii) Máxima verossimilhança pelo software PhyML
168 versão 3.1 (18) usando o modelo de substituição de nucleotídeos transicional (Transitional
169 model - TIM1) e com variação gamma (G) (32) para o gene *egl*, e o modelo Hasegawa-Kishino-
170 Yano (HKY) com variação gamma e sítios invariáveis para o gene *mutS*, determinados pelo
171 software JModel Test versão 2.1.6 (10,18) e (iii) por inferência bayesiana utilizando o software
172 Mrbayes versão 3.2.2 (37). Sequências de referência dos genes *egl* e *mutS* representativas das
173 sequevares descritas na literatura, para isolados de *Ralstonia* spp. (provenientes do Genbank)
174 foram inseridas nas análises filogenéticas para determinação das sequevares. Foi analisada a
175 distribuição das sequevares de *Ralstonia* spp. nas mesorregiões estudadas.

176 **Determinação da biovar.** A biovar dos isolados foi determinada pela metodologia adaptada
177 de Hayward (20). O meio basal foi preparado adicionando-se, separadamente, as fontes de
178 carboidratos (celobiose, maltose e trealose) e os álcoois (manitol, dulcitol e inositol) e ajustado
179 para pH 7,0-7,1. Em placas do tipo *DeepWell* de 24 poços (Sarsted[®], North Rhine-Westphalia,
180 Alemanha) foram depositados 2 ml dos meios em cada poço, separadamente, e adicionados 10
181 µl de suspensão dos isolados (1×10^8 UFC.ml⁻¹). As placas foram incubadas a 28°C e avaliadas
182 aos 3, 5, 7 e 14 dias, quanto a utilização das fontes de energia, pela mudança de coloração de
183 verde para amarelo.

184 **Teste de patogenicidade e virulência.** Todos os isolados de *Ralstonia* spp. foram
185 inoculados em tomateiro híbrido F1 TY-2006 (Semini[®]; São Paulo, Brasil), suscetível à
186 murcha bacteriana e o mais cultivado no estado de Pernambuco. Foram utilizadas plantas com
187 30 dias de idade, previamente semeadas em substrato orgânico vegetal Basaplant[®] e
188 transplantadas com 15 dias após o semeio para vasos plásticos de 500 ml, contendo solo: húmus
189 (3:1). A inoculação foi realizada pelo método de fermento de raízes no solo em semicírculo
190 com deposição de 15 ml da suspensão bacteriana (14). Os isolados foram cultivados em meio
191 TZC (48 h, 30°C) (22) e as suspensões bacterianas preparadas em água e ajustadas em

192 espectrofotômetro (modelo 500M; Analyser, São Paulo, Brasil) para 1×10^8 UFC.ml⁻¹. As
193 plantas foram avaliadas durante 15 dias e as bactérias foram reisoladas em meio TZC, a fim de
194 completar os Postulados de Koch. Foram inoculadas 10 plantas/isolado e avaliados o período
195 de incubação (tempo em dias) entre a inoculação e o surgimento dos primeiros sintomas); a
196 incidência da doença, porcentagem de plantas com murcha; e a severidade da doença, obtida
197 por escala descritiva de Nielsen e Haynes (30) que varia de 1 a 5, onde: 1 = plantas sem sintoma,
198 2 = plantas com 1/3 de folhas murchas, 3 = plantas com 2/3 de folhas murchas, 4 = planta
199 murcha e 5 = planta morta.

200 O experimento foi realizado em casa de vegetação, em delineamento inteiramente
201 casualizado (DIC) com quatro repetições de três plantas cada. As médias das variáveis de cada
202 isolado foram submetidas a análise de variância e comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P \leq$
203 0,05) no Sisvar versão 5.3. Posteriormente, comparou-se a variabilidade entre os agrupamentos
204 de cada variável relacionando-os quanto à espécie, hospedeiro, origem, biovar e sequevar.

205

206 **Resultados**

207 **Isolados bacterianos e Filotipagem.** Foram obtidos 80 isolados de *Ralstonia* spp.
208 provenientes de tomateiro e berinjaleira, com sintomas típicos de murcha bacteriana, coletados
209 no semiárido do estado de Pernambuco, Brasil. Nos Municípios de Lagoa Grande e Santa Maria
210 da Boa Vista (mesorregião São Francisco), São José do Belmonte e Cedro (mesorregião Sertão)
211 não foram obtidos isolados de *Ralstonia* spp. Adicionalmente, foram utilizados 28 isolados de
212 tomateiro, berinjaleira, jiloeiro e pimentão da mesorregião Agreste, pertencentes à Coleção de
213 Culturas CRM e identificados a nível de filotipo (42), totalizando 108 isolados (Tabela 1).

214 No semiárido, aproximadamente 38,9%, 54,6% e 6,5% dos isolados de *Ralstonia* spp.,
215 respectivamente, foram provenientes das mesorregiões Agreste, São Francisco e Sertão (Tabela
216 1, Fig. 1). Todos os isolados amplificaram o fragmento de 280 pb específico para o complexo
217 de espécies *R. solanacearum*; 50,0% dos isolados foram identificados como filotipo I que
218 corresponde a *R. pseudosolanacearum* pela amplificação do fragmento de 144 pb com os
219 *primers* da série Nmult e os demais isolados como filotipo II, correspondendo a *R.*
220 *solanacearum* pela amplificação do fragmento de 372 pb. Houve prevalência de *R.*
221 *pseudosolanacearum* no Agreste (78,6%) e *R. solanacearum* no São Francisco (67,8%) e Sertão
222 (71,4%). Neste trabalho será adotada a denominação *R. pseudosolanacearum*, referindo-se aos

223 isolados do filotipo I e *R. solanacearum*, aos isolados do filotipo II, seguindo a atual taxonomia
224 de *Ralstonia* spp. (38).

225 No sertão, foram identificados dois isolados de *R. pseudosolanacearum* e cinco de *R.*
226 *solanacearum*, no entanto, devido a dificuldades técnicas apenas um isolado de *R.*
227 *solanacearum* foi incluído no estudo de diversidade quanto às sequevares.

228 **Análises filogenéticas dos genes *egl* e *mutS* e determinação da sequevar.** A análise de
229 rede de haplótipos do gene *egl* de 102 isolados caracterizou dois haplótipos na população de *R.*
230 *pseudosolanacearum*, os quais foram representados por 65,4% (haplótipo 1) e 34,6% (haplótipo
231 2) dos isolados; e cinco haplótipos em *R. solanacearum* (haplótipos 1 a 5), onde o haplótipo 1
232 compreendeu 82% dos isolados desta espécie, enquanto os demais haplótipos consistiram de
233 um a quatro isolados, cada.

234 A reconstrução filogenética dos isolados de *Ralstonia* spp. e a determinação da sequevar foi
235 baseada nas sequências parciais do gene *egl*, utilizando sequências de referência de todas as
236 sequevares depositadas no Genbank. As árvores de *egl* foram analisadas com as sequências
237 parciais de 102 isolados sequenciados, no entanto, estão representados graficamente apenas os
238 24 isolados representativos dos sete haplótipos caracterizados em *Ralstonia* spp. As árvores de
239 *egl*, determinadas por Neighbor-Joining, máxima verossimilhança e inferência bayesiana,
240 apresentaram topologias e relacionamentos filogenéticos congruentes, sendo apresentada a
241 árvore de Neighbor-Joining (Fig. 2).

242 Os isolados de *R. pseudosolanacearum* foram separados em dois clusters no filotipo I, clado
243 1, equivalentes aos haplótipos 1 e 2, que foram relacionados às sequevares I-18 (n = 34) e I-17
244 (n = 18), respectivamente. Os isolados de *R. solanacearum* foram relacionados ao filotipo IIA,
245 clado 2 e identificados como: (i) sequevar IIA-50: CRMRs120 (haplótipo 2), CRMRs104,
246 CRMRs105, CRMRs210 e CRMRs211 (haplótipo 3) e os isolados do haplótipo 1 (n = 41); (ii)
247 sequevar IIA- 58, CRMRs91 e CRMRs93 (haplótipo 4); e (iii) sequevar IIA-59, CRMRs121 e
248 CRMRs223 (haplótipo 5) (Tabela 1, Fig. 2).

249 Isolados (n = 24) representativos dos haplótipos de *R. pseudosolanacearum* e *R.*
250 *solanacearum* spp. foram utilizados para sequenciamento parcial do gene *mutS* a fim de dar
251 maior suporte na determinação das sequevares. Este conjunto de isolados foi constituído de
252 cinco isolados de cada haplótipo (1 e 2) de *R. pseudosolanacearum* e do haplótipo 1 de *R.*
253 *solanacearum*, e todos os isolados (n = 1 - 4) dos haplótipos 2, 3, 4 e 5 de *R. solanacearum*
254 (Tabela 1, Fig. 3). As árvores de *egl* e *mutS* apresentaram diferenças na topologia, sendo o

255 filotipo III mais proximamente relacionado aos filotipos II e I, respectivamente. A análise
256 filogenética do gene *mutS* revelou incongruência na determinação das sequevares dos isolados
257 de *Ralstonia* spp. (Fig. 2 e 3). De forma geral, o relacionamento entre os isolados de cada
258 haplótipo se manteve na árvore de *mutS* (Fig. 5), contudo, relacionando-os mais proximamente
259 a outras sequevares de referência.

260 **Distribuição das sequevares.** A distribuição das sequevares de *Ralstonia* spp. nas
261 mesorregiões do estado de Pernambuco reflete a diversidade destas fitobactérias. Na
262 mesorregião Agreste foram detectadas as sequevares I-18, IIA-50 (haplótipos 1 e 3), IIA-58 e
263 IIA-59; em São Francisco I-17, I-18, IIA-50 (haplótipos 1 e 2) e IIA-59; e no Sertão IIA-50
264 (haplótipo 1). Houve prevalência da sequevar I-18 no Agreste (73,6%) e da sequevar IIA-50
265 (haplótipo 1) no São Francisco (67,8%), onde I-17 também foi expressiva (30,5%). Na
266 mesorregião Sertão, o único isolado caracterizado foi sequevar IIA-50 (haplótipo 1) (Fig. 1).

267 **Determinação da biovar.** Os isolados de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* foram
268 caracterizados pelo perfil de utilização de álcoois e carboidratos, como biovars 3 (50%) e 1
269 (50%), respectivamente. Houve prevalência da biovar 3 no Agreste (78,6%) e biovar 1 no São
270 Francisco (67,8%) e Sertão (71,4%) (Fig. 1).

271 **Patogenicidade e virulência dos isolados.** Todos os isolados de *R. pseudosolanacearum* e
272 *R. solanacearum* induziram sintomas de murcha bacteriana em tomateiro Híbrido F1 TY-2006.
273 Os primeiros sintomas da doença foram observados aos cinco dias após a inoculação. Cerca de
274 82% dos isolados causaram sintoma de murcha e/ou morte das plantas e os demais isolados,
275 incluindo os dois isolados de *R. pseudosolanacearum* e um isolado de *R. solanacearum* da
276 mesorregião Sertão, provocaram infecção latente, causando apenas escurecimento dos vasos
277 xilemáticos. A severidade final variou de 1 (planta sem murcha) a 5 (planta morta) nas duas
278 espécies de *Ralstonia*. Nas três variáveis analisadas (período de incubação, incidência e
279 severidade da doença), foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os isolados,
280 que formaram quatro grupos, pelo Teste de Scott-Knott (dados não apresentados). Todos os
281 isolados inoculados foram reisolados em meio TZC. A variabilidade na virulência dos isolados
282 não foi relacionada a espécie, hospedeiro, origem, biovar e/ou sequevar.

283

284 **Discussão**

285 A prevalência de *R. pseudosolanacearum* na mesorregião do Agreste (78,6%), comparada
286 às espécies predominantes de *Ralstonia* spp. em cada mesorregião, pode ser justificada pelo

287 fato dos isolados do filotipo I competirem mais efetivamente com isolados de outros filotipos.
288 Isolados do filotipo I são mais versáteis quimicamente e consomem ampla gama de compostos
289 (20,42), possuem habilidade de infectar múltiplos hospedeiros (19,48), alta capacidade de
290 recombinação (9) e grande plasticidade de virulência (48), o que favorece a colonização e
291 estabelecimento desta espécie no ambiente. Comprovando a versatilidade química, os isolados
292 de *R. pseudosolanacearum* foram todos caracterizados como biovar 3. Por outro lado, a
293 prevalência de *R. solanacearum* na mesorregião São Francisco (67,8%) pode estar relacionada
294 a origem do filotipo II, nativo do Brasil (48); ou a recente introdução do filotipo I no Brasil, o
295 que não permitiu sua dispersão e estabelecimento em todos os municípios produtores da
296 mesorregião São Francisco.

297 Acredita-se que a introdução de *R. pseudosolanacearum* filotipo I no Brasil possa ter
298 ocorrido durante o período da imigração asiática e o estabelecimento de colônias japonesas no
299 país, inclusive em Pernambuco, através de sementes infectadas (15) e que a bactéria se
300 estabeleceu ao encontrar condições propícias. A transmissão de *Ralstonia* spp. por sementes é
301 relatada em berinjela (41) e amendoim (27) e a principal via de disseminação de *R.*
302 *pseudosolanacearum* (filotipo I) por longas distâncias tem sido atribuída a materiais vegetais
303 com infecção latente (48). A ocorrência de *R. pseudosolanacearum* em áreas influenciadas pelo
304 clima semiárido agrega informações importantes com relação ao seu estabelecimento no
305 ambiente, já que o filotipo I tem apresentado aptidão para se estabelecer em condições tropicais,
306 sendo relatado na Ásia, África, Oceania e Américas Central e do Sul (4,11).

307 A estimativa de diversidade genética dos isolados de *Ralstonia* spp. tem sido determinada
308 pelo número e distribuição das sequevares que ocorrem em uma determinada região e/ou
309 hospedeiro. Sequevares têm sido utilizadas em diversos trabalhos de diversidade desse
310 fitopatógeno (5,24,25,40,44), mesmo após a reclassificação do complexo de espécies *R.*
311 *solanacearum* em três espécies independentes por Safni et al. (38). As sequevares têm sido
312 determinadas por análises filogenéticas do gene *egl*, visto que o mesmo é congruente com a
313 filogenia organismal de *Ralstonia* spp., determinada por estudos de hibridização por
314 microarranjos do DNA pangenômico (17). Desta forma, o relacionamento filogenético do gene
315 *egl* foi eficiente na determinação das sequevares dos isolados brasileiros de *Ralstonia* spp.,
316 como verificado anteriormente (2,3,7,12,13,40,47). Por outro lado, a análise filogenética do
317 gene *mutS* foi eficiente em revelar o relacionamento entre os isolados estudados, apesar de
318 apresentar incongruência na determinação das sequevares. O gene *mutS* relaciona

319 coerentemente a proximidade entre os filotipos I e III (47), que juntos constituem *R.*
320 *pseudosolanacearum* (38).

321 A elevada diversidade de *Ralstonia* spp. no Agreste e São Francisco foi evidenciada pela
322 presença de quatro sequevares em cada mesorregião, onde *R. pseudosolanacearum* foi mais
323 diversa no São Francisco pela ocorrência das sequevares I-17 e I-18 em comparação ao Agreste
324 (I-18). Já *R. solanacearum* apresentou mesmo número de sequevares nestas mesorregiões,
325 repetindo as sequevares IIA-50 e IIA-59 e diferindo pela presença da sequevar IIA-58 no
326 Agreste. Além disso, os isolados de *R. pseudosolanacearum* foram oriundos de diferentes
327 solanáceas (berinjoleira, jiloeiro, pimentão e tomateiro), enquanto os de *R. solanacearum*
328 apenas de tomateiro.

329 A mesorregião São Francisco é conhecida como polo da fruticultura nacional, mas também
330 cultiva hortaliças, dentre as quais destaca-se a produção de tomate. Conhecer a diversidade de
331 *Ralstonia* spp. nesta mesorregião é importante, visto que neste local são realizados a maioria
332 dos ensaios de seleção e melhoramento genético para resistência a murcha bacteriana, em
333 tomateiro, desenvolvidos pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), para o estado de
334 Pernambuco. Similarmente, a análise da diversidade genética de isolados de *Ralstonia* spp.
335 oriundos de solanáceas, sésamo (*Sesamum indicum*) e amaranto (*Amaranthus* spp.), de acordo
336 com a ocorrência de sequevares em cinco zonas agroecológicas de Camarões, foi realizada para
337 dar suporte ao programa de melhoramento de pimentão no país (47).

338 Na mesorregião Sertão obteve-se o menor número de isolados, pela baixa prevalência da
339 doença nas áreas de produção, sendo dois isolados de *R. pseudosolanacearum* (filotipo I) e
340 cinco de *R. solanacearum* (filotipo II), provenientes do município de Mirandiba. Apenas o
341 isolado CRMRS239 (*R. solanacearum*, tomateiro) foi identificado ao nível de sequevar,
342 caracterizado como IIA-50 (haplótipo 1). Nesta mesorregião cultiva-se principalmente
343 tomateiro, sendo esta mesorregião a que menos favorece a ocorrência da murcha bacteriana
344 pela limitação de água para irrigação.

345 A diversidade de *R. pseudosolanacearum*, em termos quantitativos de sequevares é
346 relativamente baixa no Brasil, quando comparada ao número total de sequevares do filotipo I
347 (n = 14). A existência de apenas um haplótipo nas sequevares I-17 e I-18, caracteriza as
348 populações de *R. pseudosolanacearum* como clonais em Pernambuco. A baixa diversidade do
349 filotipo I também foi verificada por (42) que a atribuiu a um único e recente evento de
350 introdução desta fitobactéria no Nordeste brasileiro. Ambas as sequevares I-17 e I-18

351 apresentam ampla gama de hospedeiros dentre as solanáceas e outras culturas, a exemplo da
352 brassicácea rúcula (I-18), no Agreste Pernambucano (3). *R. pseudosolanacearum* apresenta
353 uma relação interessante no semiárido de Pernambuco. A sequevar I-18, amplamente
354 disseminada no Brasil (40) e na mesorregião Agreste de Pernambuco foi apenas detectada em
355 apenas um isolado (CRMRS147) na mesorregião São Francisco. Já a sequevar I-17 detectada
356 apenas em três isolados no Agreste de Pernambuco (42), na presente pesquisa concentrou-se no
357 município de Belém do São Francisco, indicando adaptação à mesorregião São Francisco.
358 Sugere-se que a sequevar I-17 no Brasil, seja endêmica em Pernambuco.

359 A presença da sequevar IIA-50 nas três mesorregiões do semiárido de Pernambuco sem
360 limitação climática, demonstra a ampla distribuição desta sequevar no estado e reforça a
361 proposição de Santiago et al. (40) que a mesma seja originária do Brasil. Isso pode ser explicado
362 por diversos motivos: (i) a ocorrência de isolados IIA-50 em áreas recém-desmatadas, quando
363 realizado primeiro cultivo de tomateiro, na mesorregião Agreste, Pernambuco; (ii) maior
364 distribuição da sequevar IIA-50 no Brasil, sendo verificados 22 haplótipos em solanáceas em
365 todas as regiões brasileiras e em eucalipto nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (40);
366 e (iii) relato desta sequevar apenas em um isolado de tomateiro (T1-UY) no Uruguai (6).

367 As sequevares IIA-58 e IIA-59 reportadas por Silva (J. R. Silva, comunicação pessoal, fev
368 2017) em tomateiro em Pernambuco e em pepineiro (IIA-59) no estado do Amazonas, não
369 foram identificadas por outros autores (36, 40), em populações amostradas em todo o território
370 brasileiro, que detectaram (em solanáceas) diversas sequevares (I-18, IIA-41, IIA-50, IIB-2,
371 IIB-25, IIB-28, IIB-54, IIB-55, IIB-56 e IIB-57). Isso indica o caráter endêmico destas
372 sequevares, sobretudo da sequevar IIA-58, possivelmente ocorrendo apenas no Agreste de
373 Pernambuco. A ocorrência da sequevar IIA-59 (CRMRS121 e CRMRS223), detectada também
374 na mesorregião do São Francisco de Pernambuco, implica em vários desdobramentos: (i)
375 expande a distribuição da sequevar IIA-59 nas mesorregiões de clima semiárido; (ii)
376 possivelmente relaciona a sequevar IIA-58 ao clima semiárido, sendo endêmica da região; (iii)
377 associa estas sequevares ao tomateiro; (iv) aumenta a diversidade de isolados de *R*
378 *solanacearum* do filotipo IIA, de solanáceas no Brasil; e (v) reitera o país como centro de
379 diversidade e não apenas centro de origem de *R. solanacearum*, conforme mencionado por
380 Wicker et al. (48).

381 A ocorrência de sequevares limitadas a mesorregiões do estado de Pernambuco,
382 principalmente I-17 e IIA-58 revela a importância da adoção de medidas preventivas de

383 controle da murcha bacteriana. Muitos produtores de tomate do Agreste pernambucano ao fim
384 do período chuvoso nesta mesorregião, migram para áreas de cultivo no Sertão e na mesorregião
385 São Francisco. Nesse deslocamento, utilizam os mesmos implementos e máquinas agrícolas, e
386 a prática de desinfestação destes instrumentos reduziria a disseminação destas sequevares para
387 outras áreas de cultivo de Pernambuco e do Brasil.

388 Os isolados de *Ralstonia* spp. apresentaram alta diversidade quanto à virulência ao Híbrido
389 F1 TY-2006, principal tomateiro cultivado em Pernambuco, embora a mesma não tenha sido
390 relacionada à espécie, hospedeiro, origem, clima, biovar e sequevar. A variação quanto a
391 capacidade dos isolados de incitar infecção latente, verificada principalmente nos isolados do
392 Sertão, atribui-se possivelmente as condições climáticas mais severas dessa mesorregião. O
393 conhecimento da virulência desses isolados é importante nos estudos de epidemiologia e na
394 seleção de genótipos visando a resistência à murcha bacteriana.

395 Este é o primeiro trabalho que retrata a diversidade de *Ralstonia* spp. nas três mesorregiões
396 de Pernambuco influenciadas pelo clima semiárido do Brasil, sobretudo na mesorregião São
397 Francisco, pela presença de quatro sequevares (I-17, I-18, IIA-50 e II-59), revelando adaptação
398 da sequevar I-17 a esta mesorregião; registra a ocorrência de *Ralstonia* spp. no Sertão e a
399 presença da sequevar IIA-50; no Agreste, confirma as sequevares I-18, IIA-58 e IIA-59
400 relatadas por Silva (42; J. R. Silva, comunicação pessoal, fev 2017) e principalmente, amplia a
401 diversidade pela ocorrência da sequevar IIA-50, anteriormente não detectada em Pernambuco.
402 Os resultados apontam a possível influência do clima semiárido na ocorrência das sequevares
403 I-17 e IIA-58. Os resultados obtidos são fundamentais para esclarecer a diversidade de
404 *Ralstonia* spp. nestas mesorregiões, principais produtoras de tomate do estado de Pernambuco,
405 visando auxiliar nas medidas culturais de manejo da murcha bacteriana e no melhoramento
406 genético do tomateiro no estado de Pernambuco.

407

408 **Agradecimentos**

409 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela
410 concessão de bolsa de Doutorado a G. M. R. Albuquerque e bolsa de produtividade a R. L. R.
411 Mariano (Proc. 309697/2011-5). A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de
412 Pernambuco (FACEPE) pela concessão de bolsa de fixador de pesquisador a A. M. F. Silva
413 (Proc. 0082-5.01/15). Aos extensionistas, técnicos e engenheiros agrônomos do Instituto
414 Agrônomo de Pernambuco (IPA) de Belém do São Francisco, Petrolina e Salgueiro, da

415 Embrapa Semiárido e da Agência de Defesa Agropecuária de Pernambuco (ADAGRO) pela
416 colaboração nas visitas às áreas produtoras de solanáceas, nas mesorregiões São Francisco e
417 Sertão.

418

419 **Literatura citada**

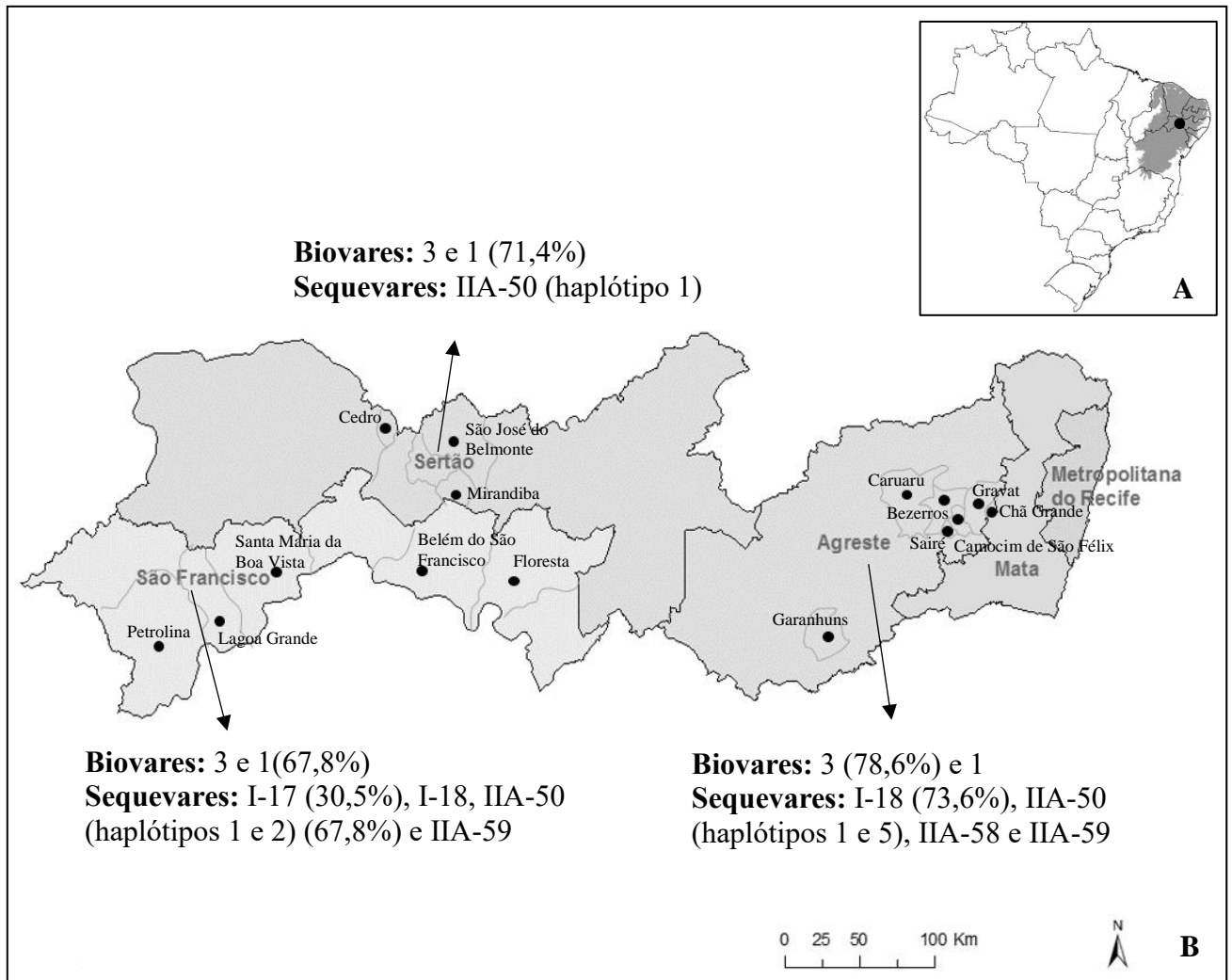
- 420 1. Ab' Saber, A. N. 1967. Os Domínios Morfoclimáticos e Províncias Fitogeográficas do
421 Brasil. 3 ed. USP, São Paulo.
- 422 2. Albuquerque, G. M. R., Santos, L. A., Felix, K. C. S., Rollemberg, C. L., Silva, A. M.
423 F., Souza, E. B., Cellier, G. Prior, P., and Mariano, R. L. R. 2014. Moko disease causing
424 strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic
425 phylotype II. *Phytopathology* 104:1175-82.
- 426 3. Albuquerque, G. M. R., Silva, A. M. F., Silva, J. R., Gama, M. A. S., and Mariano, R.
427 L. R. 2016. First Report of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia pseudosolanacearum*
428 on *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* in Brazil. *Plant Dis.* 100:2319.
- 429 4. Buddenhagen, I. W. 1986. Bacterial wilt revisited. Pages: 126-143 in: *Bacterial wilt*
430 *disease in Asia and the pacific*, vol. 1. G. J. Persley, ed. Aciar, Austrália.
- 431 5. Carstensen, G. D., Venter, S. N., Wingfield, M. J., and Coutinho, T. A. 2016. Two
432 *Ralstonia* species associated with bacterial wilt of *Eucalyptus*. *Plant Pathol.* Online:
433 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.12577/pdf>
- 434 6. Cellier, G., and Prior, P. 2010. Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia*
435 *solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology* 100:1250-1261.
- 436 7. Cook, D., and Sequeira, L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum*
437 by molecular genetic methods. Pages 77-93 in: *Bacterial Wilt: The Disease and Its*
438 *Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*, vol 1. A. C. Hayward and G. L.
439 Hartman, eds. CAB International, Wallingford.
- 440 8. Costa, S. B., Ferreira, M. A. S. V., and Lopes, C. A. 2007. Diversidade patogênica e
441 molecular de *Ralstonia solanacearum* da Região Amazônica brasileira. *Fitopatol. Bras.*
442 32:285-294.
- 443 9. Coupat, B., Chaumeille-Dole, F., Fall, S., Prior, P., Simonet, P., and Nesme, X. 2008.
444 Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and
445 size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66:14-24.

- 446 10. Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., and Posada, D. 2012. JModelTest 2: more
447 models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:772.
- 448 11. Elphinstone, J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. Pages:
449 9-28 in: *Bacterial Wilt Disease and The *Ralstonia solanacearum* Species Complex*, vol.
450 1. C. Allen, P. Prior and A. C. Hayward, eds. APS Press, St. Paul.
- 451 12. Fegan, M., and Prior, P. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species
452 complex cause bacterial wilt of banana. *Australas. Plant Pathol.* 35:93-101.
- 453 13. Fegan, M., and Prior, P., 2005. How complex is the '*Ralstonia solanacearum*
454 species complex'? Pages 449-461 in: *Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia**
455 *solanacearum* Species Complex, vol. 1. C. Allen, P. Prior and A.C. Hayward, eds. APS,
456 St Paul.
- 457 14. Felix, K. C. S., Souza, E. B., Michereff, S. J., and Mariano R. L. R. 2012. Survival of
458 *Ralstonia solanacearum* in infected tissues of *Capsicum annuum* and in soils of the
459 state of Pernambuco, Brazil. *Phytoparasitica* 40:53-62.
- 460 15. Garcia, A. L., Lima, W. G., Souza, E. B., Michereff, S. J., and Mariano, R. L. R. 2013.
461 Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt bell pepper in the
462 state Pernambuco, Brasil. *J. Plant Pathol.* 95:237-245.
- 463 16. Gillings, M. R., and Fahy, P. 1994. Genomic fingerprinting: Towards a unified view of
464 the *Pseudomonas solanacearum* species complex. Pages 95-112 in: *Bacterial Wilt: The*
465 *Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum**, vol. 1. A. C. Hayward
466 and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- 467 17. Guidot, A., Prior, P., Shoenfeld, J., Carrere, S., Genin, S., and Boucher, C. 2007.
468 Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*
469 inferred from gene distribution analysis. *J. Bacteriol.* 189:377-387.
- 470 18. Guindon, S., and Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate
471 large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 52:696-704.
- 472 19. Hayward, A. C. 1994a. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. Pages: 9-24 in:
473 *Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum**, vol.
474 1. A. C. Hayward, G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford.
- 475 20. Hayward, A. C. 1994b. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and
476 related bacteria. Pages: 123-135 in *Bacterial Wilt: The disease and its causative agent*,

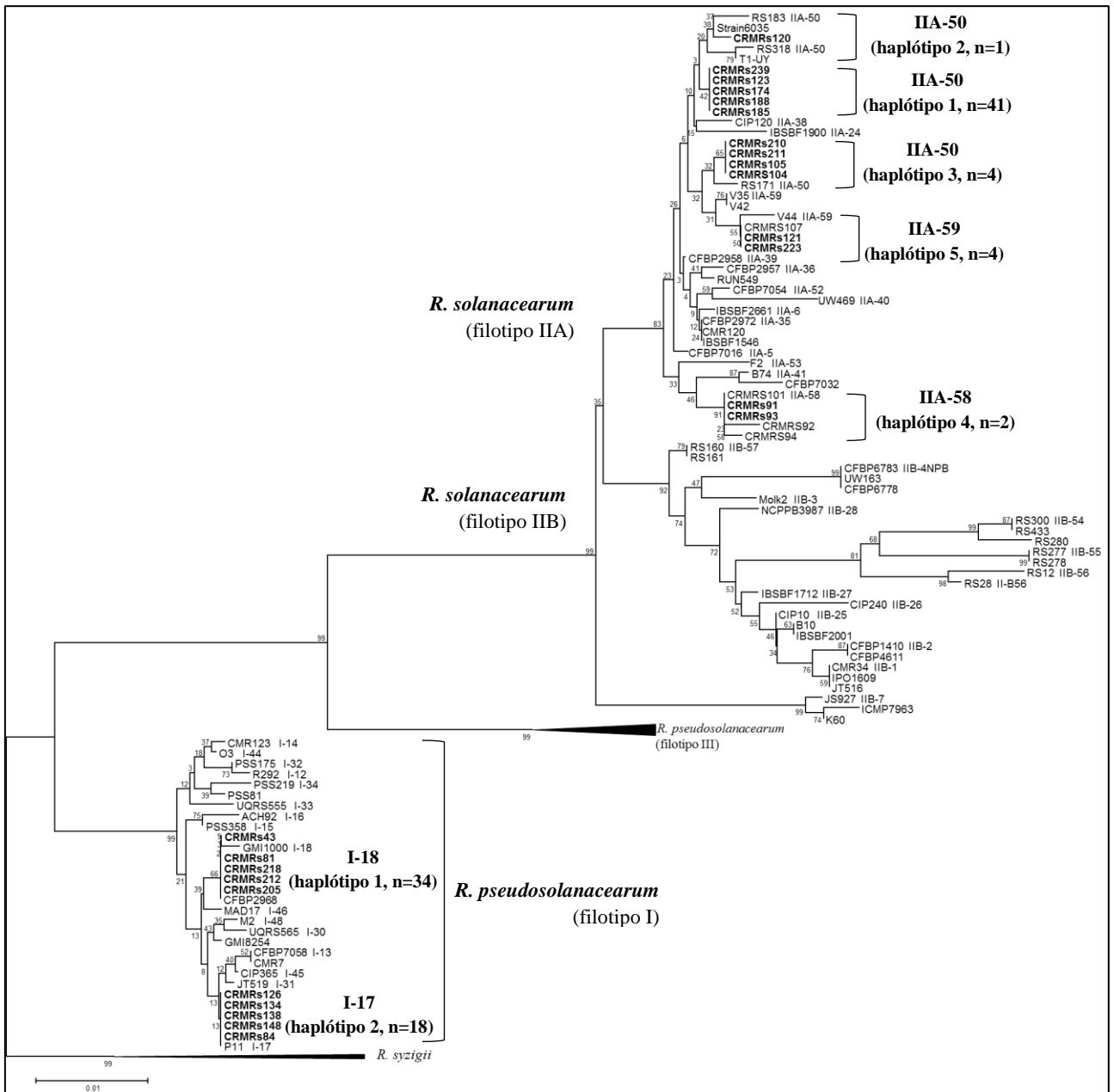
- 477 *Pseudomonas solanacearum*, vol. 1. C. Hayward, and G. L. Hartman, eds. CAB
478 International, Wallingford.
- 479 21. IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. Levantamento Sistemático
480 da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras
481 agrícolas no ano civil. IBGE 30:1-81.
- 482 22. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to
483 colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.
- 484 23. Kelman A., Hartman G. L., and Hayward A. C. 1994. Introduction. Pages 1-7 in:
485 Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*, vol.
486 1. A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- 487 24. Li, Y., Feng, J., Liu, H., Wang, L., Hsiang, T., Li, X., and Huang, J. 2016. Genetic
488 Diversity and Pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* Causing Tobacco Bacterial
489 Wilt in China. *Plant Dis.* 100:1288-1296.
- 490 25. Liu Y., Wu, D., Liu, Q., Zhang, S., Tang, Y., Jiang, G., Li, S., and Ding, W. 2017. The
491 sequevar distribution of *Ralstonia solanacearum* in tobacco-growing zones of China is
492 structured by elevation. *Eur J Plant Pathol* 147:541-551.
- 493 26. Lopes, C. A, and Duval, A. M. Q. 2007. Epidemiologia e controle das bacterioses das
494 hortaliças. Pages 115-162 in: Manejo Integrado de Doenças e Pragas: Hortaliças, vol.
495 1. L. Zambolim, C. A. Lopes, M. C. Picanço, e H. Costa, eds. Editora UFV, Viçosa.
- 496 27. Machmud, M., and Middleton, K. J. 1991. Transmission of *Pseudomonas*
497 *solanacearum* through groundnut seeds. *Bacterial Wilt Newsletter* 7:4-5.
- 498 28. MIN-Ministério da Integração Nacional. 2005. Nova Delimitação do Semi-Árido
499 Brasileiro. Online:
500 [http://www.mi.gov.br/c/document_library/get_file?uuid=0aa2b9b5-aa4d-4b55-a6e1-](http://www.mi.gov.br/c/document_library/get_file?uuid=0aa2b9b5-aa4d-4b55-a6e1-82faf0762763&groupId=24915)
501 [82faf0762763&groupId=24915](http://www.mi.gov.br/c/document_library/get_file?uuid=0aa2b9b5-aa4d-4b55-a6e1-82faf0762763&groupId=24915).
- 502 29. Moura, G. B. M, Santos, E. M. S., and Brunken, H. 2014. Atlas da Herpetofauna do
503 Estado de Pernambuco. Online: <http://herpetofauna.biodiversidade-pe.com>.
- 504 30. Nielsen, L. W., and Haynes, F. L. 1960. Resistance in *Solanum tuberosum* to
505 *Pseudomonas solanacearum*. *Am. Potato J.* 37:260-267.
- 506 31. Opina, N., Tavner, F., Holloway, G., and Timmis, J. N. 1997. A novel method for
507 development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for

- 508 identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia-
509 Pac. J. Mol. Biol. 5:19-33.
- 510 32. Posada, D. 2003. Using ModelTest and PAUP* to select a model of nucleotide
511 substitution. Pages 6.5.1-6.5.14 in: Current Protocols in Bioinformatics, vol. 1. A. D.
512 Baxevanis, D. B. Davison, R. D. M. Page, G. A. Petsko, L. D. Stein, and G. D. Stormo,
513 eds. John Wiley & Sons, Inc.
- 514 33. Posada, D. 2008. J Model Test: phylogenetic model averaging. Mol. Ecol. Notes 6:288-
515 295.
- 516 34. Poussier, S., Trigalet-Demery D., Vanderwalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J. and
517 Trigalet, A. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR R-
518 RFLP of the 474 *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and
519 identification of an African subdivision. Microbiology 146:1679-1692.
- 520 35. Prior, P., Ailloud, F., Dalsing, B. L., Remenant, B., Sanchez, B., and Allen, C., 2016.
521 Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen
522 *Ralstonia solanacearum* into three species. BMC Genomics 17:90-81.
- 523 36. Rodrigues, L. M. R., Destefano, S. A. L., Silva, M. J., Costa, G. G. L, and Maringoni,
524 A. C. 2012. Characterization of *Ralstonia solanacearum* from Brazil using molecular
525 methods and pathogenicity tests. J. Plant Pathol. 94:505-16.
- 526 37. Ronquist, F., and Huelsenbeck J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference
527 under mixed models. Bioinformatics 19:1572-1574.
- 528 38. Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., and Kappler, U. 2014.
529 Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species
530 complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia*
531 *solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii*
532 strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum*
533 phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp.
534 nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii*
535 subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and
536 III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Micr. 64:3087-
537 103.
- 538 39. Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for
539 reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.

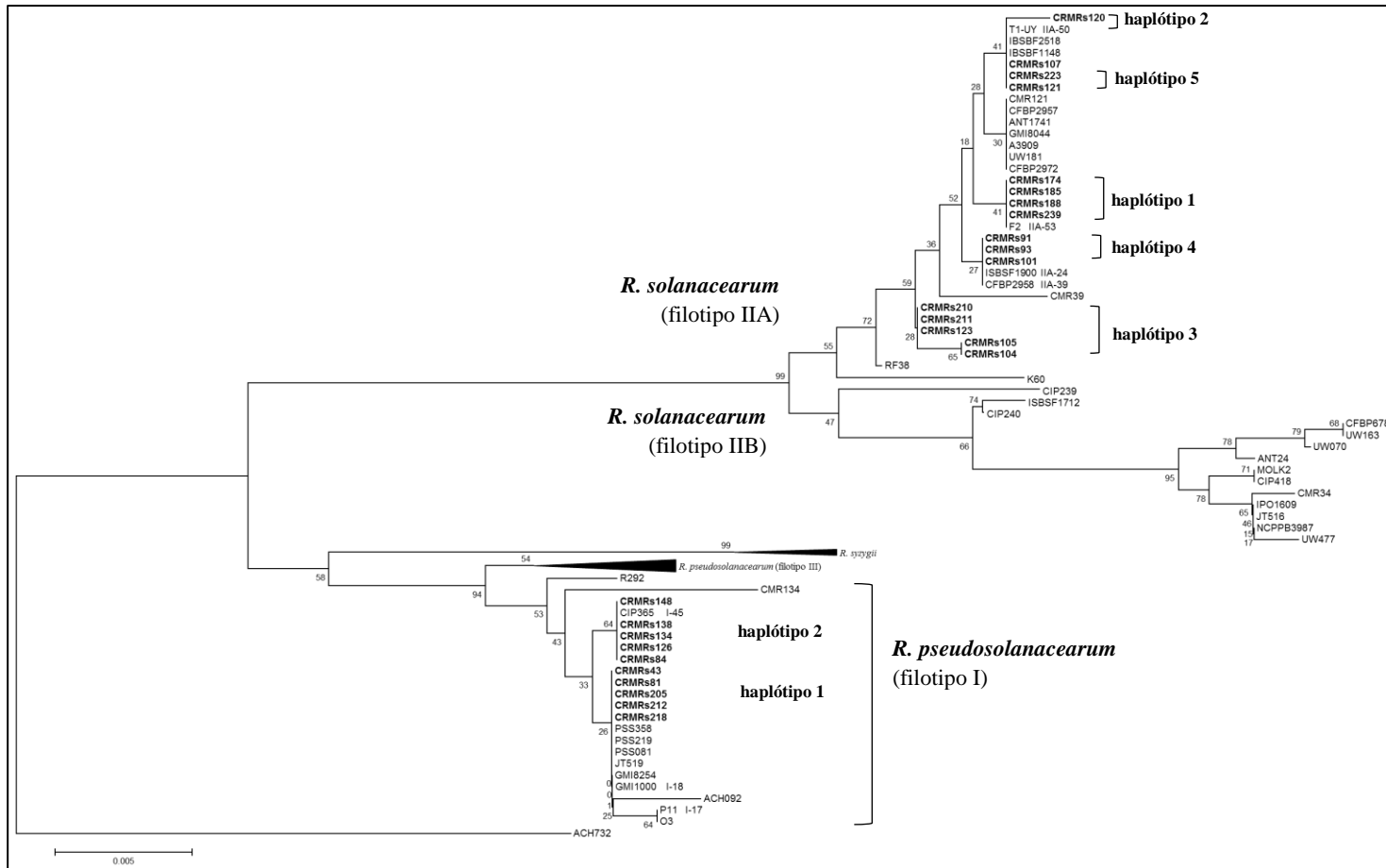
- 540 40. Santiago, T. R., Lopes, C. A., Caetano-Anolles, G. and Mizubuti, E. S. G. 2016.
541 Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient
542 centre of diversity of the pathogen. Plant Pathol. Online:
543 <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12586>.
- 544 41. Sharma, N. and Sharma, D. K. 2014. Incidence and Seed Transmission of *Ralstonia*
545 *solanacearum* (Smith) in Brinjal (*Solanum melongena* L.) Seeds. Int. J. Plant Pathol.
546 5:63-69.
- 547 42. Silva, J. R. 2014. Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões Norte
548 e Nordeste do Brasil. 48f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade
549 Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.
- 550 43. Staden, R., Beal, K. F., and Bonfield, J. K. 1998. The Staden package. Pages: 115-130
551 in: Bioinformatics methods and protocols, vol. 1. S. Misener, and S. A. Krawetz, eds.
552 Humana, New York.
- 553 44. Stulberg, M. J., and Huang, Q. 2016. A computer program for fast and easy typing of
554 a partial endoglucanase gene sequence into genospecies and sequevars 1 & 2 of the
555 *Ralstonia solanacearum* species complex. J. Microbiol. Meth. 123:101-107.
- 556 45. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011.
557 MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,
558 evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and
559 Evolution, 28: 2731-2739.
- 560 46. Tompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: Improving the
561 sensivity of multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific
562 gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680.
- 563 47. Toukam, G. M. S., Cellier, G., Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C., and
564 Prior, P. 2009. Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. Plant
565 Dis. 93:1123-1130.
- 566 48. Wicker, E., Lefeuvre, P., de Cambiaire, J. C., Lemaire, C., Poussier, S., and Prior, P.
567 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant
568 pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. The ISME Journal 6:961-74.
- 569 49. Zhang, Y., and Qiu, S., 2016. Phylogenomic analysis of the genus *Ralstonia* based on
570 686 single-copy genes. Antonie Van Leeuwenhoek 109:71-82.



571 **Fig. 1.** Murcha bacteriana nas mesorregiões do clima semiárido (Agreste, São Francisco e Sertão) do
 572 estado de Pernambuco, região Nordeste, Brasil. Em A, representação do clima semiárido na região
 573 Nordeste, Brasil; e B, distribuição das sequevars e biovars de *Ralstonia* spp. Estimativa dos isolados
 574 (%) de cada mesorregião do total de isolados analisados (n = 108).



575 **Fig. 2.** Reconstrução filogenética baseada nas sequências parciais do gene da endoglucanase (*egl*)
 576 de haplótipos de *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* causadores de murcha
 577 bacteriana em solanáceas no semiárido do estado de Pernambuco, Brasil, pelo método de Neighbor-
 578 Joining e o modelo de substituição de nucleotídeos Jukes e Cantor. 2000 bootstrap.



579 **Fig. 3.** Reconstrução filogenética baseada nas sequências parciais do gene de reparo do DNA (*mutS*) de haplótipos de
 580 *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* causadores de murcha bacteriana em solanáceas no semiárido do
 581 estado de Pernambuco, Brasil, pelo método de Neighbor-Joining e o modelo de substituição de nucleotídeos Jukes e
 582 Cantor. 2000 bootstrap.

583 **Tabela 1.** Isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* provenientes do semiárido do estado de Pernambuco, região Nordeste
 584 do Brasil

Isolado	Espécie	Mesorregião	Município	Hospedeiro	Biovar	Haplótipo	Sequevar^a
CRMRS216	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Berinjoleira	3	1	I-18
CRMRS217	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Berinjoleira	3	1	I-18
CRMRS218	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Berinjoleira	3	1	I-18
CRMRS219	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Berinjoleira	3	1	I-18
CRMRS220	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Berinjoleira	3	1	I-18
CRMRS221	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Berinjoleira	3	1	I-18
CRMRS30	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Bezerros	Pimentão	3	1	I-18
CRMRS36	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Garanhuns	Pimentão	3	1	I-18
CRMRS41	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Caruaru	Pimentão	3	1	I-18
CRMRS43	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Caruaru	Pimentão	3	1	I-18
CRMRS46	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Sairé	Pimentão	3	1	I-18
CRMRS47	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Sairé	Pimentão	3	1	I-18
CRMRS89	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	3	1	I-18
CRMRS102	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	3	1	I-18
CRMRS108	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	3	1	I-18
CRMRS115	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Gravatá	Tomateiro	3	1	I-18
CRMRS116	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Gravatá	Tomateiro	3	1	I-18

CRMRs118	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Gravatá	Tomateiro	3	1	I-18
CRMRs119	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Gravatá	Tomateiro	3	1	I-18
CRMRs202	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Gravatá	Tomateiro	3	1	I-18
CRMRs205	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Gravatá	Tomateiro	3	1	I-18
CRMRs212	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	3	1	I-18
CRMRs58	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Chã Grande	Berinjoleira	3	1	I-18
CRMRs64	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Chã Grande	Berinjoleira	3	1	I-18
CRMRs66	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Chã Grande	Berinjoleira	3	1	I-18
CRMRs68	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Chã Grande	Berinjoleira	3	1	I-18
CRMRs72	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Chã Grande	Berinjoleira	3	1	I-18
CRMRs73	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Chã Grande	Berinjoleira	3	1	I-18
CRMRs81	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Chã Grande	Jiloeiro	3	1	I-18
CRMRs28	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Chã Grande	Pimentão	3	1	I-18
CRMRs31	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Chã Grande	Pimentão	3	1	I-18
CRMRs32	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Chã Grande	Pimentão	3	1	I-18
CRMRs35	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Chã Grande	Pimentão	3	1	I-18
CRMRs147	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	1	I-18
CRMRs125	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRs126	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRs128	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRs130	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17

CRMRS131	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS132	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS134	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS135	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS136	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS138	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS139	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS140	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS143	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS145	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS148	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS150	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS151	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS158	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Floresta	Tomateiro	3	2	I-17
CRMRS245	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Sertão	Mirandiba	Tomateiro	3	I-ND
CRMRS246	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Sertão	Mirandiba	Tomateiro	3	I-ND
CRMRS204	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Gravatá	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRS91	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	1	4	IIA-58
CRMRS93	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	1	4	IIA-58
CRMRS223	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Bezerras	Tomateiro	1	5	IIA-59
CRMRS104	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	1	3	IIA-50

CRMRs105	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	1	3	IIA-50
CRMRs210	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	1	3	IIA-50
CRMRs211	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	1	3	IIA-50
CRMRs50	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Chã Grande	Pimentão	1	1	IIA-50
CRMRs122	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs123	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs129	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs142	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs159	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs160	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs161	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs163	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs165	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs168	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs169	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs170	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs171	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs174	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs175	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs177	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs178	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50

CRMRs179	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs180	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs181	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs182	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs183	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs184	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs185	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs186	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs187	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs188	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs189	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs190	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs192	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs193	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs194	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs195	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs196	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs197	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs198	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs199	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs256	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	1	IIA-50

CRMRs120	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	1	2	IIA-50
CRMRs121	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Belém de S. Francisco	Tomateiro	1	5	IIA-59
CRMRs239	<i>R. solanacearum</i>	Sertão	Mirandiba	Tomateiro	1	1	IIA-50
CRMRs236	<i>R. solanacearum</i>	Sertão	Mirandiba	Tomateiro	1	II-ND
CRMRs237	<i>R. solanacearum</i>	Sertão	Mirandiba	Tomateiro	1	II-ND
CRMRs244	<i>R. solanacearum</i>	Sertão	Mirandiba	Tomateiro	1	II-ND
CRMRs250	<i>R. solanacearum</i>	Sertão	Mirandiba	Tomateiro	1	II-ND

585 ^aSequevares determinadas pelo relacionamento filogenético de sequências parciais do gene *egl* dos isolados de *Ralstonia* spp. do
586 semiárido de Pernambuco, Região Nordeste, Brasil e isolados de referência do Genbank. ND – sequevar não determinada.

587 **Tabela 2.** Isolados de *Ralstonia* spp. de referência (Genbank) utilizados neste estudo

Isolado	Hospedeiro	Origem	Filotipo	Sequevar	<i>egl</i> Genbank	<i>mutS</i> Genbank
ACH732	Tomate	Austrália	IV	11	GQ907150	AY756743
ACH92	Gengibre	Austrália	I	16	AF295254	AY756764
B10	Banana	Brasil	IIB	25	KF889434	KF896798
B74	Plátano	Brasil	IIA	41	KF875404	KF896773
CFBP1410	Banana	Colômbia	IIB	2	GU294936	ND
CFBP2957	Tomate	Martinica	IIA	36	AF295265	EF371845
CFBP2958	Tomate	Guadalupe	IIA	39	AF295266	AY756806
CFBP2968	Beringela	Guadalupe	I	18	EF371806	ND
CFBP2972	Batata	Martinica	IIA	35	AF295264	AY756807
CFBP3059	Beringela	Burkina Faso	III	28	AF295270	AY756766
CFBP4611	Batata	Colômbia	IIB	2	GU294981	ND
CFBP6778	Tomate	Martinica	IIB	4NPB	EF371816	EF371851
CFBP6783	Helicônia	Martinica	IIB	4NPB	EF371852	EF371852
CFBP7016	Anntúrio	Martinica	IIA	5	EF371826	EF371860
CFBP7032	Tomate	Camarões	IIA	41	EF439726	EF439803
CFBP7054	Tomate	Camarões	IIA	52	EF439725	EF439800
CFBP7058	Huckleberry	Camarões	I	13	EF439740	EF439794
CIP10	Batata	Peru	IIB	25	AF295260	AY756821
CIP120	Batata	Peru	IIA	38	GQ907152	AY756774

CIP240	Batata	Brasil	IIB	26	EF647739	JF702714
CIP365	Batata	Filipinas	I	45	GQ907151	AY756787
CMR123	Tomate	Camarões	I	14	EF439737.1	JF702805
CMR15	Tomate	Camarões	III	29	EF439743	JF702729
CMR32	Huckleberry	Camarões	III	29	EF439749	EF439773
CMR34	Tomate	Camarões	IIB	1	EF439750	EF439810
CMR7	Tomate	Camarões	I	13	EF439765.1	JF702730
CMR120	Tomate	Camarões	IIA	35	EF439736.1	JF702731
CRMRS101	Tomate	Brasil	IIA	58	ND	ND
CRMRS107	Tomate	Brasil	IIA	59	ND	ND
CRMRS92	Tomate	Brasil	IIA	28	ND	ND
CRMRS94	Tomate	Brasil	IIA	58	ND	ND
F2	Banana	Brasil	IIA	53	KF875426	KF896801
GMI1000	Tomate	Guiana Francesa	I	18	AF295251	AY756804
GMI8254	Tomate	Indonésia	I	47	GU295014	GU295057
IBSBF1546	<i>Fuchsia</i> sp.	Brasil	IIA	35	EF371838	EF371868
IBSBF1900	Banana	Brasil	IIA	24	EF371839	EF371871
IBSBF2001	Tomate	Brasil	IIB	25	GU295017	ND
IBSBF2661	Banana	Brasil	IIA	6	KF87543	ND
IBSSF1712	Gerânio	Brasil	IIB	27	EF371833	EF371869
ICMP7963	Batata	Quênia	IIB	7	AF295263	AY766776
IPO1609	Batata	Netherlands	IIB	1	EF371814	EF371849
J25	Tomate	Quênia	III	20	AF295279	AY756810

JS927	Tomate	Porto Rico	IIB	7	GU295027	ND
JT516	Batata	Reunião	IIB	31	AF295258	AY756783
JT519	Gerânio	Reunião	I	31	GU295032	JF702713
K60	Tomate	EUA	IIB	7	EF192970.1	AY756799.1
M2	Amora	China	I	48	FJ561067	ND
MAD17	Pimentão	Madagascar	I	46	GU295040	ND
MOLK2	Banana	Filipinas	IIB	3	EF371841	EF371848
NCPPB3987	Batata	Brasil	IIB	28	AF295261	AY756785
O3	Oliveira	China	I	44	FJ561069	JF702706
P11	Amendoim	China	I	17	FJ561068	JF702705
PSi7	Tomate	Indonésia	IV	10	EF371804	AY756752
PSS175	Perilla	Taiwan	I	32	KF913847	ND
PSS219	Tomate	Taiwan	I	34	FJ561167	JF702700
PSS358	Tomate	Taiwan	I	15	EU407298	JF702699
PSS81	Tomate	Taiwan	I	14	FJ561066	JF702701
R24	Cravo	Indonésia	IV	9	JF702321	JF702735
R292	Amora branca	China	I	12	AF295255	AY756801
RS121	Tomate	Brasil	IIB	56	KT630068	ND
RS160	Batata	Brasil	IIB	57	KT630004	ND
RS161	Batata	Brasil	IIB	57	KT630005	ND
RS171	Tomate	Brasil	IIA	50	KT629874	ND
RS183	Tomate	Brasil	IIA	50	KT629880	ND
RS277	Tomate	Brasil	IIB	55	KT630059	ND

RS278IIB55	Tomate	Brasil	IIB	55	KT630060	ND
RS280IIB54	Tomate	Brasil	IIB	54	KT630013	ND
RS28IIB56	Tomate	Brasil	IIB	56	KT630077	ND
RS300IIB54	Tomate	Brasil	IIB	54	KT630021	ND
RS318	Tomate	Brasil	IIA	50	KT629930	ND
RS433IIB54	Tomate	Brasil	IIB	54	KT630028	ND
RUN549	Tomate	Trinidade	IIA	37	JF702309	JF702716
STRAIN6035	Tomate	Peru	IIA	38	EF371820	EF371855
UQRS555	Gengibre	Mauritius	I	33	KF913848	ND
UQRS565	Gengibre	Tailândia	I	30	KF913846	ND
UW163	Plátano	Peru	IIB	4	GU295052	AY756779
UW469	Batata	Brasil	IIA	40	DQ657612	AY756808
UYT1	Tomate	Uruguai	IIA	50	GU295049	JF702712
V35	Pimenta	Brasil	IIA	59	ND	ND
V42	Jiló	Brasil	IIA	59	ND	ND
V44	Pepino	Brasil	IIA	59	ND	ND

588 ND: Sequência não disponível no Genbank.

CAPÍTULO III

Resistência de acessos silvestres de tomateiro à murcha bacteriana no Brasil

1 **Resistência de acessos silvestres de tomateiro à murcha bacteriana no** 2 **Brasil**

3 G.M.R. Albuquerque¹, W.A. Melo¹, A.M.F. Silva¹, R.L.R. Mariano¹, C.A. Lopes³, L.S.
4 Boiteux³, M.E.N. Fonseca-Boiteux³, E.B. Souza^{2*}

5 ¹Departamento de Agronomia, ²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural
6 de Pernambuco, Recife-PE, Brasil, ³Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, Brasil.

7 *Email: elineidebs@yahoo.com.br

9 **Resumo**

10 O controle da murcha bacteriana do tomateiro, causada por *Ralstonia*
11 *pseudosolanacearum* e *R. solanacearum*, é dificultado pela limitada disponibilidade de
12 variedades resistentes no Brasil. Foram analisados 57 genótipos, entre acessos silvestres
13 de *Solanum* spp. secção *Lycopersicon* e genótipos de tomateiro resistentes ao cancro
14 bacteriano, visando a resistência local à murcha bacteriana, nas regiões Nordeste e
15 Centro-Sul do Brasil. No Nordeste, cinco acessos silvestres apresentaram níveis de
16 resistência a alguns isolados de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum*, enquanto no
17 Centro-Sul foram identificados seis acessos, resistentes apenas a *R. solanacearum*. Dentre
18 os acessos promissores para resistência à murcha bacteriana nas duas regiões brasileiras,
19 quatro acessos de *S. pimpinellifolium* (CNPH 597, CNPH 1038, CNPH 1039 e CNPH
20 1195) foram identificados como altamente a moderadamente resistentes à doença para as
21 duas regiões, porém a resistência foi isolado-específica. Hawaii 7996 foi o único genótipo
22 que apresentou níveis de resistência a todos os isolados (n = 14), das duas regiões. O
23 acesso CNPH 944 (*S. chmielewskii*) apresentou resistência moderada a um isolado de *R.*
24 *pseudosolanacearum* e um isolado de *R. solanacearum* da região Nordeste. CNPH 420 e
25 CNPH 421 (*S. habrochaites*) foram moderadamente resistentes a um isolado de *R.*
26 *solanacearum*, do Nordeste e Centro-Sul, respectivamente. Os genótipos 72-TR-4-4 e
27 IRAT-L3, resistentes ao cancro bacteriano, também foram resistentes a um isolado de *R.*
28 *pseudosolanacearum* do Nordeste. Este estudo relata o primeiro caso de resistência à
29 murcha bacteriana do tomateiro em *S. chmielewskii* e *S. habrochaites*. Os genótipos
30 selecionados poderão ser utilizados como fontes de resistência em programas de
31 melhoramento e/ou como variedades porta-enxerto.

32

33 **Palavras-chave:** resistência local, resistência isolado-específica, amplitude de
34 resistência, *Ralstonia* spp., secção *Lycopersicon*

35

36 **Abstract**

37 The management of tomato bacterial wilt, caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* and
38 *R. solanacearum*, is hampered by the limited availability of resistant varieties in Brazil.
39 Aiming at local resistance to bacterial wilt in the Northeast and Center-South regions of
40 Brazil, 57 genotypes were analyzed, comprising wild accesses of *Solanum* spp. section
41 *Lycopersicon* and tomato genotypes resistant to bacterial canker. In the Northeast region,
42 five wild accessions presented levels of resistance to some strains of *R.*
43 *pseudosolanacearum* and *R. solanacearum*, while in the Center-South six accessions
44 were identified, resistant only to *R. solanacearum*. Among the accessions showing
45 bacterial wilt resistance in the two Brazilian regions, four accessions of *S.*
46 *pimpinellifolium* (CNPH 597, CNPH 1038, CNPH 1039 and CNPH 1195) were identified
47 as highly to moderately resistant to the disease in the two regions, although resistance
48 was isolated-specific. Hawaii 7996 was the only genotype that showed levels of resistance
49 to all strains (n = 14) from both regions. CNPH 944 (*S. chmielewskii*) presented moderate
50 resistance to one strain of *R. pseudosolanacearum* and one strain of *R. solanacearum*
51 from the Northeast region. CNPH 420 and CNPH 421 (*S. habrochaites*) were moderately
52 resistant to one *R. solanacearum* strain from the Northeast and Center-South regions,
53 respectively. Genotypes 72-TR-4-4 and IRAT-L3, resistant to bacterial canker, also
54 showed resistance to one *R. pseudosolanacearum* strain from the Northeast region. This
55 study reports the first case of tomato bacterial wilt resistance in *S. chmielewskii* and *S.*
56 *habrochaites*. The selected genotypes accessions can be used as sources of resistance in
57 breeding programs and/or as rootstock varieties.

58

59 **Key-words:** local resistance, strain-specific resistance, amplitude of resistance,
60 *Ralstonia* spp., section *Lycopersicon*

61

62 **Introdução**

63

64 O tomate é uma das principais culturas hortícolas mundiais, apresentando
65 importância econômica tanto na alimentação humana, quanto na produção agrícola e na

66 indústria de alimentos em vários países. Existem mais de 62.000 acessos de tomateiros
67 silvestres e cultivados em bancos de genes em todo o mundo (Todorovska *et al.*, 2014).
68 No Brasil, o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma das principais hortaliças no âmbito
69 econômico alternando com a batata (*S. tuberosum*) a liderança no *ranking* de produção
70 (Silva & Giordano, 2000; Carvalho *et al.*, 2014). O país ocupa a oitava posição no *ranking*
71 de produção mundial de tomate, com cerca de 3,7 milhões de toneladas obtidas em 2017,
72 em 78mil ha plantados (IBGE, 2017). A cultura está sujeita ao ataque de várias doenças
73 que podem limitar sua produção, sobretudo a murcha bacteriana, que é responsável por
74 grandes prejuízos diretos e indiretos. Além da redução na produção, a doença limita o
75 plantio de variedades agronomicamente importantes, mas suscetíveis ao patógeno, e
76 inviabiliza o uso dos campos, especialmente em plantios sucessivos, devido à dispersão
77 e sobrevivência elevada do patógeno no solo (Lopes & Duval, 2007).

78 A murcha bacteriana é causada pelo complexo de espécies *Ralstonia solanacearum*
79 que recentemente foi reclassificado por Safni *et al.* (2014) em três espécies
80 independentes: *R. pseudosolanacearum* (filotipos I e III), *R. solanacearum* (filotipo II) e
81 *R. syzigii* com três subespécies (filotipo IV). No Brasil, a doença é causada por isolados
82 de *R. solanacearum* (filotipo II) e *R. pseudosolanacearum* (filotipo I) (Albuquerque *et*
83 *al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2016). A divisão do complexo de espécies *R. solanacearum* em
84 três espécies, também foi apoiada por Prior *et al.* (2016), através de análises genômicas e
85 proteômicas e por Zhang & Qiu (2016), baseado em análises de filogenômica envolvendo
86 686 genes de cópia única encontrados nos genomas de diferentes isolados.

87 O uso de cultivares geneticamente resistentes é considerado o método mais efetivo
88 para um manejo duradouro da murcha bacteriana. No entanto, existem poucas variedades
89 comerciais de tomateiro com nível adequado de resistência à doença, embora a sua busca
90 tenha sido prioridade em vários programas de melhoramento (Lopes, 1994; Wicker *et al.*,
91 2007). As principais fontes de resistência à murcha bacteriana para tomateiro cultivado
92 são encontradas em tomateiros silvestres, principalmente em *S. pimpinellifolium* e *S.*
93 *lycopersicum* var. *cerasiforme* (Lebeau *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2016), mas também são
94 relatadas em *S. pennelli* (Hai *et al.*, 2008) e *S. peruvianum* (Carmeille *et al.*, 2006; Kim
95 *et al.*, 2016). Essas espécies silvestres estão distribuídas em diferentes grupos da secção
96 *Lycopersicon*, a qual também abriga o tomateiro cultivado, evoluídos a partir de um
97 ancestral comum, há aproximadamente sete milhões de anos (Nesbitt & Tanksley, 2002;
98 Spooner *et al.*, 2005; Peralta *et al.*, 2008). Em genótipos silvestres de tomateiro, estudos

99 evidenciaram que aqueles com resistência ao cancro bacteriano (*Clavibacter*
100 *michiganensis* subsp. *michiganensis*) também podem apresentar resistência à murcha
101 bacteriana (Laterrot & Kaan, 1978; Laterrot, 1999; Jahr *et al.*, 2000; Lebeau *et al.*, 2011).

102 A fonte mais estável de resistência mundial à murcha bacteriana e com espectro de
103 ação contra diferentes isolados tem sido a linhagem Hawaii 7996 de *S. lycopersicum*
104 (Wang *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 2005; Lebeau *et al.*, 2011), no entanto, alguns isolados
105 altamente virulentos têm quebrado esta resistência como os pertencentes à sequevar IIA-
106 4NPB em Martinica (Wicker *et al.*, 2007), o isolado Pss190 (*R. pseudosolanacearum*,
107 biovar 1) em Taiwan (Hai *et al.*, 2008) e no Brasil, o isolado CNPH 488 (*R.*
108 *solanacearum*, biovar 2A), obtido de tomateiro no estado do Maranhão (Lopes *et al.*,
109 2015).

110 O melhoramento para resistência a isolados de *Ralstonia* em solanáceas deve ser
111 regional ou relacionado a condições climáticas (Hayward, 1991). Algumas questões
112 importantes precisam ser observadas na obtenção de variedades resistentes, como: (i) a
113 combinação entre resistência durável com características agronômicas desejáveis; (ii) as
114 cultivares resistentes devem ser adaptadas a zonas agroecológicas e a alta variabilidade
115 genética de isolados de *R. solanacearum* e (iii) deve-se priorizar a criação de cultivares
116 altamente resistentes em detrimento, a cultivares que apresentem infecção latente, a fim
117 de evitar a disseminação da bactéria pelas plantas tolerantes (Prior *et al.*, 1990; Prior *et*
118 *al.*, 1994; Lebeau *et al.*, 2011; Huet, 2014). Outro aspecto que necessita ser considerado
119 é a plasticidade genética e fenotípica de *Ralstonia* spp., o que dificulta o uso da resistência
120 varietal como um método eficiente e sustentável (Lebeau *et al.*, 2011). No caso do Brasil,
121 o processo de seleção no melhoramento genético precisa incluir isolados de *R.*
122 *pseudosolanacearum* e *R. solanacearum*, uma vez que ambas espécies estão distribuídas
123 nos campos de produção (Garcia *et al.*, 2013; Albuquerque *et al.*, 2016; Santiago *et al.*,
124 2016).

125 Em virtude da importância da murcha bacteriana nos cultivos de tomateiro no Brasil,
126 e da limitada disponibilidade de cultivares comerciais resistentes a doença para as
127 diversas regiões geográficas do país, buscou-se identificar fontes de resistência em
128 tomateiros silvestres visando a resistência local à doença, utilizando isolados de *R.*
129 *pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* das regiões Nordeste e Centro-sul do Brasil, e
130 também analisar a relação entre os genótipos resistentes ao cancro bacteriano relatados
131 na literatura e a resistência à murcha bacteriana.

132 **Material e métodos**

133

134 **Isolados bacterianos**

135 Foram utilizados três grupos de isolados de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum*
136 obtidos de solanáceas, totalizando 14 isolados, provenientes da Coleção de Culturas Rosa
137 Mariano do Laboratório de Fitobacteriologia, Departamento de Agronomia, Área de
138 Fitossanidade, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE,
139 Brasil; e do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças (CNPq), Brasília-DF, Brasil
140 (Tabela 1). O grupo Rs1 consistiu de dois isolados utilizados na seleção inicial dos
141 acessos quanto à resistência à murcha bacteriana, oriundos da região Nordeste do Brasil;
142 o grupo Rs2, de sete isolados oriundos da região Nordeste do Brasil; e o grupo Rs3, de
143 cinco isolados da região Centro-Sul do país. O grupo Rs3 do Centro-Sul agrupou isolados
144 de *Ralstonia* spp. pertencentes a três regiões brasileiras (Centro-Oeste, Sudeste e Sul).

145

146 **Material vegetal**

147 Foram utilizados dois grupos de acessos para seleção de resistência local à murcha
148 bacteriana em tomateiro, totalizando 57 genótipos (Tabela 2). O grupo WS1 consistiu de
149 43 acessos silvestres de *Solanum* spp. seção *Lycopersicon* (*S. pimpinellifolium*, *S.*
150 *chilense*, *S. habrochaites*, *S. chmielewshii* e *S. neorickii*) provenientes do Banco de
151 Germoplasma da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, Brasil. O grupo WS2 consistiu de 14
152 genótipos mundiais já relatados na literatura com resistência ao cancro bacteriano,
153 depositados no Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças. A linhagem Hawaii 7996
154 de *S. lycopersicum* e a cultivar Yoshimatsu (INPA-Instituto Nacional de Pesquisas da
155 Amazônia) foram utilizadas como controles resistentes à murcha bacteriana e os
156 tomateiros ‘Caline IPA-6’ (Hortivale®) e ‘L-390’ (AVRDC – Centro Vegetal Mundial)
157 como controles suscetíveis.

158

159 **Identificação de fontes de resistência em acessos silvestres de *Solanum* spp. seção** 160 ***Lycopersicon* à murcha bacteriana**

161 A resistência dos acessos foi analisada em três experimentos, em casa de vegetação. No
162 experimento 1, foi realizada uma identificação inicial com os 43 acessos silvestres do
163 grupo WS1 (Tabela 2) inoculados com os isolados de *Ralstonia* spp. do grupo Rs1
164 (CRMrs185 e CRMrs218) (Tabela 1), a fim de detectar os níveis de resistência dos

165 acessos. A linhagem Hawaii 7996 e ‘Caline IPA-6’ foram utilizados como controles
166 resistente e suscetível à murcha bacteriana, respectivamente.

167 Nos experimentos 2 e 3, visando a resistência local à murcha bacteriana, verificou-
168 se a “amplitude” de resistência de 11 acessos silvestres de *Solanum* spp. selecionados no
169 experimento 1, sendo as plantas inoculadas com os isolados dos grupos Rs2 e Rs3 de
170 *Ralstonia*, respectivamente (Tabela 1). A linhagem Hawaii 7996 e ‘Caline IPA-6’ foram
171 utilizados como controles resistente e suscetível à murcha bacteriana, respectivamente.

172 Em cada experimento, 15 dias após a semeadura (realizada em bandejas de
173 poliestireno com substrato orgânico vegetal Basaplant[®]), as plântulas foram transplantadas
174 para vasos de 500 mL contendo a mistura solo/húmus (v/v 2:1). A inoculação dos isolados
175 de *Ralstonia* spp. foi realizada 15 dias após o transplante, pelo método de ferimento de
176 raízes no solo em semicírculo, com deposição de 15 mL da suspensão bacteriana (Felix
177 *et al.*, 2012). Os isolados foram cultivados em meio de Kelman (Kelman, 1954) por 48 h
178 a 30°C, as suspensões foram preparadas em água e ajustadas em espectrofotômetro
179 modelo 500M (Analyser, São Paulo, SP, Brasil) para 1×10^8 UFCmL⁻¹.

180 As plantas foram avaliadas a cada dois dias após a inoculação, durante 30 dias. As
181 variáveis analisadas consistiram do (i) período de incubação (PI), que corresponde ao
182 tempo (dias) entre a inoculação e o surgimento dos primeiros sintomas e (ii) incidência
183 da doença (INC), a qual consiste na porcentagem de plantas inoculadas que apresentaram
184 sintoma de murcha.

185 Plantas assintomáticas foram analisadas quanto à infecção latente por *R.*
186 *pseudosolanacearum* e *R. solanacearum*, conforme metodologia adaptada de Lebeau *et*
187 *al.* (2011). Fragmentos do caule de 2 cm de comprimento (a partir do colo) foram
188 desinfestados e transferidos para tubos contendo 5 mL de água destilada esterilizada, por
189 1 a 2 h a temperatura ambiente, para migração da bactéria dos vasos do xilema para a
190 água. Uma alíquota de 50 µL foi plaqueada em placas de Petri contendo o meio semi-
191 seletivo SMSA modificado (Elphinstone *et al.*, 1996), as quais foram incubadas a 30°C
192 por 4 dias. Plantas assintomáticas foram consideradas positivas para infecção latente
193 quando colônias características de *Ralstonia* spp. foram visualizadas. Foi calculado o
194 índice de colonização interna (IC) para cada combinação acesso/isolado pela fórmula IC
195 $= INC + [(Ns * Rs)/100]$, onde INC é a porcentagem de plantas sintomáticas, Ns a
196 porcentagem de plantas assintomáticas e Rs a porcentagem de plantas assintomáticas com
197 infecção latente (Grimault *et al.*, 1994; Prior *et al.*, 1996).

198 O nível de resistência dos acessos silvestres em relação a cada isolado foi
199 determinado pela relação INC/IC, adaptada de Lebeau *et al.* (2011), como altamente
200 resistente (AR: INC= 0-13,3% e IC= 0-16,7%), moderadamente resistente (MR: INC= 0-
201 33,3% e IC= 16,7-50%), parcialmente resistente (PR: INC= 26,7-43,6% e IC= 43,3-60%),
202 infecção latente (IL: INC= 0-36,7% e IC= 53,3-100%), moderadamente suscetível (MS:
203 INC= 40-80% e IC= 46,7-100%) e altamente suscetível (AS: INC= 83,3-100% e IC=
204 86,7-100%).

205 Os experimentos 1 e 2 foram conduzidos em casa de vegetação do Laboratório de
206 Fitobacteriologia do Departamento de Agronomia da UFRPE, nos períodos de agosto a
207 outubro de 2015 (T_{Min/Max}:22,9/46,4°C; UR_{Min/Max}:22,5/82,8%) e dezembro a fevereiro de
208 2016 (T_{Min/Max}:23,9/47,1°C; UR_{Min/Max}:36,9/80,2%), respectivamente; e o experimento 3
209 em casa de vegetação do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, no período
210 de agosto a outubro de 2016 (T_{Min/Max}:19,9/46,3°C; UR_{Min/Max}:21,6/74,9%).

211 Nos três experimentos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado
212 variando o número de tratamentos. O experimento 1, consistiu de quatro repetições com
213 três plantas cada, para cada combinação acesso/isolado e nos experimentos 2 e 3 foram
214 utilizadas quatro repetições, com cinco plantas cada.

215

216 **Relação entre resistência ao cancro bacteriano e à murcha bacteriana**

217 Foram analisados 14 genótipos de *Solanum* spp. do grupo WS2 relatados como resistentes
218 ao cancro bacteriano (Emathy & John, 1973; Kuriyama & Kuniyasu, 1974; Forst &
219 Echandi, 1975; Boelema *et al.*, 1980; Van Steekelenburg, 1985; Bosch *et al.*, 1990;
220 Kaneshiro *et al.* 2006; Vu *et al.*, 2009; Sen *et al.* 2012) (Tabela 2), a fim de analisar a
221 resistência à murcha bacteriana, em um quarto experimento. Neste experimento foram
222 utilizados três isolados, dos quais dois isolados de *Ralstonia* spp. oriundos do Nordeste
223 utilizados na seleção inicial dos acessos silvestres (grupo Rs1) e o isolado de *R.*
224 *pseudosolanacearum* CNPH 551 (grupo Rs3) do Centro-Sul. Plantas com 30 dias após a
225 semeadura, realizada em bandejas de poliestireno contendo substrato para plantas
226 Rohrbacher® foram inoculadas pelo método da pulverização das raízes+torrão (Lopes &
227 Boiteux, 2012) com 5 mL da suspensão dos isolados CRMRS218, CNPH551 (*R.*
228 *pseudosolanacearum*) e CRMRS185 (*R. solanacearum*) (Tabela 1). Em seguida, as
229 plantas foram transplantadas para vasos de 500 mL contendo solo (85% de subsolo do
230 cerrado peneirado, 5% de casca de arroz seca e 10% de casca de arroz carbonizada,

231 enriquecido com 100 g de calcário dolomítico, 200 g de superfosfato simples e 60 g de
232 sulfato de amônio para cada 100 L de substrato). A linhagem Hawaii 7996 e 'L-390' foram
233 utilizados como controles resistente e suscetível à murcha bacteriana, respectivamente.

234 O experimento foi realizado em casa de vegetação do Laboratório de Fitopatologia
235 da Embrapa Hortaliças, no período de outubro a dezembro de 2016 ($T_{\text{Min/Max}}$:21,5/50,2°C;
236 $UR_{\text{Min/Max}}$:34,0/87,2%). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com
237 três repetições de cinco plantas cada. As plantas foram avaliadas durante 30 dias após a
238 inoculação, sendo determinados a INC e severidade final da doença (SEVf), baseada em
239 escala descritiva de Nielsen & Haynes (1960) que varia 1 a 5, onde: 1 = plantas sem
240 sintoma, 2 = plantas com 1/3 de folhas murchas, 3 = plantas com 2/3 de folhas murchas,
241 4 = planta murcha e 5 = planta morta. Os dados de INC e SEVf foram submetidos à análise
242 de variância (ANOVA) e as médias agrupadas pelo Teste de Scott-Knott, ao nível de 5%
243 de probabilidade (SISVAR[®]5.3).

244

245 **Resultados**

246

247 **Identificação de fontes de resistência em acessos silvestres de *Solanum* spp. secção** 248 ***Lycopersicon* à murcha bacteriana**

249 Na identificação inicial (experimento 1), os acessos silvestres do grupo WS1
250 apresentaram diferentes reações de resistência a *R. pseudosolanacearum* (CRMRS218) e
251 *R. solanacearum* (CRMRS185) (Tabela 3). O isolado CRMRS185 foi mais agressivo, com
252 35 acessos (81,4%) classificados como AS e MS (INC= 50 a 100% e IC=50 a 100%), em
253 comparação a 19 acessos (44,2%) classificados como AS e MS (INC= 50 a 91,6% e
254 IC=66,6 a 100%) e 10 acessos (23,2%) apresentaram-se como IL (INC= 0 a 66,6% e
255 IC=66,7 a 83,3%), quando inoculados com CRMRS218. O isolado CRMRS185
256 caracterizou nove acessos (21%) como AR, MR ou PR (INC= 0 a 41,6% e IC = 0 a 50%),
257 em comparação a 15 acessos (34,9%) inoculados com CRMRS218 (INC= 0 a 33,3% e
258 IC=0 a 50%). Apenas nos acessos CNPH 1037 e CNPH 1195 inoculados com CRMRS185
259 não foi detectada incidência da doença, e de acordo com a relação INC/IC foram
260 classificados como altamente resistentes. Já com relação ao isolado CRMRS218, não
261 foram verificados sintomas de murcha bacteriana em nove acessos, tendo sido verificados
262 dentre estes, os fenótipos altamente resistentes (n = 4), moderadamente resistente (n = 1)
263 e infecção latente (n = 4). Infecção latente não foi observada nos acessos inoculados com

264 CRMRs185. Hawaii 7996 e ‘Yoshimatsu’ mantiveram a resistência à murcha bacteriana
265 enquanto ‘Caline IPA-6’ teve a alta suscetibilidade comprovada (Tabela 3). Nas plantas
266 com algum nível de resistência, os primeiros sintomas da murcha bacteriana iniciaram,
267 em média, aos 24 dias após a inoculação, enquanto que nas plantas suscetíveis, a partir
268 de 8 dias, para os dois isolados (dados para período de incubação não apresentados).

269 Os 11 acessos silvestres de *Solanum* spp. CNPH 418, CNPH 597, CNPH 1037, CNPH
270 1038, CNPH 1039, CNPH 1124, CNPH 1195 e CNPH 1678 (*S. pimpinellifolium*); CNPH
271 420 e CNPH 421 (*S. habrochaites*) e CNPH 944 (*S. chmielewskii*), selecionados com
272 base na resistência a pelo menos um dos isolados apresentaram reações diversas de
273 resistência aos isolados dos grupos Rs2 (Nordeste) e Rs3 (Centro-Sul), não havendo
274 relação da resistência com a espécie de *Ralstonia* (Tabelas 4 e 5). Nenhuma fonte de
275 resistência foi encontrada aos isolados CRMRs123 e CNPH 613 (*R. solanacearum*) e ao
276 isolado CNPH 551 (*R. pseudosolanacearum*).

277 Com isolados do grupo Rs2 da região Nordeste, os acessos que mostraram maior
278 amplitude de resistência (AR, MR e PR) aos isolados das duas espécies de *Ralstonia*
279 foram: CNPH 597, com resistência a 71,4% dos isolados; CNPH 1037 e CNPH 1038 a
280 57,1% dos isolados e os acessos CNPH 1039 e CNPH 1124 a 42,8% dos isolados (Tabela
281 4).

282 Os acessos de *Solanum* spp. CNPH 418, CNPH 597, CNPH 1038, CNPH 1039, CNPH
283 1124 e CNPH 1195 (54,5% dos acessos) inoculados com os isolados da região Centro-
284 sul, apresentaram bons níveis de resistência apenas aos isolados CNPH 489 e CNPH 612,
285 de *R. solanacearum* (Tabela 5). Aos demais isolados (60%) todos os acessos silvestres
286 foram caracterizados como altamente suscetíveis, medianamente suscetíveis ou infecção
287 latente, excetuando-se apenas o acesso CNPH 1037, que foi parcialmente resistente ao
288 isolado CNPH 608 (*R. pseudosolanacearum*).

289 A linhagem Hawaii 7996 foi o único acesso que apresentou níveis de resistência a
290 todos os isolados utilizados neste estudo, com exceção de infecção latente ao isolado
291 CNPH 613 (grupo Rs3) (Tabela 5), variando de altamente resistente (grupo Rs2:
292 CRMRs91, CRMRs134, CRMRs205 e CRMRs211; grupo Rs3: CNPH 551 e CNPH 612)
293 a moderadamente resistente (grupo Rs2: CRMRs120, CRMRs121 e CRMRs123; grupo
294 Rs3: CNPH 489 e CNPH 608) (Tabelas 4 e 5). A cultivar Caline IPA-6 manteve seu
295 padrão de suscetibilidade aos isolados dos grupos Rs2 e Rs3 (Tabelas 4 e 5).

296

297 **Relação entre resistência ao cancro bacteriano e à murcha bacteriana**

298 Em todos os genótipos resistentes ao cancro bacteriano verificou-se alta incidência e
299 severidade da murcha bacteriana aos isolados CNPH 551 (INC= 93,3 a 100%; SEVf= 4,3
300 a 5,0) e CRMRS185 (INC= 73,3 a 100%; SEVf= 3,8 a 5,0) de *R. pseudosolanacearum* do
301 Centro-Sul e *R. solanacearum* do Nordeste, respectivamente (Tabela 6). Por outro lado,
302 observou-se que os genótipos 72-TR-4-4 e IRAT-L3 apresentaram resistência ao isolado
303 CRMRS218 (*R. pseudosolanacearum*, Nordeste), não diferindo significativamente ($P <$
304 0,05) do padrão de resistência (Hawaii 7996) com relação a INC (0 e 6,7%) e SEVf (1,0
305 e 1,3). Embora diferindo significativamente na INC e/ou SEVf em relação a Hawaii 7996
306 os genótipos Rotam-4 (33,3% e 1), Príncipe Gigante (26,7% e 2,1) e MR-4 (20% e 1,7)
307 se destacaram com certa resistência a esse mesmo isolado. Foi verificada a quebra da
308 resistência da linhagem Hawaii 7996 pelo isolado CNPH 551 de *R. pseudosolanacearum*.

309

310 **Discussão**

311

312 No Brasil, a murcha bacteriana ocorre em tomateiro e outras solanáceas de forma
313 generalizada em todas as regiões sob condições de temperatura e umidade elevadas,
314 abrangendo grandes cultivos, áreas de agricultura familiar e até mesmo, áreas recém-
315 desmatadas.

316 Este trabalho foi desenvolvido visando identificar tomateiros silvestres como fonte
317 de resistência local à murcha bacteriana para as regiões Nordeste e Centro-Sul do Brasil,
318 causada por *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*. A busca de variedades
319 resistentes a esta doença deve ser realizada em âmbito regional, considerando as
320 condições climáticas e a variabilidade encontrada em isolados de *Ralstonia* spp., em cada
321 região (Hayward *et al.*, 1991; Lebeau *et al.*, 2011; Lopes & Boiteux, 2016). Por isso, os
322 acessos silvestres considerados promissores na seleção inicial (acessos WS1 x isolados
323 Rs1) foram analisados quanto à amplitude de resistência a dois grupos de isolados das
324 duas espécies, oriundos das regiões Nordeste (Rs2) e Centro-Sul (Rs3).

325 Os acessos silvestres da secção *Lycopersicon* utilizados na composição do grupo de
326 acessos WS1 foram selecionados de acordo com sua variabilidade. A secção
327 *Lycopersicon* é considerada a mais diversa em termos quantitativos, dentre as secções de
328 tomateiro ($n = 3$), sendo dividida em quatro grupos (*Lycopersicon*, *Eryopersicon*,
329 *Arcanum* e *Neolyopersicon*), evoluídos a partir de um ancestral comum (Nesbitt &

330 Tanksley, 2002; Spooner *et al.*, 2005; Peralta *et al.*, 2008). Foram utilizados o maior
331 número de acessos de *S. pimpinellifolium* (n = 20), pois a maioria das fontes de resistência
332 à murcha bacteriana são relatadas nesta espécie e em *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*
333 (Lebeau *et al.*, 2011). O grupo de acessos Ws2 foi estabelecido para verificar a relação
334 entre resistência ao cancro e a murcha bacteriana relatada na literatura (Lebeau *et al.*,
335 2011), utilizando-se para isso 14 genótipos de tomateiros silvestres com reconhecida
336 resistência ao cancro bacteriano (Emathy & John, 1973; Kuriyama & Kuniyasu, 1974;
337 Boelema *et al.*, 1980; Van Steekelenburg, 1985; Bosch *et al.*, 1990; Kaneshiro *et al.*,
338 2006; Vu *et al.*, 2009; Sen *et al.*, 2012).

339 Os aspectos adotados na seleção dos acessos silvestres têm sido considerados
340 fundamentais a fim de reduzir a quebra de resistência verificada por fitomelhoristas em
341 cultivares de tomateiro, sob cultivo intensivo (Balatero & Hautea, 2001). O
342 desconhecimento sobre a ocorrência de infecção ausente ou latente, das características
343 genéticas dos isolados utilizados nos programas de melhoramento, das interações entre
344 os fatores genéticos envolvidos na resistência e patogenicidade das bactérias, além de
345 fatores como temperatura, umidade, nitrogênio e coinfeção com *Meloidogyne* spp. têm
346 levado à instabilidade da resistência (Buddenhagen & Kelman, 1964; Krausz & Thurston,
347 1975; Hayward, 1991; Deberdt *et al.*, 1999).

348 Nenhum dos 11 acessos silvestres de *Solanum* spp. secção *Lycopersicon* analisados
349 apresentou resistência a todos os isolados de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum*
350 inoculados (grupos Rs1, Rs2 e Rs3), mostrando variação da resposta de resistência dos
351 acessos a diferentes isolados. Na região Centro-sul, os isolados CNPH 613 e CNPH 551
352 (grupo Rs3) foram mais agressivos a maioria dos acessos (CNPH 418, CNPH 421, CNPH
353 522, CNPH 597, CNPH 1037, CNPH 1038, CNPH 1039, CNPH 1124 e CNPH 1195),
354 caracterizando-os como suscetíveis, de forma geral. Por outro lado, os isolados CNPH
355 489 e CNPH 612 (grupo Rs3) incitaram bons níveis de resistência aos acessos acima
356 citados. Na Região Nordeste, todos os acessos foram suscetíveis ao isolado CRMrs123
357 (grupo Rs2) e aos demais isolados apresentaram variações nos níveis de resistência. A
358 elevada suscetibilidade de acessos a determinados isolados, geralmente é associada a
359 isolados altamente agressivos (Lebeau *et al.*, 2011; Lopes & Mendonça, 2016), contudo,
360 verificou-se que outros fatores também podem estar associados à quebra de resistência,
361 como a interação acesso-isolado.

362 Além da alta suscetibilidade encontrada em alguns acessos, verificou-se também
363 resistência determinada pelo isolado nas duas regiões brasileiras. Os acessos CNPH 597,
364 CNPH 1037, CNPH 1038, CNPH 1039 e CNPH 1195 comportaram-se como altamente,
365 moderadamente ou parcialmente resistentes a alguns isolados de *R. pseudosolanacearum*
366 e *R. solanacearum* da região Nordeste. Esses acessos podem ser indicados como fontes
367 de resistência à murcha bacteriana para essa região, pela maior amplitude de resistência.
368 Já para a região Centro-Sul, podem ser indicados os acessos CNPH 418, CNPH 597,
369 CNPH 1038, CNPH 1039, CNPH 1124 e CNPH 1195 que foram altamente a parcialmente
370 resistentes especificamente aos isolados de *R. solanacearum*. Entre os acessos
371 recomendados para as regiões Nordeste e Centro-Sul, quatro acessos de *S.*
372 *pimpinellifolium* (CNPH 597, CNPH 1038, CNPH 1039 e CNPH 1195) apresentaram
373 boas fontes de resistência à murcha bacteriana para as duas regiões simultaneamente,
374 contudo, para o Centro-Sul a resistência foi restrita aos isolados de *R. solanacearum*.
375 Esses resultados indicam que a resistência à murcha bacteriana é isolado-específica.

376 Resultados similares de reação de resistência à murcha bacteriana foram observados
377 em outros estudos. Um conjunto de 30 acessos de tomateiro, berinjela e pimentão
378 (Core-TEP) não apresentaram resistência a todos os isolados do conjunto de *Ralstonia*
379 spp. (Core-Rs2, n = 12) sob condições experimentais severas, detectando-se altos níveis
380 de resistência a vários isolados em oito acessos, sendo TML46 e Hawaii 7996 os únicos
381 acessos de tomateiro que apresentaram maior espectro de resistência (Lebeau *et al.*,
382 2011). Hai *et al.* (2008) também detectaram suscetibilidade de 252 acessos silvestres de
383 *Solanum* spp. da coleção do AVRDC, em Taiwan, e da coleção da Universidade da
384 Califórnia, Davis, ao isolado Pss4 de *R. pseudosolanacearum*. No entanto, cinco acessos
385 de *S. pennelli* (LA1943, LA716, LA1656, LA1732 e TL01845) foram resistentes ao
386 isolado Pss186 (*R. pseudosolanacearum*, filotipo I, biovar 4), suscetíveis a Pss4 (*R.*
387 *pseudosolanacearum*, filotipo I) e apresentaram resistência de moderada a alta ao isolado
388 Pss 190 (*R. pseudosolanacearum*, filotipo I). Dentre 82 acessos de *Solanum* spp. secção
389 *Lycopersicon*, provenientes da Coleção de Germoplasma de tomate das Ilhas Reunião, foi
390 detectada resistência parcial à *R. solanacearum* (filotipo II, biovar 2) apenas em um
391 acesso de *S. peruvianum* e de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Carmeille *et al.*, 2006).
392 Na Coreia, foi investigada a suscetibilidade à *R. solanacearum* em 285 acessos
393 provenientes do Banco de Germoplasma do Centro Nacional de Agrobiodiversidade de
394 Desenvolvimento Rural, sendo identificados quatro acessos como altamente resistentes à

395 murcha bacteriana, dos quais três foram de *S. lycopersicum* e um de *S. peruvianum* (Kim
396 *et al.*, 2016).

397 Estas interações acesso-isolado reiteram que a resistência à murcha bacteriana não é
398 estável, mas sim, isolado-específica, como verificado neste e outros trabalhos (Hanson *et*
399 *al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Carmeille *et al.*, 2006; Hai *et al.*, 2008; Lebeau *et al.*, 2011;
400 Kim *et al.*, 2016). Por esta característica, adotou-se o termo “amplitude de resistência” ao
401 invés de estabilidade da resistência na verificação do comportamento dos acessos aos
402 diversos isolados de *Ralstonia* spp., das regiões brasileiras Nordeste e Centro-Sul.

403 Observou-se infecção latente em alguns acessos silvestres, como reportado por
404 Lebeau *et al.* (2011). Essa reação também foi isolado-específica, uma vez que ocorreu em
405 diferentes acessos principalmente na interação com *R. pseudosolanacearum*, mas também
406 com isolados de *R. solanacearum*, a exemplo das interações: CNPH 421 x CNPH 489 e
407 CNPH 1037 x CNPH 612, que apresentaram incidência de 15% da murcha e colonização
408 interna de 65% das plantas. Apesar da infecção latente ser considerada um mecanismo de
409 resistência por alguns autores (Lebeau *et al.*, 2011; Lopes & Boiteux, 2016), os fenótipos
410 tipificados como IL, não foram considerados boas fontes de resistência. A indicação de
411 tais acessos levaria à quebra de resistência por outros isolados e, principalmente, estes
412 acessos atuariam como fonte de inóculo do isolado para fenótipos suscetíveis.

413 Neste estudo foi relatado o primeiro caso de resistência à murcha bacteriana em duas
414 novas espécies da secção *Lycopersicon*: *S. chmielewskii* e *S. habrochaites*. O acesso
415 CNPH 944 de *S. chmielewskii* apresentou resistência moderada a *R. pseudosolanacearum*
416 (CRMRS 218) e *R. solanacearum* (CRMRS 211); enquanto que, os acessos CNPH 420 e
417 CNPH 421 de *S. habrochaites* foram moderadamente resistentes aos isolados de *R.*
418 *solanacearum* CRMRS91e CNPH 612, respectivamente. Interessantemente, na seleção
419 inicial, estes acessos de *S. habrochaites* foram moderadamente suscetíveis a *R.*
420 *solanacearum* (CRMRS185) e moderadamente (CNPH 421) a altamente resistente
421 (CNPH 420) ao isolado CRMRS218 de *R. pseudosolanacearum*. Estes resultados são
422 importantes, pois expandem o número de espécies silvestres de *Solanum* com resistência
423 à murcha bacteriana.

424 Nos genótipos resistentes ao cancro bacteriano verificou-se resistência à murcha
425 bacteriana apenas em 72-TR-4-4 e IRAT-L3, ao isolado de *R. pseudosolanacearum*
426 (CRMRS218) do Nordeste do Brasil. Certa resistência a esse isolado também foi
427 verificada nos genótipos Rotam-4, Príncipe Gigante e MR-4, que são altamente a

428 moderadamente resistentes ao cancro bacteriano (Forst & Echandi, 1975; Bosch *et al.*,
429 1990). Assim, verificou-se relação entre resistência ao cancro e à murcha bacteriana,
430 sendo esta também isolado-específica, como observado por diversos autores nos
431 genótipos Rotam-4, Irat L3, Rodade (Lopes *et al.*, 1994; González & Summers, 1995) e
432 Okitsu sozai (Lebeau *et al.*, 2011).

433 Neste trabalho, observou-se quebra de resistência à murcha bacteriana em Hawaii
434 7996 (INC = 93,3%) ao isolado CNPH 551 de *R. pseudosolanacearum* no experimento
435 4, contudo, isso não ocorreu no experimento 3 (INC = 0%). A quebra de resistência pode
436 estar relacionada à diferença dos métodos de inoculação utilizados ou às condições
437 ambientais, com temperatura e umidade mais elevadas no experimento 4.

438 Este trabalho reafirma a linhagem Hawaii 7996 como a principal fonte de resistência
439 à murcha bacteriana, apresentando maior amplitude a diferentes isolados de *Ralstonia*
440 spp. Além disso, contribui com novas informações sobre a ocorrência de quatro acessos
441 de *S. pimpinellifolium*, altamente a parcialmente resistentes à murcha bacteriana para
442 isolados das regiões Nordeste e Centro-Sul, e aponta *S. chmielewskii* e *S. habrochaites*,
443 como novas fontes de resistência à doença. Também relaciona a resistência ao cancro e à
444 murcha bacteriana nos genótipos 72-TR-4-4, IRAT-L3, Rotam-4, Príncipe Gigante e MR-
445 4 como isolado-específica. Considerando a variabilidade de *R. pseudosolanacearum* e *R.*
446 *solanacearum* nas regiões brasileiras e os bons níveis de resistência verificados, os
447 genótipos de *Solanum* spp. selecionados nesse estudo podem ser utilizados nos programas
448 de melhoramento do tomateiro e/ou como cultivares porta-enxerto.

449

450 **Agradecimentos**

451

452 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela
453 concessão de bolsa de Doutorado à G.M.R. Albuquerque e bolsa de produtividade à R.
454 L.R. Mariano (Proc. 309697/2011-5). A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do
455 Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão de bolsa de fixador de pesquisador a
456 A.M.F. Silva (Proc. 0082-5.01/15). Ao CNPq pelo apoio financeiro a L.S. Boiteux e
457 M.E.N. Fonseca-Boiteux.

458

459 **Referências**

460

- 461 Albuquerque GMR, Silva AMF, Silva JR, Gama MAS, Mariano RL, 2016. First Report
462 of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* on *Eruca vesicaria*
463 subsp. *sativa* no Brazil. *Plant Disease* **100**, 2319.
- 464 Balatero, CH, Hautea DM, 2001. Identification of AFLP and RGA markers associated
465 with bacterial wilt resistance QTL derived from tomato *Lycopersicon*
466 *pimpinellifolium*. In: Van den Berg RG, Barendse GWM, Van der Weerden GM,
467 Mariani C, eds. *Solanaceae V: Advances in Taxonomy and Utilization*, pp. 225-243.
468 Nijmegen, Netherlands: Nijmegen University Press.
- 469 Boelema BH, 1980. Resistance to *Corynebacterium michiganense* in tomato cultivars
470 and breeding lines. *Phytophylactica* **12**, 81-82.
- 471 Bosch SE, Boelema BH, Serfontein JJ, Anita E, Swanepoel AE, 1990. 'Rotam 4', a
472 Multiple Disease-resistant Fresh-market Tomato. *Hortscience* **25**, 1313-1314.
- 473 Buddenhagen I, Kelman A, 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt
474 caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **2**, 203-
475 230.
- 476 Carmeille A, Caranta C, Diittinger J, Prior P, Luisetti J, Besse P, 2006. Identification of
477 QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylotype II resistance in tomato. *Teory*
478 *applied Genetics* **113**, 110-121.
- 479 Carvalho CRF, Ponciano NJ, Souza PM, Souza CLM, Sousa EF, 2014. Viabilidade
480 econômica e de risco da produção de tomate no município de Cambuci/RJ, Brasil.
481 *Ciência Rural* **44**, 2293-2299.
- 482 Deberdt P, Quénehervé P, Darrasse A, Prior P, 1999. Increased susceptibility to
483 bacterial wilt in tomatoes by nematode galling and the role of the *Mi* gene in
484 resistance to nematodes and bacterial wilt. *Plant Pathology* **48**, 408-414.
- 485 Emmatty DA, John CA, 1973. Evaluation of resistance to bacterial canker of H2990, a
486 new tomato variety. *Plant Disease* **57**, 584-586.
- 487 Elphinstone JG, Hennessy J, Wilson JK, Stead DE, 1996. Sensitivity of different
488 methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *OEPP/*
489 *EPPO* **26**, 663-678.
- 490 Felix KCS, Souza EB, Michereff SJ, Mariano RLR, 2012. Survival of *Ralstonia*
491 *solanacearum* in infected tissues of *Capsicum annuum* and in soils of the state of
492 Pernambuco, Brazil. *Phytoparasitica* **40**, 53-62.

- 493 Forster RL, Echandi E, 1973. Relation of age of plants, temperature, and inoculum
494 concentration to bacterial canker development resistant and susceptible *Lycopersicon*
495 spp. *Phytopathology* **63**, 773-777.
- 496 Garcia AL, Lima WG, Souza EB, Michereff SJ, Mariano RLR, 2013. Characterization
497 of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt bell pepper in the state
498 Pernambuco, Brasil. *Journal Plant Pathology* **95**, 237-245.
- 499 González WG, Summers WL, 1995. A Comparison of *Pseudomonas solanacearum*-
500 resistant Tomato Cultivars as Hybrid Parents. *JASH* **120**, 891-895.
- 501 Grimault V, Anais G, Prior P, 1994. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the
502 stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt.
503 *Plant Pathology* **43**, 663-668.
- 504 Hai TTH, Esch E, Wang, 2008. Resistance to Taiwanese race 1 strains of *Ralstonia*
505 *solanacearum* in wild tomato germplasm. *European Journal of Plant Pathology* **122**,
506 471-479.
- 507 Hanson PM, Licardo O, Wang JF, Chen JT, 1998. Diallel analysis of bacterial wilt
508 resistance in tomato derived from different sources. *Plant Disease* **82**, 74-78.
- 509 Hayward AC, 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by
510 *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **29**, 65-87.
- 511 Huet G, 2014. Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Plant*
512 *Science* **5**, 1-5.
- 513 IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. Levantamento Sistemático
514 da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras
515 agrícolas no ano civil. *IBGE* **30**, 1-81.
- 516 Jahr H, Dreier J, Meletzus D, Bahro R, Eichenlaub R, 2000. The endo- β -1,4-glucanase
517 CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity
518 determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Molecular Plant-*
519 *Microbe Interactions* **13**,703-714.
- 520 Kaneshiro WS, Mizumoto CY, Alvarez AM, 2006. Differentiation of *Clavibacter*
521 *michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA,
522 Biolog and 16S rDNA sequencing. *European Journal Plant Pathology* **116**, 45-56.
- 523 Kelman, A, 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to
524 colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* **44**, 693-695.

- 525 Kim SG, Hur O, Ro N, Ko H, Rhee J, Sung JS, Ryu K, Lee S, Baek H, 2016. Evaluation
526 of resistance to *Ralstonia solanacearum* in tomato genetic resources at seedling
527 stage. *Plant Pathology Journal* **32**, 58-64.
- 528 Krausz JP, Thurston HD, 1975. Breakdown of resistance to *Pseudomonas*
529 *solanacearum* in tomato. *Phytopathology* **65**, 1272-1274.
- 530 Kuriyama T, Kuniyasu K, 1974. Studies on the breeding of resistant tomato by
531 interspecific hybridization, 3: On the breeding of a new tomato line resistant to
532 bacterial canker caused by *Corynebacterium michiganensis*. *Bull Veg Ornament Crops*
533 *Res Stn Jpn A* **1**, 93-107.
- 534 Laterrot H. 1999. Resistance to bacteria in tomato. In: Mugnozza GTS, Porceddu E,
535 Pagnotta MA, eds. *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance*, pp. 103-
536 110 Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- 537 Laterrot H, Kaan F, 1978. Resistance to *Corynebacterium michiganense* of lines bred
538 for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Tomato Genetics Cooperative* **28**, 8-9.
- 539 Lebeau A, Daunay MC, Frarry A, Palloix A, Wang JF, Dintinger J, Chiroleu F, Wicker
540 E, Prior P, 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic
541 resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex.
542 *Phytopathology* **101**, 154-165.
- 543 Lopes CA, Quezado-Soares AM, Melo PE, 1994. Differential resistance of tomato
544 cultigens to biovars I and III of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Disease* **78**,
545 1091-1094.
- 546 Lopes CA, Duval AMQ, 2007. Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças
547 In: Zambolim L, Lopes CA, Picanço MC, Costa H, eds. *Manejo Integrado de*
548 *Doenças e Pragas: Hortaliças*, pp. 115-162. Viçosa, Brasil: Editora UFV.
- 549 Lopes CA, Boiteux LS, 2012. Melhoramento para resistência a doenças bacterianas. In:
550 Fritsche-Neto R, Borém A, eds. *Melhoramento de Plantas para Condições de*
551 *Estresses Bióticos*, pp. 61-88. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema.
- 552 Lopes CA, Boiteux LS, Eschemback V, 2015. Eficácia relativa de porta-enxertos
553 comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. *Horticultura Brasileira*
554 **33**, 125-130.
- 555 Lopes CA, Boiteux LS, 2016. Melhoramento Genético Visando Resistência à
556 Murcha Bacteriana. Pages: 257-274 in: Gama MAS, Nicoli A, Guimarães LMP,

- 557 Lopes UP, Michereff SJ, eds. *Estado da arte em fitobacterioses tropicais*. Recife,
558 Brasil: EDUFRPE.
- 559 Lopes CA, Mendonça JL, 2016. Reação de acessos de jurubeba à murcha bacteriana
560 para uso como porta-enxerto em tomateiro. *Horticultura Brasileira* **34**, 356-360.
- 561 Nesbitt TC, Tanksley SD, 2002. Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*:
562 Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated
563 tomatoes. *Genetics* **162**, 365-379.
- 564 Nielsen LW, Haynes FL, 1960. Resistance in *Solanum tuberosum* to *Pseudomonas*
565 *solanacearum*. *American Potato Journal* **37**, 260-267.
- 566 Peralta IE, Spooner DM, Knapp S, 2008. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives
567 (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Jugandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae).
568 In: Anderson C, ed. *Systematic botany monographs*, pp.1-186. Laramie, EUA: The
569 American Society of Plant Taxonomists.
- 570 Prior P, Steva H, Cadet P, 1990. Aggressiveness of strains of *Pseudomonas*
571 *solanacearum* from the French West Indies (Martinique and Guadeloupe) on tomato.
572 *Plant Disease* **74**, 962-965.
- 573 Prior P, Grimault V, Schmit J, 1994. Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas*
574 *solanacearum*) in tomato: present status and prospects. In: Hayward AC, Hartman
575 GL, eds. *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas*
576 *solanacearum*, pp. 209-224. Wallingford, England: CAB.
- 577 Prior P, Bart S, Leclercq S, Darrasse A, Anais G, 1996. Resistance to bacterial wilt in
578 tomato as discerned by spread of *Pseudomonas (Burholderia) solanacearum* in the
579 stem tissues. *Plant Pathology* **45**, 720-726.
- 580 Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B, Allen C, 2016. Genomic and
581 proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia*
582 *solanacearum* into three species. *BMC Genomics* **17**, 90-101.
- 583 Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L, Kappler U, 2014. Polyphasic
584 taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to
585 emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and
586 reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R.*
587 *solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp.
588 nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*
589 subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia*

- 590 *pseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal Systematic Evolution*
591 *Microbiology* **64**, 3087-103.
- 592 Santiago TR, Lopes CA, Caetano-Anolles G, Mizubuti ESG, 2016. Phylotype and
593 sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of
594 diversity of the pathogen. *Plant Pathology*. Online:
595 <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12586>.
- 596 Scott JW, Wang JF, Hanson PM, 2005. Breeding tomatoes for resistance to bacterial
597 wilt, a global view. In: Momol MT, Ji P, Jones JB, eds. *Proc. First Int. Symp.*
598 *Tomato Dis*, pp. 161-172. Brugge, Belgium: International Society Horticultural
599 Science.
- 600 Sen Y, Van der Wolf J, Visser RGF, Van Heusden S, 2012. Bacterial Canker of
601 Tomato: Current Knowledge of Detection, Management, Resistance and Interactions.
602 *Plant Disease* **99**, 4-13.
- 603 Silva JBC, Giordano LB, 2000. *Tomate para processamento industrial*. Brasília, Brasil:
604 Embrapa Hortaliças, 168p.
- 605 Spooner DM, Peralta IE, Knapp S, 2005. Comparison of AFLPs to other markers for
606 phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L.] section *Lycopersicon*
607 (Mill.)Wettst. Subsection *Lycopersicon*]. *Taxon* **54**, 43-61.
- 608 Todorovskaa E, Ivanovaa A, Ganevab D, Pevicharovab G, Mollec E, Bojinovd B,
609 Radkovaa M, Danailove Z, 2014. Assessment of genetic variation in Bulgarian
610 tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes, using fluorescent SSR genotyping
611 platform. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **28**, 68-76.
- 612 Van Steekelenburg NAM, 1985. Resistance to *Corynebacterium michiganensis* in
613 tomato genotypes. *Euphytica* **34**, 245-250.
- 614 Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP, 2009. Bacterial extracellular polysaccharides
615 involved in biofilm formation. *Molecules* **14**, 2535-2554.
- 616 Wang J, Hanson P, Barnes JA, 1998. Worldwide evaluation of an international set of
617 resistance sources to bacterial wilt in tomato. In: Prior S, Allen C, Elphinstone J, eds.
618 *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 269-275. Berlin,
619 Germany: Springer Verlag.
- 620 Wicker E, Grassrt L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M, Prior P,
621 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies)

- 622 exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* **73**,
623 6790-6801.
- 624 Zhang Y, Qiu S, 2016. Phylogenomic analysis of the genus *Ralstonia* based on 686
625 single-copy genes. *Antonie van Leeuwenhoek* **109**, 71-82.

626 **Tabela 1.** Características dos isolados de *Ralstonia* spp. utilizados para identificação de acessos
 627 silvestres de *Solanum* spp. secção *Lycopersicon* com resistência local à murcha bacteriana no Brasil

Isolado ^a	Espécie	Hospedeiro	Região	Biovar	Filotipo/ Sequevar
Grupo Rs1					
CRMRs218	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Berinjoleira	Nordeste	3	I-18
CRMRs185	<i>R. solanacearum</i>	Tomateiro	Nordeste	1	IIA-50
Grupo Rs2					
CRMRs134	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Tomateiro	Nordeste	3	I-17
CRMRs205	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Tomateiro	Nordeste	3	I-18
CRMRs91	<i>R. solanacearum</i>	Tomateiro	Nordeste	1	IIA-58
CRMRs120	<i>R. solanacearum</i>	Tomateiro	Nordeste	1	IIA-50
CRMRs121	<i>R. solanacearum</i>	Tomateiro	Nordeste	1	IIA-59
CRMRs123	<i>R. solanacearum</i>	Tomateiro	Nordeste	1	IIA-50
CRMRs211	<i>R. solanacearum</i>	Tomateiro	Nordeste	1	IIA-50
Grupo Rs3					
CNPH 551	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Tomateiro	Centro-Sul	3	I
CNPH 608	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Tomateiro	Centro-Sul	3	I
CNPH 489	<i>R. solanacearum</i>	Tomateiro	Centro-Sul	1	II
CNPH 612	<i>R. solanacearum</i>	Tomateiro	Centro-Sul	1	II
CNPH 613	<i>R. solanacearum</i>	Tomateiro	Centro-Sul	1	II

628 ^aGrupo Rs1: isolados utilizados na identificação inicial dos acessos; Grupo Rs2: isolados
 629 oriundos da região Nordeste; Grupo Rs3: isolados oriundos da região Centro-Sul (Centro-
 630 Oeste, Sudeste e Sul do Brasil); CRM: Coleção de Culturas Rosa Mariano do Laboratório
 631 de Fitobacteriologia, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, da Universidade
 632 Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil; CNPH: Banco de Germoplasma da
 633 Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, Brasil.

634 **Tabela 2.** Acessos silvestres de tomateiro secção *Lycopersicon* analisados quanto à
 635 resistência à murcha bacteriana em tomateiro no Brasil

Acesso ^a	Genótipo correspondente	Espécie	Origem
Grupo WS1			
CNPH ¹ 410	LA 1927	<i>S. chilense</i>	EUA
CNPH 943	LA 1967	<i>S. chilense</i>	Japão
CNPH 1238	LA 1938	<i>S. chilense</i>	Peru
CNPH 1762	LA 1326	<i>S. neorickii</i>	Espanha
CNPH 1764	LA 2200	<i>S. neorickii</i>	Espanha
CNPH 944	LA 1036	<i>S. chmielewskii</i>	Japão
CNPH 1022	-	<i>S. chmielewskii</i>	Holanda
CNPH 416	PI 126445	<i>S. habrochaites</i>	Peru
CNPH 417	PI 126449	<i>S. habrochaites</i>	Peru
CNPH 420	PI 127826	<i>S. habrochaites</i>	Peru
CNPH 421	PI 127827	<i>S. habrochaites</i>	Peru
CNPH 423	PI 134417	<i>S. habrochaites</i>	Equador
CNPH 424	PI 134418	<i>S. habrochaites</i>	Equador
CNPH 928	WYR 395	<i>S. habrochaites</i>	Japão
CNPH 929	WYR 7924	<i>S. habrochaites</i>	Japão
CNPH 1034	-	<i>S. habrochaites</i>	Holanda
CNPH 1112	SELVAGEM	<i>S. habrochaites</i>	EUA
CNPH 1121	L 03683	<i>S. habrochaites</i>	China
CNPH 1122	L 03684	<i>S. habrochaites</i>	China
CNPH 1286	PI 251304	<i>S. habrochaites</i>	Equador
CNPH 1287	PI 126445	<i>S. habrochaites</i>	Peru
CNPH 1288	PI 247087	<i>S. habrochaites</i>	Equador
CNPH 1290	PI 126449	<i>S. habrochaites</i>	Chile
CNPH 1410	Hirsutum	<i>S. habrochaites</i>	Peru
CNPH 200	PI 732293	<i>S. pimpinellifolium</i>	Brasil
CNPH 415	PI 126436	<i>S. pimpinellifolium</i>	Peru
CNPH 418	PI 126925	<i>S. pimpinellifolium</i>	Peru
CNPH 419	PI 126931	<i>S. pimpinellifolium</i>	Peru
CNPH 597	WIR 2920	<i>S. pimpinellifolium</i>	Argentina
CNPH 789	LA 1341	<i>S. pimpinellifolium</i>	Peru
CNPH 790	LA 1342	<i>S. pimpinellifolium</i>	Peru
CNPH 925	LA 1614	<i>S. pimpinellifolium</i>	Japão
CNPH 955	-	<i>S. pimpinellifolium</i>	Japão
CNPH 1037	-	<i>S. pimpinellifolium</i>	Holanda

CNPH 1038	LUTEUM	<i>S. pimpinellifolium</i>	Holanda
CNPH 1039	-	<i>S. pimpinellifolium</i>	Holanda
CNPH 1040	-	<i>S. pimpinellifolium</i>	Holanda
CNPH 1124	L 03708	<i>S. pimpinellifolium</i>	China
CNPH 1195	CGO 7650	<i>S. pimpinellifolium</i>	Cristiano C. Lacorte
CNPH 1555	LA 1762	<i>S. pimpinellifolium</i>	EUA
CNPH 1556	LA 2934 – PI	<i>S. pimpinellifolium</i>	EUA
CNPH 1678	EELM-L	<i>S. pimpinellifolium</i>	Espanha
CNPH 1742	LA 1607	<i>S. pimpinellifolium</i>	Espanha
Grupo WS2			
	Príncipe		
CNPH 095	Gigante	<i>S. lycopersicum</i>	CNPH
CNPH 427	IRAT-L3	<i>S. lycopersicum</i>	CNPH
CNPH 428	72-TR-4-4 (=NC72)	<i>S. lycopersicum</i>	CNPH
CNPH 429	Monense	<i>S. lycopersicum</i>	CNPH
CNPH 487	Rodade	<i>S. lycopersicum</i>	África do Sul
CNPH 698	Ohio 4013	<i>S. lycopersicum</i>	CNPH
CNPH 699	Bulgaria 12	<i>S. lycopersicum</i>	CNPH
CNPH 700	Heinz 2990	<i>S. lycopersicum</i>	CNPH
CNPH 701	Utah 737	<i>S. lycopersicum</i>	CNPH
CNPH 702	MR-4	<i>S. lycopersicum</i>	CNPH
CNPH 870	Okitsu Sozai n. 1	<i>S. hirsutum</i> var. <i>glabratum</i>	Japão
CNPH 949	Rotam-4	<i>S. lycopersicum</i>	CNPH
CNPH 1464	LA 2157	<i>S. peruvianum</i>	CNPH
CNPH 1772	LA 407 (=PI 251304)	<i>S. habrochaites</i>	CNPH

636 ^aGrupo WS1: acessos silvestres de *Solanum* secção *Lycopersicon* para seleção à murcha
637 bacteriana. Grupo WS2: genótipos de *Solanum* spp. com resistência ao cancro bacteriano,
638 relatados na literatura. CNPH: Acessos provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa
639 Hortaliças, Brasília-DF, Brasil.

640 **Tabela 3.** Identificação inicial de tomateiros silvestres de *Solanum* spp. secção
 641 *Lycopersicon* com resistência à murcha bacteriana, em casa de vegetação

Acessos ^a	<i>Ralstonia</i> <i>pseudosolanacearum</i> CRMRS218			<i>Ralstonia solanacearum</i> CRMRS185		
	INC ^b	IC ^b	F ^b	INC	IC	F
Hawaii 7996	0,0	8,3	AR	0,0	0,0	AR
Yoshimatsu	8,3	16,6	AR	0,0	0,0	AR
CNPH 1037	0,0	0,0	AR	0,0	8,3	AR
CNPH 1195	0,0	75,0	IL	0,0	16,7	AR
CNPH 1124	0,0	75,0	IL	25,0	41,7	MR
CNPH 1038	25,0	50,0	MR	25,0	33,3	MR
CNPH 597	0,0	50,0	MR	33,3	50,0	MR
CNPH 1039	0,0	8,3	AR	33,3	33,3	MR
CNPH 1678	0,0	66,7	IL	33,3	41,6	MR
CNPH 418	41,6	75,0	MS	41,6	50,0	PR
CNPH 1034	33,3	33,3	MR	41,6	36,4	PR
CNPH 421	25,0	25,0	MR	50,0	50,0	MS
CNPH 420	8,3	8,3	AR	50,0	50,0	MS
CNPH 944	8,3	41,6	MR	58,3	58,3	MS
CNPH 410	66,6	66,7	MS	58,3	58,3	MS
CNPH 200	58,3	66,6	MS	58,3	66,6	MS
CNPH 1238	50,0	66,7	MS	58,3	58,3	MS
CNPH 943	16,6	41,7	MR	66,6	66,7	MS
CNPH 925	0,0	83,3	IL	66,6	66,7	MS
CNPH 1762	75,0	91,7	MS	66,6	66,7	MS
CNPH 416	33,3	33,3	MR	75,0	75,0	MS
CNPH 789	50,0	83,3	MS	83,3	83,3	MS
CNPH 1287	16,6	16,7	MR	83,3	83,3	AS
CNPH 1040	0,0	0,0	AR	83,3	83,3	AS
CNPH 1742	8,3	58,3	IL	83,3	83,3	AS
CNPH 928	91,6	100,0	AS	83,3	91,6	AS
CNPH 790	16,6	66,7	IL	91,6	100,0	AS
CNPH 1764	25,0	75,0	IL	91,6	91,7	AS
CNPH 955	41,6	75,0	MS	91,6	91,7	AS
CNPH 1555	58,3	58,3	MS	91,6	100,0	AS
CNPH 929	75,0	100,0	MS	91,6	100,0	AS
CNPH 1121	75,0	75,0	MS	91,6	91,7	AS
CNPH 1112	75,0	91,7	MS	91,6	91,7	AS
CNPH 423	66,6	83,4	MS	91,6	100,0	AS

CNPH 1556	0,0	0,0	AR	91,6	91,7	AS
CNPH 1286	66,6	75,0	IL	100,0	100,0	AS
CNPH 1410	50,0	58,3	IL	100,0	100,0	AS
CNPH 1288	41,6	41,7	PR	100,0	100,0	AS
CNPH 1290	8,3	33,3	MR	100,0	100,0	AS
CNPH 419	33,3	83,3	IL	100,0	100,0	AS
CNPH 415	75,0	100,0	MS	100,0	100,0	AS
CNPH 1022	58,3	74,9	MS	100,0	100,0	AS
CNPH 1122	91,6	100,0	AS	100,0	100,0	AS
CNPH 424	66,6	91,7	MS	100,0	100,0	AS
CNPH 417	83,3	100,0	AS	100,0	100,0	AS
Caline IPA-6	100,0	100,0	AS	100,0	100,0	AS

642 ^aCNPH: acessos provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa
643 Hortaliças, Brasília-DF; Hawaii 7996 e Yoshimatsu = padrões de resistência e
644 Caline IPA-6 = cultivar suscetível. ^bINC = Incidência da doença ; IC = índice
645 de colonização, calculado por $IC = INC + [(Ns * Rs)/100]$, onde Ns a
646 porcentagem de plantas assintomáticas e Rs a porcentagem de plantas
647 assintomáticas com infecção latente; F = fenótipo, determinado pela relação
648 INC/IC adaptado de Lebeau *et al.* (2011), onde AR: altamente resistente (INC= 0-13,3% e IC= 0-16,7%), MR: moderadamente resistente (INC= 0-33,3% e
649 IC= 16,7-50%), PR: parcialmente resistente (INC= 26,7-43,6% e IC= 43,3-
650 60%), IL: infecção latente (INC= 0-36,7% e IC= 53,3-100%), MS:
651 moderadamente suscetível (INC= 40-80% e IC= 46,7-100%) e AS: altamente
652 suscetível (INC= 83,3-100% e IC= 86,7-100%).
653

654 **Tabela 4.** Amplitude de resistência de tomateiros silvestres de *Solanum* spp. secção *Lycopersicon* a isolados de *Ralstonia* spp. da região Nordeste
 655 do Brasil, em casa de vegetação

Acesso ^a	<i>R. pseudosolanacearum</i>						<i>R. solanacearum</i>														
	CRMRs 134			CRMRs 205			CRMRs 91			CRMRs 120			CRMRs 121			CRMRs 123			CRMRs 211		
	INC ^b	IC ^b	F ^b	INC	IC	F	INC	IC	F	INC	IC	F	INC	IC	F	INC	IC	F	INC	IC	F
CNPH 418	30,0	55,0	PR	65,0	90,0	MS	60,0	80,0	MS	45,0	85,0	MS	30,0	30,0	MR	75,0	85,0	MS	45,0	60,0	MS
CNPH 420	60,0	70,0	MS	90,0	100,0	AS	25,0	45,0	MR	-	-	-	-	-	-	75,0	80,0	MS	-	-	-
CNPH 421	60,0	60,0	MS	100,0	100,0	AS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	85,0	95,0	AS	-	-	-
CNPH 597	15,0	55,0	MR	40,0	85,0	MS	25,0	40,0	MR	35,0	60,0	PR	45,0	45,0	PR	60,0	90,0	MS	10,0	50,0	MR
CNPH 944	50,0	55,0	MS	85,0	95,0	AS	85,0	100,0	AS	100,0	100,0	AS	60,0	65,0	MS	85,0	90,0	AS	15,0	30,0	MR
CNPH 1037	30,0	40,0	MR	70,0	80,0	MS	55,0	65,0	MS	20,0	50,0	MR	45,0	45,0	PR	55,0	65,0	MS	15,0	20,0	MR
CNPH 1038	10,0	50,0	MR	25,0	35,0	MR	45,0	55,0	MS	5,0	30,0	MR	10,0	25,0	MR	55,0	80,0	MS	5,0	15,0	AS
CNPH 1039	50,0	55,0	MS	50,0	55,0	MS	35,0	35,0	PR	40,0	90,0	MS	40,0	45,0	PR	40,0	55,0	MS	15,0	20,0	MR
CNPH 1124	20,0	70,0	IL	-	-		30,0	60,0	PR	25,0	25,0	MR	5,0	10,0	AS	85,0	90,0	AS	15,0	20,0	MR
CNPH 1195	20,0	45,0	MR	90,0	95,0	AS	75,0	85,0	MS	25,0	55,0	IL	30,0	35,0	MR	100,0	100,0	AS	25,0	25,0	MR
CNPH 1678	60,0	90,0	MS	85,0	85,0	AS	0,0	30,0	MR	-	-	-	-	-	-	75,0	90,0	MS	-	-	.-
Hawaii 7996	0,0	10,0	AR	0,0	20,0	AR	5,0	20,0	AR	20,0	20,0	MR	10,0	20,0	MR	15,0	30,0	MR	0,0	15,0	AR
Caline IPA-6	95,0	100,0	AS	100,0	100,0	AS	95,0	100,0	AS	100,0	100,0	AS	65,0	65,0	MS	100,0	100,0	AS	85,0	95,0	AS

656 ^aCNPH: acessos provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, Brasil; Hawaii 7996 e Caline IPA-6: controles resistente e suscetível à murcha
 657 bacteriana, respectivamente; ^bINC = Incidência da doença ; IC = índice de colonização, calculado por $IC = INC + [(Ns * Rs)/100]$, onde Ns a porcentagem de plantas
 658 assintomáticas e Rs a porcentagem de plantas assintomáticas com infecção latente; F = fenótipo, determinado pela relação INC/IC, adaptado de Lebeau *et al.* (2011), onde AR:
 659 altamente resistente (INC= 0-13,3% e IC= 0-16,7%), MR: moderadamente resistente (INC= 0-33,3% e IC = 16,7-50%), PR: parcialmente resistente (INC= 26,7-43,6% e IC=
 660 43,3-60%), IL: infecção latente (INC= 0-36,7% e IC= 53,3-100%), MS: moderadamente suscetível (INC= 40-80% e IC= 46,7-100%) e AS: altamente suscetível (INC= 83,3-
 661 100% e IC= 86,7-100%); (-) interação acesso-isolado não analisada.

662 **Tabela 5.** Amplitude de resistência de acessos silvestres de *Solanum* spp. secção *Lycopersicon* a isolados de *Ralstonia* spp. da região Centro-
 663 Sul do Brasil, em casa de vegetação

Acesso ^a	<i>R. pseudosolanacearum</i>						<i>R. solanacearum</i>								
	CNPH 551			CNPH 608			CNPH 489			CNPH 612			CNPH 613		
	INC ^b	IC ^b	F ^b	INC	IC	F	INC	IC	F	INC	IC	F	INC	IC	F
CNPH418	85,0	90,0	AS	75,0	95,0	MS	35,0	55,0	PR	5,0	5,0	AR	85,0	95,0	AS
CNPH420	100,0	100,0	AS	100,0	100,0	AS	40,0	85,0	MS	95,0	100,0	AS	55,0	55,0	MS
CNPH421	70,0	100,0	MS	70,0	80,0	MS	15,0	65,0	IL	20,0	40,0	MR	90,0	90,0	AS
CNPH597	60,0	90,0	MS	75,0	90,0	MS	25,0	30,0	MR	5,0	35,0	MR	100,0	100,0	AS
CNPH944	100,0	100,0	AS	80,0	80,0	MS	40,0	65,0	MS	30,0	65,0	IL	95,0	100,0	AS
CNPH1037	60,0	90,0	MS	35,0	35,0	PR	45,0	45,0	PR	15,0	65,0	IL	70,0	100,0	MS
CNPH1038	80,0	90,0	MS	40,0	85,0	MS	35,0	45,0	PR	0,0	50,0	MR	75,0	95,0	MS
CNPH1039	50,0	85,0	MS	50,0	85,0	MS	10,0	30,0	MR	15,0	50,0	MR	50,0	95,0	MS
CNPH1124	100,0	100,0	AS	65,0	85,0	MS	25,0	55,0	PR	5,0	45,0	MR	80,0	100,0	MS
CNPH1195	85,0	95,0	AS	70,0	100,0	MS	25,0	35,0	MR	20,0	55,0	IL	50,0	85,0	MS
CNPH1678	75,0	80,0	MS	75,0	85,0	MS	45,0	45,0	PR	10,0	45,0	MR	35,0	100,0	IL
Hawaii 7996	0,0	5,0	AR	0,0	40,0	MR	5,0	25,0	MR	0,0	15,0	AR	0,0	60,0	IL
Caline IPA-6	100,0	100,0	AS	100,0	100,0	AS	60,0	90,0	MS	95,0	100,0	AS	75,0	100,0	MS

664 ^aCNPH: acessos provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, Brasil; Hawaii 7996 e Caline IPA-6: controles resistente e suscetível à
 665 murcha bacteriana, respectivamente; ^bINC = Incidência da doença; IC = índice de colonização, calculado por $IC = INC + [(Ns * Rs)/100]$, onde Ns a porcentagem de plantas
 666 assintomáticas e Rs a porcentagem de plantas assintomáticas com infecção latente; F = fenótipo, determinado pela relação INC/IC, adaptado de Lebeau *et al.* (2011), onde
 667 AR: altamente resistente (INC= 0-13,3% e IC= 0-16,7%), MR: moderadamente resistente (INC= 0-33,3% e IC = 16,7-50%), PR: parcialmente resistente (INC= 26,7-43,6%
 668 e IC= 43,3-60%), IL: infecção latente (INC= 0-36,7% e IC= 53,3-100%), MS: moderadamente suscetível (INC= 40-80% e IC= 46,7-100%) e AS: altamente suscetível
 669 (INC= 83,3-100% e IC= 86,7-100%).

Tabela 6. Resistência à murcha bacteriana em genótipos de tomateiro resistentes ao cancro bacteriano, em casa de vegetação

Genótipo	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>				<i>Ralstonia solanacearum</i>	
	CRMRS 218		CNPH 551		CRMRS 185	
	INC ^b	SEVf ^b	INC	SEVf	INC	SEVf
Hawaii 7996	0,0 ^c d	1,0 d	93,3 a	4,3 c	60,0 b	2,6 c
CNPH 428 (72-TR-4-4)	0,0 d	1,0 d	93,3 a	4,7 b	100,0 ^d a	5,0 a
CNPH 427 (IRAT-L3)	6,7 d	1,3 d	100,0 a	5,0 c	73,3 b	3,9 b
CNPH 702 (MR-4)	20,0 c	1,7 d	93,3 a	4,7 b	73,3 b	3,5 b
CNPH 095 (Príncipe Gigante)	26,7 c	2,1 c	100,0 a	5,0 c	93,3 a	4,7 a
CNPH 949 (Rotam-4)	33,3 c	2,1 c	100,0 a	5,0 c	86,7 a	4,5 a
CNPH 487 (Rodade)	40,0 c	2,2 c	100,0 a	5,0 c	100,0 a	5,0 a
CNPH 429 (Monense)	46,7 c	2,7 c	100,0 a	5,0 c	80,0 b	3,8 b
CNPH 698 (Ohio 4013)	60,0 b	3,3 b	100,0 a	5,0 c	100,0 a	4,3 a
CNPH 699 (Bulgaria 12)	60,0 b	3,2 b	100,0 a	5,0 c	86,7 a	4,3 a
CNPH 701 (Utah 737)	60,0 b	3,1 b	93,3 a	4,7 b	73,3 b	3,5 b
CNPH 700 (Heinz 2990)	80,0 a	3,9 b	100,0 a	5,0 c	93,3 a	4,7 a
CNPH 870 (Okitsu Sozai n. 1)	80,0 a	3,6 b	100,0 a	5,0 c	80,0 b	3,8 b
CNPH 1464 (LA 2157)	93,3 a	4,6 a	100,0 a	5,0 c	93,3 a	4,5 a
CNPH 1772 (LA 407; PI 251304)	100,0 a	4,8 a	100,0 a	5,0 c	93,3 a	4,7 a
L-390	86,7 a	4,5 a	100,0 a	5,0 c	100,0 a	5,0 a
C.V.	65,4	54,1	13,1	10,7	38,1	30,9

^aCNPH: acessos de *Solanum* spp. com reconhecida resistência ao cancro bacteriano provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, Brasil; Hawaii 7996 e L-390: controles resistente e suscetível à murcha bacteriana, respectivamente. ^bINC = Incidência da doença; SEVf = severidade final da doença, baseada em escala descritiva de Nielsen & Haynes (1960) que varia 1 a 5, onde: 1 = sem sintoma, 2 = plantas com 1/3 de folhas murchas, 3 = plantas com 2/3 de folhas murchas, 4 = planta murcha e 5 = planta morta. ^cMédias de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de agrupamento de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

CAPÍTULO IV

Genes diferencialmente expressos na quebra de resistência de *Solanum lycopersicum* linhagem Hawaii 7996 por *Ralstonia solanacearum*

1 **Genes diferencialmente expressos na quebra de resistência de *Solanum lycopersicum***
2 **linhagem Hawaii 7996 por *Ralstonia solanacearum***

3
4 Greecy M. R. Albuquerque¹, Adriano M.F. Silva¹, Rosa L.R. Mariano¹, Carlos A. Lopes³,
5 Leonardo S. Boiteux³, Maria Esther N. Fonseca-Boiteux³, Elineide B. Souza^{2*}

6 ¹Departamento de Agronomia, ²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de
7 Pernambuco, Recife-PE, Brasil, ³Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, Brasil.

8 *Email: elineidebs@yahoo.com.br

9
10 **RESUMO**

11
12 A linhagem de *Solanum lycopersicum* Hawaii 7996 é considerada a fonte de resistência mais
13 estável à murcha bacteriana, no entanto, teve a resistência quebrada por alguns isolados de
14 *Ralstonia solanacearum* do Brasil. A quebra de resistência por isolados locais de *R.*
15 *solanacearum* foi investigada pela expressão diferencial e temporal de genes transcritos a partir
16 de análise do transcriptoma por RNASeq. Nos tempos 24h e 96h após inoculação (hpi), 3279 e
17 4179 genes foram diferencialmente expressos, respectivamente, dos quais 107 genes
18 relacionados à quebra de resistência foram analisados. A maioria dos genes foi identificada
19 como pertencentes às glucanas, ubiquitinas, auxinas, porinas, genes de ligação de íons cálcio e
20 genes associados a resistência a estresses de natureza biótica e abiótica. O maior número de
21 genes consistiu de auxinas (n=34), glucanas (n=33) e ubiquitinas (n=9). Este é o primeiro
22 trabalho que caracterizou a expressão de genes durante a quebra de resistência de Hawaii 7996
23 à murcha bacteriana, sendo identificados novos genes associados a resistência e quebra de
24 resistência desta linhagem.

25
26 **Palavras-chave:** Transcriptoma, RNASeq, DEGs, murcha bacteriana, tomate

27
28 **ABSTRACT**

29
30 The lineage of *Solanum lycopersicum* Hawaii 7996 is considered to be the most stable source
31 of resistance to tomato bacterial wilt. However, this resistance was broken by some strains of
32 *Ralstonia solanacearum* from Brazil. This breakdown of resistance by local strains of *R.*
33 *solanacearum* was investigated by the differential and temporal expression of genes transcribed

34 from transcriptome analysis by RNASeq. At times 24h and 96h post inoculation (hpi), 3279
35 and 4179 genes were differentially expressed, respectively, of which 107 genes related to
36 resistance breakdown were analyzed. Most genes have been identified as belonging to glucans,
37 ubiquitins, auxins, porins, calcium ion binding genes, and genes associated with resistance to
38 biotic and abiotic stresses. The highest number of genes consisted of auxins (n = 34), glucans
39 (n = 33) and ubiquitins (n = 9). This is the first work that characterized the expression of genes
40 during the breakdown of resistance of Hawaii 7996 to bacterial wilt; furthermore new genes
41 associated with resistance and resistance breakdown of this lineage were identified.

42

43 **Keywords:** Transcriptome, RNASeq, DEGs, bacterial wilt, tomato

44

45 1. Introdução

46

47 A linhagem de *Solanum lycopersicum* Hawaii 7996 é a fonte de resistência mais estável à
48 murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (filotipo II), *R. pseudosolanacearum*
49 (filotipos I e III) e *Ralstonia indonesisensis* (filotipo IV) [11], apresentando maior amplitude de
50 resistência a diversos isolados de *Ralstonia* spp. e sendo caracterizada como padrão
51 internacional de resistência a essa doença [8]. Contudo, alguns isolados de *R. solanacearum*
52 têm quebrado a resistência de Hawaii 7996, como aqueles pertencentes à sequevar IIA-4NPB
53 em Martinica [15], o isolado Pss190 (*R. pseudosolanacearum*, biovar 1) em Taiwan [5] e os
54 isolados de CNPH 488 (biovar 2A, tomateiro, Maranhão) [8] e CRMRS223 (biovar 1, tomateiro,
55 Pernambuco) no Brasil.

56 A resistência natural à murcha bacteriana encontrada em algumas espécies é normalmente
57 herdada como um traço poligênico. Em tomateiro, vários QTLs (locos de características
58 quantitativas) foram detectados controlando a resistência e diversos estudos com diferentes
59 isolados da bactéria identificaram que um QTL localizado no cromossomo 6, o qual
60 desempenha papel predominante no controle desta característica [1,13,14].

61 A análise genética da resistência através de dados de transcriptoma, obtidos por
62 hibridização em microarranjos e RNASeq, tem sido realizada visando comparar e identificar
63 genes relacionados a resistência, comparando os transcritos entre cultivares resistentes e
64 suscetíveis. Trabalhos relacionados à murcha bacteriana têm sido desenvolvidos com pimentão
65 (*Capsicum annuum*) [6], tomateiro (*S. lycopersicum*) [7], *S. commersonii* [16], cúrcuma
66 (*Curcuma amada*) e gengibre (*Zingiber officinale*) [10], comparando a

67 resistência/suscetibilidade através de dados de microarranjos. Na linhagem de tomateiro Hawaii
68 7996 foi analisado apenas a expressão dos genes β -1,3-glucanase, verificando-se aumento da
69 expressão do respectivo gene quando comparado a cultivares suscetíveis de tomateiro [7].

70 Considerando a quebra da resistência de ‘Hawaii 7996’ por isolados de *R. solanacearum* e
71 a ausência de estudos identificando genes expressos durante a quebra da resistência, o objetivo
72 deste trabalho foi analisar o perfil de expressão de genes por RNASeq em raízes e caules da
73 linhagem Hawaii 7996 e relacioná-lo à quebra de resistência causada por isolados de *R.*
74 *solanacearum* do Brasil.

75

76 **2. Material e Métodos**

77

78 *2.1. Material vegetal e isolados bacterianos*

79

80 Plantas de ‘Hawaii 7996’ de *S. lycopersicum* (resistente) e a cultivar Caline IPA-6
81 (Hortivale[®]) (suscetível) foram inoculadas com dois isolados de *R. solanacearum* que
82 quebraram a resistência de Hawaii 7996: CNPH488 (biovar 2A, tomateiro, Maranhão, Brasil)
83 [8] e CRMRS223 (biovar 1, tomateiro, Pernambuco, Brasil), e com o isolado CNPH489 (biovar
84 1, tomateiro, Paraná, Brasil) que é patogênico a ‘Caline IPA-6’ e não causa murcha em Hawaii
85 7996.

86 Plantas com 30 dias de idade, após semeio em bandejas de poliestireno contendo substrato
87 Rohrbacher[®], foram inoculadas com 5 mL de suspensão dos isolados (1×10^8 UFC.mL⁻¹) pelo
88 método de pulverização de suspensão de raízes+torrão [9], seguido de transplântio para vasos
89 de 500 mL contendo solo (85% de subsolo do cerrado peneirado, 5% de casca de arroz seca e
90 10% de casca de arroz carbonizada, enriquecido com 100 g de calcário dolomítico, 200 g de
91 superfosfato simples e 60 g de sulfato de amônio para cada 100 L de substrato). O experimento
92 foi realizado em casa de vegetação ($T_{\text{Min/Max}}$:17,2/46,4°C; $UR_{\text{Min/Max}}$:14,7/78,7%), em
93 delineamento inteiramente casualizado, com de três repetições de 10 plantas cada.

94

95 *2.2. Coleta dos tecidos, extração do RNA total e sequenciamento do cDNA*

96

97 Um mix de raízes e caules de cada tratamento (material/isolado/tempo/repetição) foi
98 coletado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, nos tempos 24h e 96h após
99 inoculação (hpi) e armazenadas em ultrafreezer a -80°C, até a extração do RNA. Plantas não-

100 inoculadas foram coletadas no tempo 0h, constituindo o tratamento controle (Mock-não
101 inoculado).

102 O RNA total de cada tratamento foi extraído a partir do macerado do mix de tecidos, em
103 nitrogênio líquido, utilizando o protocolo TRI Reagent® (Sigma Aldrich, EUA) e ressuspenso
104 em água livre de nucleases, conforme recomendações do fabricante. Foram realizadas extrações
105 em triplicatas para cada tratamento/repetição.

106 A quantidade e qualidade do RNA foi analisada em espectrofotômetro NanoDrop™
107 (Thermo Fisher Scientific) e em gel de agarose a 1%. Uma a duas amostras de cada repetição
108 biológica/tratamento que apresentaram alta qualidade do RNA extraído (relação 260/280 >1,98)
109 foram analisadas quanto a integridade do RNA, em Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent
110 Technologies, EUA) com o kit RNA 6000 Nano LabChip (Agilent, Germany). Uma
111 amostra/repetição de cada tratamento, apresentando número de integridade de RNA (RIN) ≥
112 8,0 foi combinada (bulcada) em uma amostra única por tratamento, totalizando 14 livrarias.

113 As livrarias de cDNA foram preparadas utilizando o protocolo TruSeq Stranded mRNA
114 LT Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, EUA). As 14 livrarias independentemente
115 etiquetadas foram bulcadas e 160pb paired end reads foram sequenciados na Plataforma
116 Illumina HiSeq 2000 (HiScanSQ) utilizando o protocolo Illumina TruSeq® Stranded mRNA,
117 de acordo com recomendações do fabricante. O preparo das livrarias e sequenciamento do
118 cDNA foi realizado no Laboratório Multiusuários Centralizado, localizado no Centro de
119 Genômica Funcional da ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, SP, Brasil).

120

121 *2.3. Montagem, anotação funcional e análises de expressão de genes do transcriptoma*

122

123 A montagem do transcriptoma de Hawaii 7996 e 'Caline IPA-6 de cada livraria foi
124 realizada com base no genoma de tomateiro com anotações (versão 2.40-db), utilizando o
125 software SeqMan NGen14 (DNASTAR, Madison, WI, EUA).

126 A descrição funcional de cada transcrito diferencialmente expresso entre os tratamentos,
127 foi realizada no software Blast2GO [2], que integra os sistemas Blastx do NCBI com os
128 sistemas de categorização funcional do Gene Ontology Consortium e GO Slim Viewer. A
129 anotação de ontologias gênicas baseou-se em mineração de dados oriundos de sequências
130 públicas com anotação disponível, com homologia mínima de 60% entre as sequências. Ao
131 final foram geradas anotações no Blast2GO e importadas no ArrayStar 14 (DNASTAR,

132 Madison, WI, EUA) para análise da expressão global e diferencial dos genes (differentially
133 expressed genes - DEGs).

134 Os DEGs em cada livreria foram analisados no ArrayStar, ao nível de 2-fold change, sendo
135 a intersecção dos DEGs associados à quebra de resistência, analisada pelas interações entre os
136 tratamentos, em diagrama de Venn e Heat map. Foram analisadas a expressão de genes
137 relacionados a resistência à murcha bacteriana, relatados na literatura e identificados DEGs
138 associados à quebra de resistência, nos tempos 24h e 96 hpi.

139

140 **3. Resultados**

141

142 *3.1. Dados do RNASeq e montagem do transcriptoma*

143

144 Os adaptadores utilizados no sequenciamento foram automaticamente retirados das
145 seqüências dos fragmentos de DNA e os dados de RNASeq foram sumarizados e normalizados
146 em “Reads por milhões de Kilobases” (Reads per million Kilobases - RPKM) pelo programa
147 Seqman NGen.

148 Um total de $2,72 \times 10^8$ seqüências foram geradas a partir de fragmentos de 160 pares de
149 bases provenientes de 14 livrerias de cDNA (Tabela 1), as quais foram construídas a partir de
150 RNA extraído de raízes e caule de tomateiro, nos tempos 0, 24 e 96 hpi. Do total de $2,66 \times 10^8$
151 reads montados foram expressos 25.776 transcritos. A maioria dos genes foi identificado quanto
152 à ontologia em três categorias: função molecular, processos biológicos e componentes
153 celulares; outros genes não anotados foram analisados quanto a descrição.

154

155 *3.2. Genes diferencialmente expressos na quebra de resistência de Hawaii 7996*

156

157 A quebra de resistência de Hawaii 7996 foi analisada quanto às interações: (i) CNPH 488
158 x CNPH 489 e (ii) CRMRS223 x CNPH 489, nos tempos 24 e 96 hpi. Os dados foram plotados
159 em Diagrama de Venn (Fig. 1) e quantificados os genes diferencialmente expressos.

160 No tempo 24 hpi, foram expressos 3279 DEGs, dos quais 1020 e 1226 genes foram
161 detectados exclusivamente em CNPH 488 e CRMRS223, respectivamente, e 1033 genes
162 constituíram os genes expressos para os dois isolados (Fig. 1a). No tempo 96 hpi, 4179 DEGs
163 foram expressos, dos quais 1622 e 1197 genes foram exclusivos de CNPH 488 e CRMRS223,

164 respectivamente, e 1360 DEGs representaram a intersecção entre os dois isolados que quebram
165 a resistência (Fig. 1b).

166 Os DEGs da intersecção de CNPH 488 e CRMRS223, nos tempos 24 e 96 hpi, foram
167 selecionados como um grupo de genes, e analisados a 2-fold change quanto ao nível de
168 regulação, sendo caracterizados como down/up-regulados para os dois isolados e verificada a
169 relação com a resistência. Os DEGs comumente expressos nas plantas inoculadas com os dois
170 isolados foram plotados em um gráfico tipo Heat map (Fig. 2), a fim de visualizar o nível de
171 expressão dos genes entre os isolados CNPH 488, CRMRS223 e CNPH489, ao longo do tempo.
172 Foram observadas as interações nos tempos 24 e 96 hpi: (i) genes down ou up-regulados em
173 Hawaii 7996, concomitantemente, para as inoculações com os isolados CNPH 488 e
174 CRMRS223; (ii) genes down-regulados para CNPH 488 e up-regulados em CRMRS223, e vice-
175 versa; sendo estas regulações expressas ao mesmo tempo ou não.

176

177 *3.3. Identificação dos DEGs associados à quebra de resistência de Hawaii 7996*

178

179 A identificação dos genes associados à quebra de resistência à murcha bacteriana foi
180 analisada quanto à regulação da expressão de genes relacionados à resistência à murcha
181 bacteriana descritos na literatura. Foram detectados genes down-regulados na reação de quebra
182 de resistência, como glucanas (n=33), auxinas (n=34), porinas (n=1), genes de ligação ao íon
183 cálcio (n=9) e genes de resistência a estresses de natureza biótica e abiótica (n=10). Nas plantas
184 com quebra de resistência, às 24 hpi, foram down-regulados 10 genes associados às glucanases,
185 26 genes de auxinas, um gene de porina, sete genes de ligação a íons de cálcio e 13 genes
186 relacionados a resistência a fatores de natureza biótica e abióticas. No tempo 96 hpi, seis genes
187 de glucanas, oito de auxinas, dois genes de ligação a íons de cálcio e sete genes relacionados à
188 resistência à estresses de natureza biótica e abiótica, permaneceram down-regulados. Estes
189 genes down-regulados às 96 hpi foram up-regulados em CNPH 488 e/ou CRMRS223, às 24
190 hpi.

191 Novos genes associados à quebra de resistência de Hawaii 7996 foram buscados, pelos
192 transcritos down-regulados em CNPH 488 e CRMRS223 e up-regulados em CNPH 489 e já
193 reportados na literatura como relacionados à defesa de plantas contra fitopatógenos, sendo
194 identificados 25 novos genes down-regulados, representados na Tabela 1. Cerca de 48% desses
195 genes foram representados pelas ubiquitinas (n=12), sendo alguns expressos às 24 hpi e outros
196 às 96 hpi.

197 4. Discussão

198

199 Este estudo analisou a interação quebra versus resistência em Hawaii 7996 por dois
200 isolados de *R. solanacearum*, provenientes dos estados de Maranhão e Pernambuco, Nordeste
201 do Brasil, a fim de analisar a expressão gênica diferencial e temporal, por meio de RNASeq.

202 Na interação dos isolados que quebraram a resistência de Hawaii 7996, observou-se uma
203 maior expressão diferencial dos genes no tempo de 24 hpi, em comparação a 96 hpi como
204 observado no gráfico Heat map, evidenciando que a maioria dos processos de quebra de
205 resistência de Hawaii 7996 são ativados no início da interação tomateiro-*R. solanacearum*.

206 Glucanas, auxinas, porinas, genes de ligação ao íon cálcio e genes de resistência a estresses
207 de natureza biótica e abiótica têm sido associados à resistência à murcha bacteriana em *S.*
208 *commersonii* [16], e foram também relacionados à quebra de resistência em Hawaii 7996, por
209 serem down-regulados nas plantas inoculadas com CNPH 488 e CRMRS223 quando
210 comparados as plantas com CNPH 489. Nesse grupo destacaram-se os genes associados as
211 auxinas e glucanas pelo maior número de DEGs. As auxinas têm-se destacado como
212 reguladores chave na imunidade das plantas, atuando negativamente por interferir na
213 sinalização de outros hormônios [3]. As glucanas atuam hidroliticamente sobre a parede celular,
214 na permeabilidade da membrana plasmática, sinalização no processo de defesa ou inibição de
215 fitopatógenos e pragas [12].

216 Nas plantas com quebra de resistência de Hawaii 7996, foram detectados 33 genes de
217 glucanas substancialmente down-regulados, dos quais 70,6% reduziram sua expressão, no
218 início da interação. A xiloglucana endotransglucosilase hidrolase 7 (XTH-7) foi caracterizada
219 como principal fator de resistência à murcha em pimentão ‘KC350’, sendo expressa no início
220 da infecção e atuando na reestruturação e reforço da parede celular das plantas e restrição do
221 movimento das bactérias nos vasos do xilema [6]. Em Hawaii 7996 inoculado com CNPH 488
222 e CRMRS223 verificou-se que a xiloglucana endotransglucosilase hidrolase 26 é down-
223 regulada no início da reação de quebra de resistência (24 hpi) e que outras três enzimas
224 semelhantes, dentre as quais a XTH-7 são down-regulados tardiamente (96 hpi), afetando
225 diretamente na colonização de *R. solanacearum* nestas plantas e estando de acordo com o
226 fenótipo de quebra da resistência de Hawaii 7996. Também foram down-reguladas outras
227 endoglucanases nas plantas com quebra de resistência, como a β -1,4-glucanase (24 hpi), tendo
228 essa classe de gene sido relacionada a resistência à murcha bacteriana em tomateiro LS-89 e
229 Hawaii 7996 [7].

230 Na busca de novos genes associados à resistência e quebra de resistência de Hawaii 7996
231 destacaram-se as ubiquitinas, cuja expressão de nove genes foi down-regulada nas plantas de
232 Hawaii 7996 inoculadas com os isolados CNPH 488 e CRMRS223 e up-regulada nas
233 inoculadas com CNPH 489, a 2-fold change. As ubiquitinas têm sido associadas à defesa das
234 plantas em outros patossistemas, não tendo sido relatadas até então como genes de resistência
235 à murcha bacteriana. Essas proteínas desempenham um papel fundamental durante a regulação
236 da sinalização da imunidade das plantas, por estarem envolvidas nos primeiros passos de
237 percepção de fitopatógenos atuando, provavelmente, na modulação de padrões moleculares
238 associados à fitopatógenos por receptores de reconhecimento padrão na membrana plasmática
239 [4].

240 Além dos genes down-regulados que interferem diretamente na quebra de resistência
241 verificaram-se também que alguns genes, como os semelhantes a poligalacturonase,
242 calmodulina 3, endonuclease 2, ubiquitina E3-UPL5 ligase, AT4G27220 isoforma X2 de
243 provável resistência a doença e fatores de transcrição ligados ao etileno foram up-regulados nas
244 plantas com quebra de resistência, indicando que estes genes podem atuar na defesa dessas
245 plantas.

246

247 **5. Conclusão**

248 Este é o primeiro trabalho que caracterizou a expressão de genes durante a quebra de
249 resistência de Hawaii 7996 à murcha bacteriana, sendo identificados novos genes associados à
250 resistência e quebra de resistência desta linhagem, com destaque para as glucanas, sobretudo as
251 xiloglucanas endotransglucosilase hidrolases, além de auxinas e ubiquitinas.

252

253 **6. Agradecimentos**

254

255 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela
256 concessão de bolsa de Doutorado à G.M.R. Albuquerque e bolsa de produtividade à R. L.R.
257 Mariano (Proc. 309697/2011-5). A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de
258 Pernambuco (FACEPE) pela concessão de bolsa de fixador de pesquisador a A.M.F. Silva
259 (Proc. 0082-5.01/15). Ao CNPq pelo apoio financeiro a L.S. Boiteux e M.E.N. Fonseca-
260 Boiteux.

261

262 **7. Referências**

263

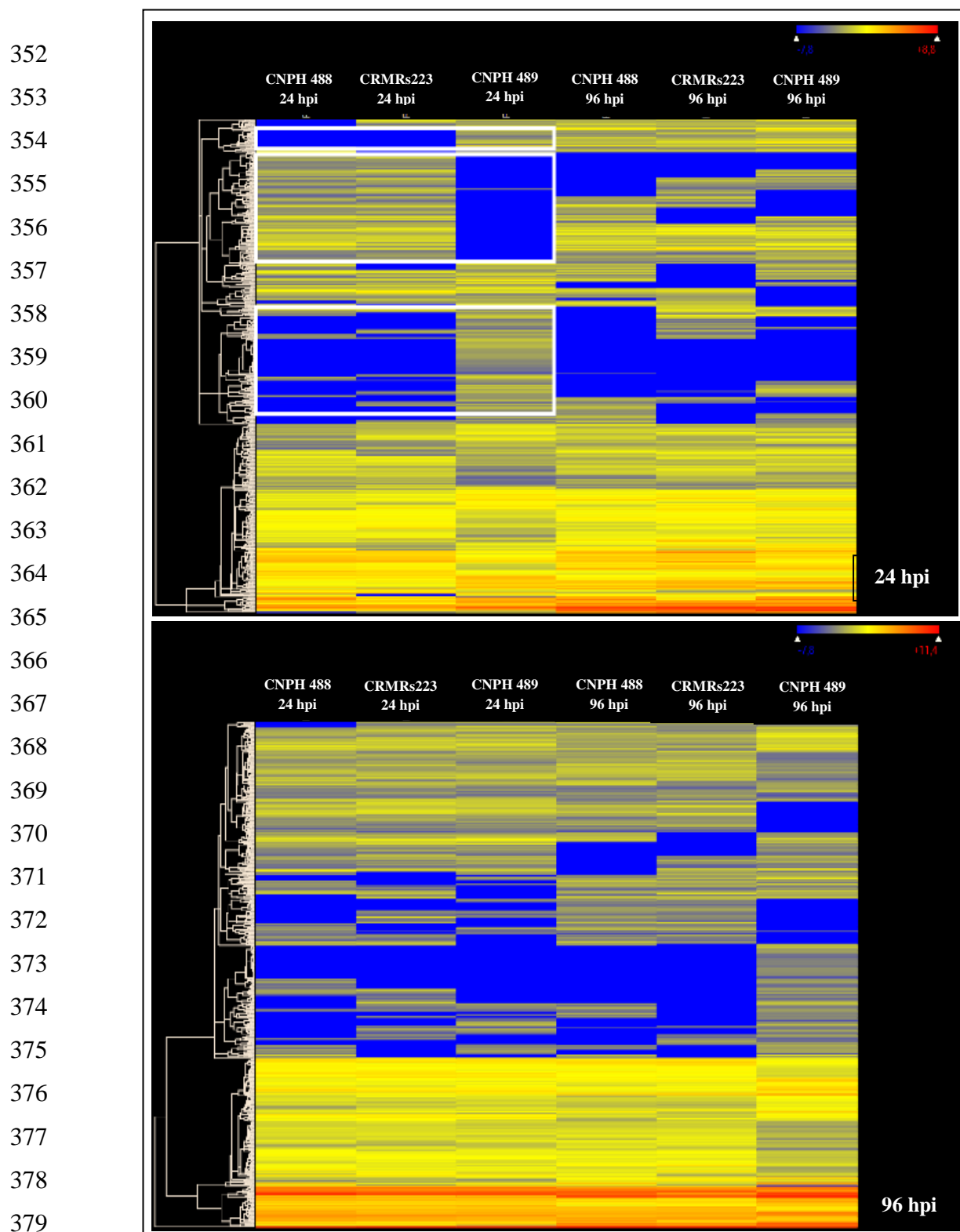
- 264 [1] Carmeille A, Caranta C, Diitinger J, Prior P, Luisetti J, Besse P. Identification of QTLs
265 for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. *Theory applied*
266 *Genetics* 2006; 113:110-121. <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-006-0277-3>.
- 267 [2] Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: a universal
268 tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.
269 *Bioinformatics* 2005; 21: 3674-3676. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>.
- 270 [3] Denancé N, Sánchez-Vallet A, Goffner D, Molina A. Disease resistance or growth: the
271 role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front Plant Sci*
272 2013; 4:155-166. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00155>.
- 273 [4] Duplan V, Rivas S. E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of
274 plant innate immunity. *Front Plant Sci* 2014; 5: 42-47.
275 <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00042>.
- 276 [5] Hai TTH, Esch E, Wang JF. Resistance to Taiwanese race 1 strains of *Ralstonia*
277 *solanacearum* in wild tomato germplasm. *Eur J Plant Pathol* 2008; 122:471-479.
278 <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-008-9314-1>.
- 279 [6] Hwang BF, Lee YL, Jaakkola JJ. Air pollution and stillbirth: a population-based case-
280 control study in Taiwan. *Environm Health Persp* 2011; 119:1345-1349.
281 <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003056>.
- 282 [7] Ishihara T, Mitsuhara I, Takahashi H, Nakaho K. Transcriptome analysis of quantitative
283 resistance specific response upon *Ralstonia solanacearum* infection in tomato. *PLOS*
284 *ONE* 2012; 7:1-14. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046763>.
- 285 [8] Lopes CA, Boiteux LS, Eschemback V. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de
286 tomateiro no controle da murcha-bacteriana. *Horticultura Brasileira* 2015; 33:125-130.
287 <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620150000100020>.
- 288 [9] Lopes CA, Boiteux LS. Melhoramento para resistência a doenças bacterianas. In: Fritsche-
289 Neto R, Borém A, eds. *Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Bióticos*.
290 Visconde do Rio Branco: Suprema; 2012, p. 61-88.
- 291 [10] Prasath D, Karthika R, Habeeba NT, Suraby EJ, Rosana OB, et al. Comparison of the
292 Transcriptomes of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and Mango Ginger (*Curcuma*
293 *amada* Roxb.) in Response to the Bacterial Wilt Infection. *PLOS ONE* 2014; 9: 1-13.
294 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099731>.

- 295 [11] Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L, Kappler U. Polyphasic taxonomic
296 revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the
297 descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R.*
298 *syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype
299 IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease
300 bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R.*
301 *solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. Int J
302 Syst Evol Micr 2014; 64:3087–103. <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.066712-0>.
- 303 [12] Stangarlin JR, Kuhn, OJ, Toledo MV, Portz RL, Schwan-Estrada KRF, Pascholati SF. A
304 defesa vegetal contra fitopatógenos. Scientia Agraria Paranaensis 2011; 10: 18-46.
- 305 [13] Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Laterrot H, Grimsley N. Quantitative trait
306 loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii 7996. Mol Plant-
307 Microb Interact 1996; 9: 826–836. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-9-0826>.
- 308 [14] Wang JF, Olivier J, Thoquet P, Mangin B, Sauviac L, Grimsley NH. Resistance of
309 tomato line Hawaii 7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly
310 by a Major Strain-Specific Locus. Mol Plant-Microb Interact 2000; 13:6–13.
311 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.1.6>.
- 312 [15] Wicker E, Grassrt L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M, Prior P,
313 *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new
314 pathogenic potential. App Environm Microbiol 2007; 73:6790-6801.
315 <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00841-07>.
- 316 [16] Zuluaga AP, Solé M, Lu H, Góngora-Castillo E, Vaillancourt B, Coll N, Buell CR, Valls
317 M. Transcriptome responses to *Ralstonia solanacearum* infection in the roots of the wild
318 potato *Solanum commersonii*. BMC Genomics 2015; 16: 246- 261. [http://dx.doi.org/](http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1460-1)
319 [10.1186/s12864-015-1460-1](http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1460-1).
- 320

321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346



347 Fig. 1. Diagrama de Venn representando as interações entre quebra de resistência
348 de *Solanum lycopersicum* linhagem Hawaii 7996 por isolados de *Ralstonia*
349 *solanacearum*. CNPH 488 e CRMRs223 - isolados que quebram resistência de
350 Hawaii 7996 e CNPH 489 – não quebra a resistência. DEGs: genes diferencialmente
351 expressos; hpi: horas após inoculação.



380 Fig. 2. Representação gráfica do tipo Heat map do perfil de genes diferencialmente expressos
 381 (DEGS) em plantas de Hawaii 7996, inoculadas com isolados de *Ralstonia solanacearum* que
 382 quebram a resistência (CNPH 488 e CRMRs223) e que não quebra (CNPH 489). Em A, DEGs
 383 comumente expressos entre CNPH 488 e CRMRs223, 24 h após inoculação (hpi) e B, DEGs
 384 comumente expressos entre CNPH 488 e CRMRs223, 96 hpi.

Tabela 1. Genes relacionados a quebra de resistência de Hawaii 7996 por isolados de *Ralstonia solanacearum* no Brasil

Genes	Descrição	Regulação em relação a CNPH 489 ¹			
		CNPH 488 ¹ 24h	CRMRS223 ¹ 24h	CNPH 488 - 96h	CRMRS223 - 96h
Glucanas					
down-regulados-24h					
LOC101254063	probablexyloglucan endotransglucosylase hydrolase26	2,977 down	1,107 down	1,195 down	1,265 up
cel5	AT1G22880, cellulase 5	1,533 down	1,102 down	1,898 up	1,182 down
Cell	AT1G70710, glycosyl hydrolase 9B1	1,427 down	1,143 down	1,099 up	1,071 up
bmy3	AT5G18670, beta-amylase 3	1,401 down	1,538 down	1,516 up	1,066 up
LOC101265981	endo-1,3(4)-beta-glucanase 2	1,305 down	1,056 down	1,112 up	1,499 up
LOC101246571	glucan endo-1,3-beta-D- glucosidase	1,248 down	1,086 down	1,024 up	1,015 down
LOC101259605	glucan endo-1,3-beta-glucosidase 14	1,200 down	1,180 down	1,145 down	1,002 up
LOC101263377	glucan endo-1,3-beta-glucosidase	2,039 down	3,234 down	1,625 up	1,316 down
LOC101267141	endoglucanase 11-like	1,394 down	2,582 down	1,524 up	1,224 down
LOC101246626	endoglucanase 25-like	1,387 down	2,062 down	70,302 up	1,053 down
LOC101257723	endoglucanase 2-like	1,044 down	1,035 down	1,164 up	1,614 down
down-regulados -96h					
LOC101249782	NA	none	6,813 up	1,406 down	1,053 down

PHS1	alpha-glucan phosphorylase 1	1,001 up	6,931 down	9,144 up	1,404 down
XTH7	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 7	1,046 up	1,365 down	1,408 down	2,082 down
Cel2	Endo-1,4-Beta Glucanase	1,085 up	1,045 down	1,400 down	1,426 down
XTH16	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase16	1,218 up	1,196 up	1,745 down	1,388 down
XTH6	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 6	1,374 up	1,236 up	1,327 down	1,073 down

Auxinas

down-regulados-24h

LOC101252771	auxin-responsive SAUR68-like	2,446 down	2,446 down	1,397 up	2,610 up
LOC101254296	auxin-responsive SAUR21-like	2,330 down	2,330 down	1,473 up	6,881 up
LOC101252479	auxin-responsive SAUR68-like	3,495 down	3,495 down	1,524 up	1,423 up
LOC101248621	auxin-induced 15A-like	1,498 down	1,498 down	1,570 up	1,008 up
LOC101055556	auxin-responsive IAA29-like	1,498 down	1,498 down	1,978 up	2,341 up
LOC101254894	auxin-responsive SAUR68-like	2,097 down	2,097 down	2,159 up	3,227 up
LOC101263817	anthranilate synthase alpha subunit chloroplastic-like isoform X1	2,330 down	2,330 down	16,701 up	1,580 down
LOC101264326	Predicted: uncharacterized protein LOC107015606	84,132 down	84,132 down	40,402 up	40,402 up
LOC101055555	auxin-responsive IAA29-like	2,330 down	2,330 down	1,574 down	4,745 up
LOC101267371	auxin-responsive SAUR68-like	4,116 down	4,116 down	1,323 down	5,263 up
LOC101253080	auxin-responsive SAUR68-like	1,694 down	1,694 down	1,312 down	2,117 up

LOC101268244	auxin-responsive SAUR68-like	4,059 down	4,059 down	1,289 down	1,795 up
LOC101267955	auxin-responsive SAUR68-like	2,579 down	2,579 down	1,241 down	3,247 up
LOC101243847	auxin-responsive SAUR21-like	5,825 down	5,825 down	1,230 down	1,518 up
LOC101254589	auxin-responsive SAUR68-like	23,303 down	23,303 down	1,124 down	3,147 up
LOC101267078	auxin-responsive SAUR68-like	3,127 down	3,127 down	1,117 down	2,344 up
LOC543701	Upstream of Flc-Like	4,326 down	4,326 down	1,034 down	1,235 up
LOC101248065	auxin-responsive SAUR32-like	115,204 down	115,204 down	none	155,435 down
LOC100736481	auxin-responsive IAA32-like	53,640 down	53,640 down	none	none
LOC101268868	auxin-induced 6B-like	71,843 down	71,843 down	none	none
IAA7	auxin-responsive IAA14-like	1,324 down	1,324 down	1,001 up	1,100 down
LOC101267638	probable glutathione S-transferase	1,217 down	1,217 down	1,069 up	1,197 down
LOC101244732	auxin-responsive SAUR68-like	4,356 down	4,356 down	1,274 up	1,666 up
LOC101253375	auxin-responsive SAUR21-like	4,078 down	4,078 down	1,274 up	2,892 up
LOC101055549	auxin-induced AUX22-like	2,268 down	2,268 down	1,278 up	1,283 up
LOC101268536	auxin-responsive SAUR21-like	9,612 down	9,612 down	1,295 up	2,305 up
down regulados-96h					
LOC101246196	auxin-responsive SAUR32-like	5,149 up	5,149 up	7,873 down	1,053 down
LOC101251725	auxin-induced 15A-like	1,287 up	1,287 up	4,921 down	5,794 down
LOC101246229	auxin-responsive SAUR71-like	1,864 up	1,864 up	2,390 down	1,856 down
LOC101263634	auxin-responsive SAUR32-like	1,924 up	1,924 up	2,387 down	1,697 down
LOC101259247	auxin-responsive SAUR72-like	3,433 up	3,433 up	1,968 down	5,267 down
LOC101251524	auxin-responsive SAUR21-like	351,553 up	351,553 up	1,968 down	1,053 down

LOC101265243	auxin-responsive SAUR71-like	1,295 up	1,295 up	1,504 down	1,375 down
LOC101247761	auxin-induced 15A-like	1,335 up	1,335 up	1,362 down	1,701 down
Porinas					
down-regulados-24h					
LOC101264605	probable aquaporin PIP1-2	1,271 down	1,271 down	1,281 down	1,136 up
Ìons de ligação ao cálcio					
down regulados-24h					
LOC101260716	Predicted: uncharacterized protein LOC102587762	68,965 down	68,965 down	32,596 down	none
LOC101250315	calcineurin subunit B-like	3,495 down	3,465 down	none	145,721 down
LOC101253987	phospholipase D alpha 1 [Nicotiana tabacum]	1,165 down	12,485 down	none	12,633 down
LOC101261515	Calcium-binding EF-hand family	1,165 down	4,621 down	1,016 up	37,449 up
LOC101245011	calcium-dependent kinase 26-like	2,330 down	4,621 down	1,100 up	2,056 up
LOC101247664	calcium-binding PBP1-like	1,031 down	2,387 down	1,604 up	2,036 down
LOC101256538	polcalcin Nic t 1	4,660 down	9,242 down	57,275 up	57,275 up
down regulados 96h					
LOC101263840	calcium-dependent kinase 26-like	1,788 up	2,019 up	1,845 down	1,382 down
LOC101258445	polcalcin Phl p 7-like	3,003 up	5,193 up	239,585 down	51,293 down
Genes de resistência					
down regulados-24h					
LOC101249260	R2 late blight resistance	1,339 down	1,339 down	2,296 down	1,708 up

LOC101245093	Multidrug resistance ABC transporter family	1,094 down	1,094 down	1,384 down	1,119 up
LOC101264608	pleiotropic drug resistance 1	2,216 down	2,216 down	1,124 down	1,155 up
LOC101253389	TMV resistance N-like	1,941 down	1,941 down	none	none
LOC101265134	late blight resistance homolog R1A-3	15,348 down	15,348 down	none	none
rps4	ribosomal S4 (chloroplast)	1,165 down	1,165 down	none	101,571 down
LOC101249526	Leaf Rust 10 Disease-Resistance	1,188 down	1,188 down	1,535 up	1,209 up
LOC101260277	late blight resistance homolog R1B-14	1,021 down	1,021 down	1,550 up	1,118 up
LOC101246552	TMV resistance N-like	1,224 down	1,224 down	1,912 up	1,012 up
LOC101256116	rust resistance kinase Lr10-like	1,359 down	1,359 down	7,112 up	2,013 up
LOC101259952	multidrug resistance	16,194 down	16,194 down	15,554 up	1,265 up
LOC101260177	pleiotropic drug resistance 1	4,750 down	4,750 down	20,855 up	2,245 up
LOC101253696	TMV resistance N-like	2,330 down	2,330 down	35,151 up	35,151 up
down regulados-96h					
NRAMP1	natural resistance-associated macrophage protein 1, AT1G80830	1,360 up	1,360 up	2,445 down	1,053 down
LOC101266010	TMV resistance N-like	3,862 up	3,862 up	2,109 down	1,204 down
LOC101245131	probable disease resistance RF9	1,830 up	1,830 up	2,077 down	1,664 down
LOC101253178	late blight resistance homolog R1B-16 isoform X1 [Nicotiana tomentosiformis]	1,136 up	1,136 up	1,744 down	1,430 down

LOC101265641	late blight resistance homolog R1B-16	1,497 up	1,497 up	1,496 down	1,205 down
LOC101248543	disease resistance N	1,314 up	1,314 up	1,447 down	1,239 down
LOC101262178	late blight resistance homolog R1C-3	1,144 up	1,144 up	1,054 down	1,580 down

Outros genes down-regulados em CNPH 488 e CRMRs223 e up-regulados em CNPH 489

down regulados-24h

LOC101265549	(R)-specific enoyl- hydratase	2,193 down	2,193 down	4,552 down	3,950 down
LOC101246907	abscisic acid receptor PYL2-like	26,539 down	26,539 down	none	53,710 down
LOC101256445	heat stress transcription factor A-9-like	52,528 down	52,528 down	none	none
LOC101245781	kirola-like	136,080 down	136,080 down	none	68,850 down
LOC101249600	beta-D-glucosyl crocetin beta-1,6-glucosyltransferase-like	46,398 down	46,398 down	10,160 up	3,163 up
LOC101247913	GATA transcription factor 25-like	33,130 down	33,130 down	1,016 up	1,053 down
LOC101257660	cytochrome P450 81E8-like	2,330 down	2,310 down	29,639 down	10,576 down
TMP	subtilisin-like protease	4,660 down	25,032 down	23,662 down	25,330 down
LOC101249739	transmembrane emp24 domain-containing p24delta3-like	126,094 down	126,094 down	23,839 down	127,596 down
LOC101265036	ethylene-responsive transcription factor SHINE 2-like	6,990 down	6,990 down	48,442 up	48,442 up
LOC101246393	UDP-glucose iridoid glucosyltransferase-like	21,298 down	21,298 down	61,367 up	1,755 down

LOC101265009	E3 ubiquitin- ligase RING1-like	34,958 down	34,958 down	100,726 up	100,726 up
DOT	Unusual Floral Organs	2,796 down	4,621 down	21,352 up	21,352 up
LOC101252365	E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER-related-like	1,359 down	2,021 down	1,306 up	1,067 up
LOC101244876	E3 ubiquitin- ligase XBAT35 isoform X1	1,054 down	2,633 down	1,506 up	1,133 up
LOC101254828	ubiquitin-like-specific protease 2b	3,689 down	3,135 down	1,083 up	2,238 down
LOC101248221	E3 ubiquitin- ligase arkadia-like	1,792 down	2,310 down	1,905 up	1,475 down
LOC101258788	RING-H2 finger ATL67-like	1,359 down	2,021 down	1,610 down	1,044 up
LOC101248546	probable E3 ubiquitin ligase SUD1 isoform X1	1,694 down	2,310 down	1,377 down	105,377 up
LOC101268040	SKP1 1B	1,097 down	1,100 down	1,138 up	1,239 down
down regulados-96h					
LOC101245061	chalcone synthase	2,221 up	2,221 up	6,535 down	3,245 down
LOC101262097	CASP-like	2,403 up	2,403 up	4,133 down	3,582 down
LOC101244048	SUMO-conjugating enzyme SCE1	1,037 up	1,125 up	1,202 down	1,193 down
LOC101253932	cullin-1	2,145 up	75,096 down	141,976 down	37,995 down
LOC101248322	E3 ubiquitin- ligase PUB23-like	30,565 up	20,551 up	89,774 down	48,050 down
LOC101265880	E3 ubiquitin- ligase RING1-like	138,110 up	278,586 up	76,058 down	244,256 down
Genes up-regulados em CNPH 488 e CRMRs223 e down-regulados em CNPH 489					
LOC101259057	calmodulin 3	58,006 up	58,006 up	3,048 up	1,170 down

LOC101254234	probable disease resistance At4g27220 isoform X2	271,904 up	271,904 up	1,476 down	1,316 down
TAPG4	polygalacturonase-like	112,125 up	112,125 up	2,032 up	1,265 up
LOC101264812	ethylene-responsive transcription factor ERF043-like	38,273 up	38,273 up	28,554 up	1,053 down
PR-1a1	basic form of pathogenesis- related 1-like	1,059 up	2,025 up	4,575 up	2,175 up
LOC101248628	leucoanthocyanidin dioxygenase- like	2,342 up	1,833 up	2,751 up	3,427 up
LOC101255267	probable carboxylesterase 17	1,666 up	1,374 up	4,064 up	3,796 up
LOC101256181	endonuclease 2	120,013 up	120,013 up	1,250 up	2,531 up
LOC101261278	E3 ubiquitin- ligase UPL5-like	124,299 up	124,299 up	1,185 up	1,204 down
LOC101265692	RING-H2 finger ATL70-like	127,955 up	127,955 up	4,921 down	4,214 down
LOC101267978	auxin response factor 9	145,015 up	145,015 up	81,140 up	1,053 down
LOC101264565	auxin-responsive SAUR68-like	59,595 up	59,595 up	none	245,929 down
LOC101254672	phosphoglucan phosphatase chloroplastic isoform X1	271,904 up	271,904 up	55,323 up	1,580 down

¹CNPH 488 e CRMRs223, isolados que quebram resistência de Hawaii 7996; CNPH 489 isolado que não quebra resistência de Hawaii 7996.

hpi: horas após inoculação.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- A murcha bacteriana causada por *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* ocorre nas três mesorregiões do semiárido de Pernambuco (Agreste, São Francisco e Sertão), apresentando alta diversidade genética e patogênica;
- *Ralstonia pseudosolanacearum* biovar 3 é prevalente no Agreste e *R. solanacearum* biovar 1, nas mesorregiões São Francisco e Sertão;
- No Semiárido pernambucano estão presentes as sequevares I-17 e I-18 de *R. pseudosolanacearum*, e as sequevares IIA-50 (três haplótipos), IIA-58 e IIA-59 de *R. solanacearum*;
- Fontes promissoras de resistência à murcha bacteriana foram encontradas em cinco e seis acessos silvestres de *Solanum* spp. secção *Lycopersicon*, respectivamente, para as regiões Nordeste e Centro-Sul do Brasil;
- Os acessos CNPH 597, CNPH 1038, CNPH 1039 e CNPH 1195 de *S. pimpinellifolium* são altamente a moderadamente resistentes à murcha bacteriana para as regiões Nordeste e Centro-Sul do Brasil;
- Tomateiros silvestres apresentaram resistência a isolados de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* da região Nordeste e apenas a isolados de *R. solanacearum* do Centro-Sul, sendo a resistência isolado-específica;
- Resistência à murcha bacteriana foi pela primeira vez detectada em acessos de *S. chmielewskii* e *S. habrochaites*;
- Os genótipos 72-TR-4-4 e IRAT-L3 resistentes ao cancro bacteriano também apresentaram resistência à murcha bacteriana;

- No transcriptoma de plantas de Hawaii 7996, dentre os genes diferencialmente expressos por RNASeq na quebra de resistência à murcha bacteriana por isolados de *R. solanacearum* do Brasil, destacaram-se glucanas, auxinas e ubiquitinas;
- Relatou-se pela primeira vez a expressão de genes de ubiquitinas, associados a resistência de Hawaii 7996 à murcha bacteriana.