



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**Sequenciamento e genômica comparativa de isolados de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko**

**Ana Karolina Leite Pais**

**RECIFE – PE  
2020**

**ANA KAROLINA LEITE PAIS**

**Sequenciamento e genômica comparativa de isolados de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko**

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:**

Orientadora: Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Márcio Freire Silva

Coorientador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino

**RECIFE-PE  
NOVEMBRO – 2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- P149s Leite Pais, Ana Karolina  
Sequenciamento e genômica comparativa de isolados de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko / Ana Karolina Leite Pais. - 2020.  
89 f. : il.
- Orientadora: Elineide Barbosa de Souza.  
Coorientador: Adriano Marcio Freire Silva e Valdir de Queiroz Balbino.  
Inclui referências.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2021.
1. Banana. 2. Síndrome Sergipe. 3. Bugtok. 4. Genômica descritiva. 5. Filogenômica. I. Souza, Elineide Barbosa de, orient. II. Balbino, Adriano Marcio Freire Silva e Valdir de Queiroz, coorient. III. Título

# **Sequenciamento e genômica comparativa de isolados de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko**

**ANA KAROLINA LEITE PAIS**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 12/11/2020

## **ORIENTADOR(A):**

---

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza

## **EXAMINADORES:**

---

Dra. Thaís Ribeiro Santiago (UNB)

---

Dr. Wilson José Silva Junior (UFPE)

---

Dra. Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque (UFRPE)

---

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

**RECIFE-PE  
NOVEMBRO – 2020**

*Aos meus pais, Geraldo (in  
memoriam) e Ana, por toda  
dedicação, amor e confiança.*

**Dedico**

*A meu marido e minha filha,  
minhas fontes diárias de amor,  
compreensão e abdicção.*

**Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

A Deus;

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

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

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

Aos coorientadores, Dr. Adriano Márcio Freire da Silva e Dr. Valdir de Queiroz Balbino, pelos ensinamentos e sugestões que foram fundamentais para a compreensão desse estudo;

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em especial ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE), pelo suporte necessário para execução das análises;

Ao Dr. Wilson José da Silva Júnior pelo profissionalismo, incentivo e leveza ao qual conduziu todas as dúvidas e dificuldades que surgiram no processo de planejamento e execução desta tese;

À Dra. Greecy Mirian por toda atenção e presteza dedicadas em todo o processo de construção desta tese;

À minha amiga de longa data, Jéssica, que me ensinou muito na graduação e que tive o privilégio de reencontrar nesta nova jornada e compartilhar, além da vida acadêmica, a maternidade;

Às minhas amigas Grazi, Carmem e Risoneide pela ajuda e amizade, principalmente no início dessa jornada;

Ao meu amigo Leandro pelo incentivo, amizade, companheirismo e bom humor que conduziu nosso processo de descobertas “bioinformatas”;

Ao meu companheiro de turma Roberto que mesmo distante geograficamente se fez presente;

À grande família do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE (LAFIBAC);

Aos componentes do LABBE, principalmente Wilson, Regueira, Heyde, Lorena, Jussara, Bandeira e Caio por tornarem nossas reuniões leves e construtivas, mesmo tendo que me ver apresentar um “milhão de vezes” as “problemáticas” de meu trabalho;

Enfim, agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente dessa jornada, cujo apoio e incentivo foram fundamentais para a conclusão desse trabalho.

## Sumário

RESUMO GERAL.....	7
GENERAL ABSTRACT .....	8
CAPÍTULO I.....	9
Sequenciamento e genômica comparativa de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> ecótipo Moko .	10
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	10
1.1. Bananeira: Aspectos culturais e econômicos .....	10
1.2. Taxonomia de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	11
1.3. <i>Ralstonia solanacearum</i> ecótipo Moko .....	13
1.4. Fatores de patogenicidade e virulência em <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	19
1.5. Genômica comparativa de <i>R. solanacearum</i> .....	22
CAPÍTULO II .....	38
Genomic sequencing of different sequevars of <i>Ralstonia solanacearum</i> belonging to the Moko ecotype .....	38
CAPÍTULO III.....	54
Genômica comparativa e filogenômica de <i>Ralstonia solanacearum</i> ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas.....	54
CONCLUSÕES GERAIS .....	89

## RESUMO GERAL

*Ralstonia solanacearum* é uma bactéria fitopatogênica que habita o solo e que infecta várias culturas economicamente importantes. Em bananeira (*Musa* spp.), *R. solanacearum* causa a murcha bacteriana também conhecida como Moko. Este estudo teve como objetivos (I) sequenciar, montar, anotar e comparar os genomas de isolados de *R. solanacearum* ecótipo Moko de diferentes sequevares do Brasil e (II) investigar as peculiaridades relacionadas à patogenicidade e fatores de virulência de isolados do ecótipo Moko que induzem sintomas típicos de Moko e suas variantes sintomatológicas (síndrome Sergipe e doença de Bugtok) com base em genômica comparativa e filogenômica. Os quatro genomas (CCRMrs277 - sequevar IIA-24, CCRMrs287 - sequevar IIB-4, CCRMrs304 - sequevar IIA-24 e CCRMrsB7 - sequevar IIB-25) demonstraram uma alta correlação (> 96%) entre as sequências e esses genomas foram agrupadas nos filotipos IIA e IIB. O número de sequências codificantes presentes nos cromossomos e megaplasmídeos variou de 3.070 a 3.521 e 1.669 a 1.750, respectivamente. A análise do pan-genoma identificou 3.378 *clusters* nos cromossomos, dos quais 2.604 foram compartilhados por todos os quatro genomas analisados e 2.580 de cópia única. Nos megaplasmídeos 1.834 *clusters* foram identificados, dos quais 1.005 foram compartilhados pelos quatro genomas e 992 identificados como cópias únicas. Os genomas dos isolados CCRMrsB7 e CCRMrs287 diferiram dos outros por apresentarem *clusters* únicos em seus cromossomos e megaplasmídeos e CCRMrsB7 apresentou maior tamanho dentre todos os genomas sequenciados do ecótipo Moko até o momento. A identidade média de nucleotídica (ANI) e hibridização DNA-DNA (DDH<sub>is</sub>) demonstraram alta similaridade entre os genomas do ecótipo Moko, sendo as variantes sintomatológicas síndrome Sergipe e Bugtok os quadros sintomatológicos com maior valores de similaridade entre seus representantes, porém não foram suficientes para diferenciação dos quadros sintomatológicos. Assim como não foram diferenciados pelos fatores de patogenicidade, virulência e a análises de pan-genomas investigados neste estudo. As variantes sintomatológicas síndrome Sergipe e Bugtok não compartilham regiões homologas exclusivamente, sendo os representantes de síndrome Sergipe o grupo com maior número de regiões homologas exclusivas. Sendo assim, novas análises devem ser realizadas usando outras abordagens para melhor caracterização. As informações genômicas obtidas neste estudo forneceram uma base teórica para a identificação, caracterização e análise filogenômica do ecótipo Moko de *R. solanacearum*.

**Palavras-chaves:** Banana, Síndrome Sergipe, Bugtok, Genômica descritiva, Filogenômica, Fatores de patogenicidade e virulência.



## GENERAL ABSTRACT

*Ralstonia solanacearum* is a phytopathogenic bacterium that inhabits the soil and infects several economically important crops. In banana (*Musa* spp.), *R. solanacearum* causes vascular wilt also known as Moko. This study aimed to (I) sequence, assemble, annotate, and compare the genomes of *R. solanacearum* Moko ecotype from different sequevars in Brazil and (II) investigate how peculiarities related to pathogenicity and virulence factors of advancing the Moko ecotype induce typical Moko symptoms and their symptomatological variants (Sergipe facies and Bugtok disease) based on comparative and phylogenomic genomics. The four genomes (CCRMRS277 - sequevar IIA-24, CCRMRS287 - sequevar IIB-4, CCRMRS304 - sequevar IIA-24 and CCRMRSB7 - sequevar IIB-25) demonstrated a high correlation (> 96%) between the sequences and these genomes were grouped into phylotypes IIA and IIB. The number of coding sequences has different chromosomes and megaplasmids ranging from 3,070 to 3,521 and 1,669 to 1,750, respectively. A pan-genome analysis identified 3,378 clusters on the chromosomes, of which 2,604 were shared by all four genomes provided and 2,580 single-copy. In the megaplasmids 1,834 clusters were identified, of which 1,005 were shared by the four genomes and 992 identified as single copies. The genomes of the requested CCRMRSB7 and CCRMRS287 differed from the others in that they had unique clusters in their chromosomes and megaplasmids and CCRMRSB7 had a larger size among all sequenced genomes of the Moko ecotype so far. The average nucleotide identity (ANI) and DNA-DNA hybridization (DDHs) demonstrated high similarity between the genotypes of the Moko ecotype, with symptomatological variants of the Sergipe facies and Bugtok disease being the symptoms with higher values of similarity between representatives, but they were not enough to differentiate the symptoms. Just as they were not differentiated by factors of pathogenicity, virulence and an analysis of pan-genomes investigated in this study. The symptoms of the Sergipe facies and Bugtok disease do not share homologous regions exclusively, with representatives of Sergipe syndrome being the group with the largest number of exclusive homologous regions. Therefore, new analyzes must be carried out using other approaches for better characterization. The genomic information needed in this study provided a theoretical basis for the identification, characterization, and phylogenomic analysis of the Moko ecotype of *R. solanacearum*.

**Keywords:** Banana, Sergipe facies, Bugtok disease, descriptive genomics, phylogenomics, pathogenicity and virulence factors.

## **CAPÍTULO I**

### **Introdução Geral**

# Sequenciamento e genômica comparativa de isolados de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Bananeira: Aspectos culturais e econômicos

A bananeira (*Musa* sp.) é uma monocotiledônea pertencente a família Musaceae, gênero *Musa*. Este gênero é originário do leste Asiático e dividido em quatro seções: Eumusa e Rhodochlamys, com 22 cromossomos, e Australimusa e Callimusa, com 20 cromossomos, sendo a seção Eumusa a que detém o maior número de espécies comestíveis (PERRIER *et al.*, 2011; SALOMÃO; SIQUEIRA, 2015). As variedades de bananeira são diplóides ou triplóides e pertencem a *Musa acuminata* (Colla) unicamente ou hibridização com a *Musa balbusiana* (Colla) (PERRIER *et al.*, 2011).

A banana detém grande importância econômica e alimentar por ser a fruta mais produzida no mundo (115.737.861 t) e por estar na 13ª posição no ranking geral de produtos agrícolas, sendo esse cultivo concentrado em zonas tropicais e subtropicais, predominantemente na Ásia (54,1 %) e nas Américas (26,3%), destacando-se Índia, China e Indonésia como os maiores produtores mundiais (FAO, 2018). No contexto global, o Brasil é o quarto maior produtor de banana e o principal representante das Américas com produção de 6.752.171 t em uma área de aproximadamente 449.284 ha (FAO, 2018), concentrando aproximadamente 70% da produção nacional nas regiões Nordeste e Sudeste. São Paulo, Bahia, Minas Gerais, Santa Catarina e Pernambuco são os estados com maior produção e juntos respondem por 56% do total produzido (IBGE, 2018).

De acordo com o último censo agropecuário, existem no Brasil 202.513 propriedades rurais com cultivo de banana das quais 81% são de agricultura familiar que são responsáveis por 48% da produção brasileira (IBGE, 2019). Outra característica da bananicultura nacional é abastecer principalmente o mercado interno, uma vez que apenas 0,96% do total produzido foi destinado a exportação no ano 2018, sendo 85% exportado para o Uruguai e Argentina, gerando US\$ 20 milhões em divisas (AGROSTAT, 2018).

Mesmo diante desta importância, existem poucas cultivares disponíveis para exploração comercial no mercado brasileiro (ROQUE *et al.*, 2014), em decorrência da ausência de alguns aspectos agronômicos desejáveis como maior produtividade, resistência à seca e tolerância a pragas e doenças (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2018). Entre essas características, os aspectos fitossanitários são altamente relevantes no cultivo da bananeira, tendo em vista que durante seu

ciclo pode ser acometida por mais de 20 doenças causadas por fungos, vírus, nematóides e/ou bactérias (ALMEIDA; SOUZA; CORDEIRO, 2000; ZAMBOLIM *et al.*, 2002).

Dentre as principais doenças bacterianas que afetam a bananeira estão as causadas por *Ralstonia solanacearum* [(Smith, 1896) Yabuuchi *et al.*, 1995], denominadas de murcha bacteriana ou Moko e suas variantes sintomatológicas, síndrome Sergipe e Bugtok, sendo os isolados chamados de ecótipo Moko; e por *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* (Roberts *et al.*, 1990) Safni *et al.* 2014 denominada Blood Disease Bacterium (BDB) (BLOMME *et al.*, 2017; SAFNI *et al.*, 2014). Bugtok e BDB são doenças que ocorrem apenas em bananeiras nas Filipinas (BLOMME *et al.*, 2017) e Indonésia (SAFNI *et al.*, 2018), respectivamente. A terminologia “ecótipo” relaciona-se a um grupo altamente adaptado ao hospedeiro e o ecótipo Moko possui uma íntima relação com *Musa* sp., sendo de natureza polifilética (FEGAN; PRIOR, 2006; AILLOUD *et al.*, 2015)

No Brasil, *R. solanacearum* ecótipo Moko, anteriormente classificada como raça 2, devido a sua relevância econômica é uma praga quarentenária presente (MAPA, 2009), restrita as regiões Norte (estados do Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Roraima) e Nordeste (estados de Alagoas e Sergipe) (MAPA, 2018) e está sob controle oficial (MAPA, 2009). No entanto, na região Nordeste, os isolados do ecótipo Moko causam sintomas atípicos em bananeira, sendo essa variante sintomatológica denominada de síndrome Sergipe (*Sergipe facies*) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

O difícil controle do Moko acarreta grandes riscos econômicos ao cultivo da bananeira em nível mundial. *Ralstonia solanacearum* é considerada uma ameaça pela legislação europeia e um potencial agente de bioterrorismo nos Estados Unidos (AILLOUD *et al.*, 2012). No Brasil existem medidas tanto para o manejo no território nacional, regulamentado pela Instrução Normativa 17 de 27/05/2009 (MAPA, 2009), quanto para a importação, com restrições regulamentadas pela Instrução Normativa 25 de 07/04/2020 (MAPA, 2020).

## **1.2. Taxonomia de *Ralstonia solanacearum***

*Ralstonia solanacearum* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica (KADO, 2010), com colônias em formato de bastonete, reto ou levemente curvo, de aproximadamente 0,5 x 1,5 µm (MEHAN *et al.*, 1994) e não formam endósporos (BEDENDO, 2018). O crescimento dos isolados pode ser limitado por concentração de cloreto de sódio igual ou superior a 0,5% em meio de cultura e a temperatura ótima de crescimento varia entre 27 e 35° C (KADO, 2010). Em meio contendo cloreto de trifetil-tetrazolium as colônias virulentas são grandes, de aparência fluida e esbranquiçada, de forma pouco definida, contendo o centro avermelhado ou

róseo e as avirulentas são pequenas, mais vermelhas e circulares, pois produzem pequena massa de polissacarídeos extracelulares (EPS) (KELMAN, 1954; LOPES; ROSATO, 2013). Os flagelos, quando presentes, são polares e em número de um a quatro (BOUCHER; GENIN, 2004). Alguns isolados podem reduzir nitrato a nitrito (DENNY, 2006; MEHAN; MCDONALD, 1995) com produção de gás (DENNY, 2006), apresentar oxidase e catalase positiva (HAYWARD *et al.*, 1990) e acumular poli- $\beta$ -hidroxibutirato intracelularmente como reserva energética (ÁLVAREZ; BIOSCA; LÓPEZ, 2010). Os isolados que causam Moko não produzem pigmentos marrons em meio de cultura contendo a tirosina (ROBBS, 1983).

A primeira evidência de *R. solanacearum* causando doença em plantas foi relatada em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) no Japão (KELMAN, 1953). Porém, sua primeira descrição ocorreu após a observação dos sintomas em tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.) por Erwin F. Smith que a denominou de *Bacillus solanacearum* (SMITH, 1896). Posteriormente, foi descrita como *Bacterium solanacearum* (CHESTER, 1898), *Pseudomonas solanacearum* [(SMITH, 1896) SMITH, 1914], *Phythomonas solanacearum* [(SMITH, 1896) BERGEY *et al.*, 1923], *Burkholderia solanacearum* [(SMITH, 1896) YABUUCHI *et al.*, 1992] e, por fim, *Ralstonia solanacearum* [(SMITH, 1896) YABUUCHI *et al.*, 1995] (SANTIAGO; LOPES; MIZUBUTI, 2016), sendo validada em 1996 (YABUUCHI *et al.*, 1996). Essa fitobactéria pertence ao domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe  $\beta$ -proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae, gênero *Ralstonia* (KADO, 2010; YABUUCHI *et al.*, 1995).

Assim como a nomenclatura passou por várias alterações, os métodos de classificação também evoluíram. Inicialmente, como padrão para classificação de *R. solanacearum*, os isolados eram agrupados quanto a capacidade de causar doença em um determinado hospedeiro ou gama de hospedeiro, sendo essa denominada de raça (BUDDHENDHAGEN; SEQUEIRA; KELMAN, 1962); e quanto a capacidade de metabolizar dissacarídeos (lactose, maltose e celobiose) e álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol), denominada de biovars (HAYWARD, 1964). No entanto, evidências genéticas indicaram que a classificação baseada em características fenotípicas eram insuficientes para representar a diversidade de isolados de *R. solanacearum* e métodos de base molecular resultaram em uma maior compreensão dessa diversidade (PRIOR; FEGAN, 2005).

Devido a grande diversidade encontrada nos isolados, *R. solanacearum* foi considerada um complexo de espécies (FEGAN; PRIOR, 2005), que após um longo processo taxonômico foi dividido em três espécies independentes: *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* Safni *et al.* e *R. syzygii* [(ROBERTS *et al.* 1990) VANECHOUTTE *et al.* 2004], sendo esta última

com três subespécies: *R. syzigii* subsp. *indonesiensis* Safni *et al.*, *R. syzigii* subsp. *syzigii* Safni *et al.* e *R. syzigii* subsp. *celebesensis* Safni *et al.* (SAFNI *et al.*, 2014). Essa reclassificação foi baseada em dados de sequenciamento de genoma, características bioquímicas, culturais, fisiológicas e de hibridização DNA-DNA (SAFNI *et al.*, 2014). No entanto, apesar dessa reclassificação tem permanecido na identificação dos isolados o sistema hierárquico de classificação, subdividido em filotipos, sequevares, clados e clones (SANTIAGO *et al.* 2016; LIU *et al.*, 2017b; TAN *et al.*, 2019).

Os filotipos representam um conjunto monofilético de isolados classificados com base em análises de sequência da região 16S-23S (ITS) e dos genes *egl* (endoglucanase) e *mutS* (reparo do DNA), sendo os isolados dentro de cada filotipo de uma mesma origem geográfica (I- Ásia, II- Américas, III- África e IV- Indonésia) (PRIOR; FEGAN, 2005). Os filotipos podem ser identificados por meio de uma variação da técnica de PCR, denominada de Filotipo Multiplex PCR, que permite a amplificação simultânea de diferentes sequências com a utilização de múltiplos iniciadores por reação, com os *primers* da série Nmult (FEGAN; PRIOR, 2005). A classificação por sequevar agrupa isolados com variação abaixo ou igual a 1% da sequência do gene *egl* (FEGAN; PRIOR, 2005) e atualmente existem 67 sequevares de *R. solanacearum* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; GUTARRA *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2017b; RAVELOMANANTSOA *et al.*, 2018; SANTIAGO *et al.*, 2017; SHE *et al.*, 2017). A diferenciação por clados baseia-se em linhagens com padrões evolutivos distintos detectados nas análises de sequência multilocus (MLSA) para os genes *dha*, *mutS*, *ppsA*, *adk*, *leuS*, *rplB*, *gyrB*, *egl* e *fliC* (WICKER *et al.*, 2012). Os oito clados existentes são específicos aos filotipos e, consequentemente às espécies, sendo: *R. pseudosolanacearum* clado 1 (filotipo I) e 6 (filotipo III); *R. solanacearum* clados 2 e 3 (filotipo IIA) e 4 e 5 (filotipo IIB); e as subespécies de *R. syzigii* clado 7 (*R. syzigii* subsp. *celebesensis* e *R. syzigii* subsp. *indonesiensis*) e 8 (*R. syzigii* subsp. *syzigii*) (WICKER *et al.*, 2012). Adicionalmente, os isolados são divididos em clones com base em métodos de *fingerprinting* por técnicas como rep-PCR, RAPD e AFLP (FEGAN; PRIOR, 2005).

### **1.3. *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko**

Os isolados de *R. solanacearum* associados à bananeira pertencem ao filotipo II, que tem origem nas Américas (PRIOR; FEGAN, 2005), mais especificamente na região correspondente ao Brasil (WICKER *et al.*, 2012) e estão subdivididos em IIA e IIB (FEGAN; PRIOR, 2006). Os representantes de Moko com sintomas típicos estão distribuídos entre as sequevares IIA-6, IIA-24, IIA-41, IIB-3, IIB-4 e IIB-25 (FEGAN; PRIOR, 2005; 2006;

ALBUQUERQUE *et al.*, 2014); e as variantes sintomatológicas, na sequevar IIA-53 para síndrome Sergipe (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014) e na sequevar IIB-3 para Bugtok (PLOETZ; THOMAS; SLABAUGH, 2003; ROPEROS, 1965; SOGUILON; MAGNAYE; NATURAL, 1995). Essas sequevares estão intimamente relacionadas (SILVA *et al.*, 2020). Devido a natureza polifilética do ecótipo Moko, sugere-se que quando associado à bananeira, a patogenicidade se baseia em um número muito restrito de genes, ou mesmo formas alélicas dos mesmos genes, que podem ser facilmente transmissíveis por transferência horizontal e acredita-se que a preferência do hospedeiro não é relevante na estruturação dos ecótipos (WICKER *et al.*, 2012).

Atualmente, o Moko da bananeira encontra-se distribuído por alguns países da América Latina e do Caribe (BLOMME *et al.*, 2017). A primeira descrição do Moko se deu por Schomburgk durante suas viagens a Guiana Britânica (1840-1844), porém foi evidenciada quando devastou áreas de bananeiras da variedade Moko (*Musa* ABB) na ilha Trinidad, que deu origem ao nome da doença (SEQUEIRA, 1998). Nas Filipinas, a sequevar IIB-3 quando associada às cultivares Saba (*Musa* ABB) e Cardaba (*Musa* BBB) se destacou por um quadro sintomatológico distinto do descrito anteriormente para Moko, sendo a doença denominada de Bugtok ou Tapurok (PLOETZ; THOMAS; SLABAUGH, 2003; ROPEROS, 1965; SOGUILON; MAGNAYE; NATURAL, 1995; THWAITES; EDEN-GREEN; BLACK, 2000).

No Brasil, a primeira ocorrência do Moko da bananeira foi registrada em 1976 no antigo Território Federal do Amapá (TOKESHI; DUARTE, 1976). No estado do Amazonas, o Moko da bananeira foi detectado em 2001 em cinco municípios, com prevalência variando de 11 a 100% e com incidência de até 46% das touceiras plantadas (COELHO NETTO; NUTTER JÚNIOR., 2005). A doença foi associada principalmente a plantios sujeitos a inundações periódicas, ou seja, em regiões de várzea e, em geral, os bananais com sintomas da doença eram abandonados ou substituídos por outros cultivos (PEREIRA *et al.*, 2003).

No estado de Sergipe, o Moko foi constatado em 1987 (NOGUEIRA, 2005) e atualmente ainda ocorre, principalmente na época chuvosa (TALAMINI *et al.*, 2010). Um programa de erradicação adotado pelo estado reduziu a prevalência da doença de 15% para 2%, de 2008 a 2010 (TALAMINI *et al.*, 2010). A importância da presença do Moko em Sergipe se deve ao fato de que a região Nordeste é a segunda maior produtora de banana no Brasil (IBGE, 2018) e porque nesse estado ocorrem os sintomas atípicos da doença, chamados de síndrome Sergipe, causados por isolados disseminados por insetos visitantes de inflorescências (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). A síndrome Sergipe também é constatada em áreas de plantio de bananeira no estado de Alagoas (OLIVEIRA, 2020).

A bactéria *R. solanacearum* sobrevive de forma saprofítica em restos de cultura, hospedeiros alternativos, sementes (BEDENDO, 2018; LOPES; ROSSATO, 2013) e também podem viver por longos períodos em vasos do xilema de cultivares tolerantes sem desencadear sintomas (GRIMAULT; PRIOR, 1993; WEIBEL *et al.*, 2016). A disseminação da murcha da bananeira ocorre em curtas ou longas distâncias através da movimentação de solo, materiais e implementos agrícola, contato entre as raízes, insetos visitantes de inflorescências como a abelha arapuá (*Trigona* spp) (PEREIRA *et al.*, 2003), vespas (*Polybia* spp.), mosca-das-frutas (*Drosophyla* spp.) e muitos outros gêneros (CORDEIRO; MATOS, 2000) e pelo transporte de material vegetal infectado (HAYWARD, 1991). Quando no solo, *R. solanacearum* utiliza os flagelos e quimiotaxia para localizar raízes do hospedeiro (LOWE-POWER; KHOKHANI; ALLEN, 2018). A transmissão de *R. solanacearum* por insetos a distâncias superiores a 90 km foi constatada na Colômbia e na Venezuela (WARDLAW, 1972).

A penetração da bactéria no hospedeiro ocorre através de ferimentos nas raízes (BEDENDO, 2018; VASSE; FREY; TRIGALET, 1995) ou aberturas naturais como as inflorescências (COELHO NETTO; NUTTER JÚNIOR., 2005) ou no surgimento de raízes secundárias (ARAUD-RAZOU *et al.*, 1998). Ao penetrar no hospedeiro, inicia-se a colonização dos espaços intercelulares do córtex radicular, do parênquima vascular e, eventualmente, penetra nos vasos do xilema (ARAUD-RAZOU *et al.*, 1998; VASSE; FREY; TRIGALET, 1995). O xilema é um ambiente de alto fluxo e relativamente pobre em nutrientes, mas *R. solanacearum* obtém sucesso ao ajustar seu próprio metabolismo e alterar a bioquímica da seiva nos vasos (LOWE-POWER; KHOKHANI; ALLEN, 2018). As bactérias nos vasos do xilema são essencialmente não móveis até que as populações atinjam  $10^9$  UFC/ml de seiva (CLOUGH *et al.*, 1997; TANS-KERSTEN; HUANG; ALLEN, 2001), após esse limiar, se espalham para o caule e folhas (ARAUD-RAZOU *et al.*, 1998; VASSE; FREY; TRIGALET, 1995). Esse é um ponto crucial na patogênese, sendo o sintoma de murcha causado pelo fluxo de seiva reduzido no xilema (LOWE-POWER; KHOKHANI; ALLEN, 2018).

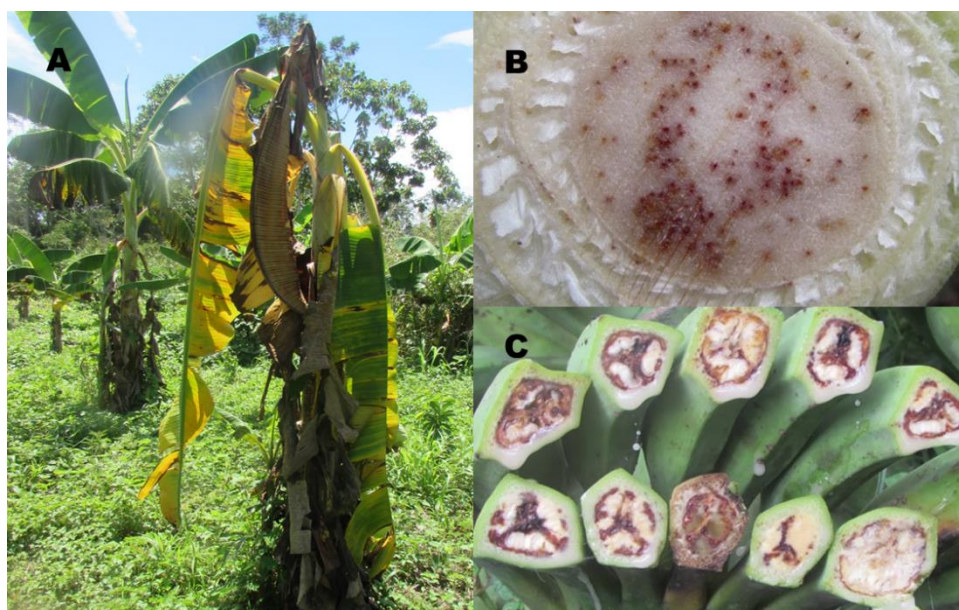
Contudo, a causa exata da murcha provocada por *R. solanacearum* é desconhecida, porém vários mecanismos, provavelmente, contribuem para a disfunção vascular da planta (LOWE-POWER; KHOKHANI; ALLEN, 2018). A teoria mais aceita é a de que nos vasos do xilema, fortemente colonizados com células bacterianas e as substâncias poliméricas extracelulares (EPS), obstruem o transporte de água e sais minerais (BECKMAN; BRUN; BUDDENHAGEN, 1962; CALDWELL; KIM; IYER-PASCUZZI, 2017; WALLIS; WALLINGFORD; CHEN, 2013). Entretanto, também há estudos que atribuem o bloqueio dos vasos do xilema pela tilose, um tipo de estrutura como resposta imune vegetal (YADETA;



THOMMA, 2013). Independente da causa, sabe-se que o bloqueio do xilema dará início ao quadro sintomatológico que em muitos casos findará na morte da planta (LOWE-POWER; KHOKHANI; ALLEN, 2018).

Os sintomas típicos de Moko (Figura 1) são provocados, geralmente, por uma infecção iniciada pela penetração de *R. solanacearum* nas raízes através de ferimentos causados por partículas abrasivas do solo, nematoides ou fatores mecânicos (SEQUEIRA, 1998) e se caracterizam pela descoloração vascular do pseudocaule na região central (Figura 1B), amarelecimento, murcha e necrose das folhas internas (Figura 1A) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014) e murcha da planta (SEQUEIRA, 1998). Além disso, pode ocorrer a quebra do pecíolo devido à curvatura das folhas (Figura 1A) (CORDEIRO, 2000). Com o progresso da infecção sistêmica, a bactéria se move por toda a planta, sendo capaz de afetar o pedúnculo e frutos (FEGAN; PRIOR, 2006). No engajo e na ráquis ocorre escurecimento vascular, na forma de pontos avermelhados dispostos uniformemente (PEREIRA *et al.*, 2003). Em cachos de plantas infectadas, ocorre o amadurecimento prematuro dos frutos isoladamente, com uma podridão seca, firme e de coloração parda (Figura 1C) (AGRIOS, 2005; SALOMÃO; SIQUEIRA, 2015). O quadro sintomatológico pode ter seu progresso alterado e a manifestação dos sintomas é diretamente influenciada pela idade e cultivar de bananeira, o isolado do patógeno e as condições climáticas (CORDEIRO; MATOS, 2000).

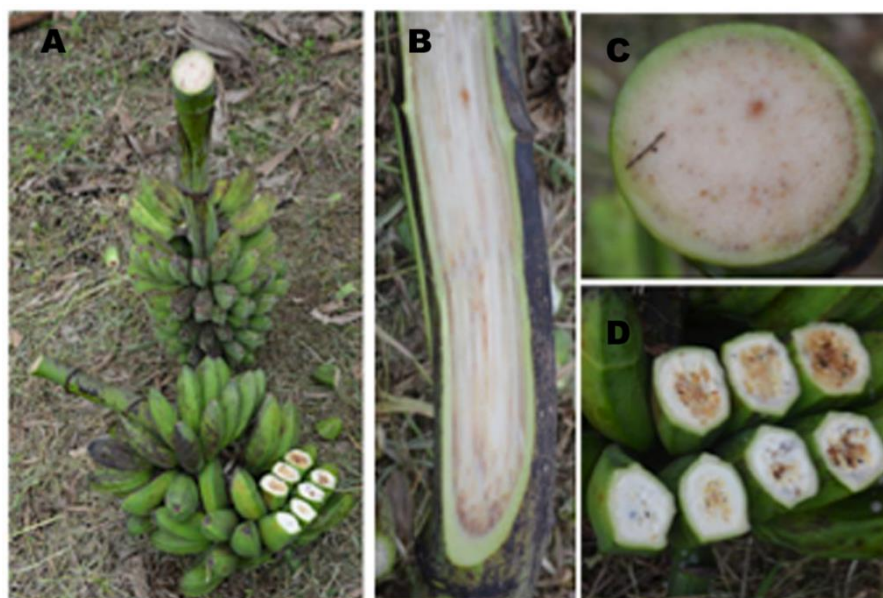
**Figura 1.** Sintomas típicos do Moko causados por *Ralstonia solanacearum* (Fonte: Jéssica Rodrigues). (A) Planta murcha; (B) descoloração vascular do pseudocaule na região central; (C) polpa com podridão seca, firme e de coloração parda.



Em bananeiras nas Filipinas, as doenças Moko e Bugtok representam dois quadros

sintomatológicos associados ao mesmo patógeno, *R. solanacearum*, distintas pela forma de penetração da bactéria na planta e interações com o hospedeiro. Enquanto no Moko a bactéria penetra pelas raízes, no Bugtok a penetração ocorre através das flores masculinas, sendo inoculada por insetos vetores (BLOMME *et al.*, 2017), provavelmente tripes SOGUILON; MAGNAYE; NATURAL, 1995), arapuá, vespa do gênero *Polybia* e mosca do gênero *Drosophila* (MALAVOLTA JR.; BERIAM; ALMEIDA, 2013). Os isolados que causam Bugtok (sequevar IIB-3) provocam sintomas restritos ao pedúnculo/raque (Figura 2B, C), podendo haver uma descoloração marrom-avermelhada do tecido vascular do pseudocaule (BLOMME *et al.*, 2017). A infecção inicia-se pelas inflorescências (Figura 2B), provocando podridão seca interna na polpa dos frutos com maior intensidade no centro (Figura 2A, D) (PLOETZ; THOMAS; SLABAUGH, 2003; ROPEROS, 1965; SOGUILON; MAGNAYE; NATURAL, 1995). Os sintomas nos cachos consistem na descoloração da polpa do fruto, que dependerá do grau de infecção, podendo todos os frutos dentro de um cacho apresentarem podridão em infecções graves (SOGUILON; MAGNAYE; NATURAL, 1995).

**Figura 2.** Sintomas da doença Bugtok causados por *Ralstonia solanacearum* em bananeiras nas Filipinas [Fonte: Philippe Prior (Blomme *et al.*, 2017)]. (A) Cachos sem sintomas externos; (B) descoloração marrom-avermelhada restrita ao pedúnculo/raque (C) podendo se entender ao tecido vascular do pseudocaule; (D) frutos com podridão seca interna na polpa, com maior intensidade no centro.



No estado de Sergipe, Nordeste do Brasil, uma síndrome causada por isolados endêmicos de *R. solanacearum* ecótipo Moko associados à sequevar IIA-53 apresentam uma sintomatologia bem similar à descrita para Bugtok, porém com sintomas externos nos cachos

(ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). Os sintomas da doença iniciam-se nas inflorescências e progridem para os cachos, ocasionando o amadurecimento prematuro e desuniforme, com podridão seca internamente e necrose externa (Figura 3). A bactéria pode se mover em direção ao pseudocaule e causar escurecimento dos feixes vasculares, porém não provocará a murcha das plantas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

**Figura 3.** Sintomas da síndrome Sergipe (*Sergipe facies*) causados por *Ralstonia solanacearum*, em bananeira no estado de Sergipe, Nordeste do Brasil (Fonte: Adriano Márcio Freire da Silva). (A) Amadurecimento prematuro e desuniforme do fruto com necrose externa; (B) fruto com podridão seca internamente; (C) escurecimento dos feixes vasculares.



Os isolados de Moko e suas variantes sintomatológicas possuem características intrínsecas e algumas contrastantes (Tabela 1). Na interação de *R. solanacearum* com suas plantas hospedeiras têm sido estudado vários fatores de patogenicidade e virulência, a exemplo dos sistemas de secreção (PENSEC *et al.*, 2015; BOCSANCZY; HUGUET-TAPIA; NORMSN, 2017), motilidade (TANS-KERSTEN; HUANG; ALLEN, 2001; GENIN; DENNY, 2012) e metabólitos secundários (ZEISS *et al.*, 2019; KAI *et al.*, 2014; KAI *et al.*, 2016; MORI *et al.*, 2018), podendo esses ter relação com as diferentes sintomatologias do ecótipo Moko.

**Tabela 1.** Diferenciação entre os representantes do ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas.

	Moko	Bugtok	Síndrome sergipe
Descrição	1840-1844	1965	2014
Hospedeiro	<i>Musa</i> sp.	Cultivares: Saba e Cardaba	<i>Musa</i> sp.
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Sim	Sim	Sim
Ocorrência	Mundo	Filipinas	Sergipe e Alagoas (Brasil)
Sintomas externos	Sim	Não	Sim
Penetração	Ferimentos nas raízes, aberturas naturais, inflorescências ou no surgimento de raízes secundárias.	Inflorescencias masculinas	Inflorescencias masculinas
Murcha	Sim	Não	Não

#### 1.4. Fatores de patogenicidade e virulência em *Ralstonia solanacearum*

Bactérias Gram-negativas possuem duas membranas lipídicas (membrana interna e membrana externa) que são uma barreira entre o citoplasma e o meio extracelular, dificultando a internalização e secreção de solutos e polipeptídeos (NASCIMENTO *et al.*, 2016). Para exteriorização dos fatores de virulência, esses organismos apresentam uma ampla gama de vias de secreção, atualmente classificadas como sistemas de secreção tipos I (T1SS) – VI (T6SS) e a vesícula da membrana externa (OMVs), o zero (ABDALLAH *et al.*, 2007; THANASSI; HULTGREN, 2000; GUERRERO-MANDUJANO *et al.*, 2017). As proteínas secretadas por bactérias patogênicas de plantas são fundamentais para aderir e degradar as paredes celulares do hospedeiro, assim como suprimir as respostas de defesa da planta (PRESTON; STUDHOLME; CALDELARI, 2005).

A capacidade de patogênese depende da atividade coletiva de uma ampla variedade de proteínas secretadas por vários sistemas de secreção (PRESTON; STUDHOLME; CALDELARI, 2005). Em *R. solanacearum*, o sistema de secreção tipo II (SST2) e o sistema de secreção tipo III (SST3) desempenham papel fundamental para patogenicidade e virulência (KADO, 2010). Sendo o SST2 caracterizado por um mecanismo de translocação de proteínas

com dois passos: I- processamento da proteína na membrana citoplasmática interna, seguido de II- modificações da proteína no periplasma para posterior secreção pela membrana externa (KADO, 2010). Em *R. solanacearum*, o SST2 é responsável por secretar exopolissacarídeos (EPS) e enzimas degradadoras de parede celular, ambos indispensáveis para a patogenicidade (KANG *et al.*, 1994). Estudos apontam uma variedade de tipos adicionais e não identificados de efetores do tipo II que contribuem para virulência e colonização do patógeno (LIU *et al.*, 2005). O SST3 injeta proteínas no citoplasma da célula do hospedeiro, podendo manipular as funções celulares e com isso causar a doença (COBURN; SEKIROV; FINLAY, 2007). Esse sistema é codificado pelos genes *hrp/hrc*, os quais formam um poro e um pilus complexo para secreção de proteínas diretamente dentro do citoplasma da célula hospedeira (KADO, 2010). Considera-se que o SST3 atue como seringas moleculares ou condutores para injetar fatores de virulência, chamados de proteínas efetoras, em células hospedeiras, onde eles suprimem ou estimulam uma variedade de funções celulares do hospedeiro para promover o crescimento do patógeno (JONES; DANGLE, 2006).

A síntese, montagem e regulação dos sistemas de secreção são dirigidas por mudanças no pH, temperatura, presença de flavonóides e concentrações de magnésio e cálcio nos espaços intercelulares (KADO, 2010) assim como outros fatores. Em *R. solanacearum* os componentes do SST3 são codificados dentro de um *clusters* grande aglomerado de genes *hrp/hrc* e suas expressões são controladas por um ativador *HrpB* de transcrição do tipo *AraC*, que também é codificado dentro do cluster do gene *hrp* (GENIN *et al.*, 1992; VAN GIJSEGEM *et al.*, 2000). Mutações em genes *hrp* resultam na perda completa da habilidade do patógeno de se proliferar em plantas hospedeiras (BOUCHER *et al.*, 1987). Essa observação fornece evidências claras de que as proteínas efetoras liberadas pelo SST3 têm a função de permitir o crescimento desse patógeno nas células vegetais da planta hospedeira.

Os dados genômicos de isolados representativos da biodiversidade das espécies de *R. solanacearum* abrem caminho para a compreensão dos processos evolutivos que estruturaram seu repertório de proteínas efetoras secretadas por SST3 (PEETERS *et al.*, 2013). A abordagem genômica sobre esses genes em particular, que estão na vanguarda da interação entre as bactérias e seu hospedeiro fornece uma nova visão sobre sua história evolutiva e sua contribuição potencial para a especificidade de hospedeiro (PEETERS *et al.*, 2013).

Muitas fitobactérias reconhecem a presença do hospedeiro por meio da percepção de sinais químicos gerados pelas plantas. Esses sinais, percebidos pelas células bacterianas, são transmitidos através da membrana para iniciar eventos de motilidade (flagelos ou pili) onde o patógeno segue um sinal bioquímico até alcançar a porta de entrada da planta hospedeira

(KADO, 2010). A motilidade provavelmente desempenha um papel importante para *R. solanacearum* durante as fases do seu ciclo que ocorrem fora da planta hospedeira (YAO; ALLEN, 2006).

O filamaneto flagelar é um tubo oco composto por cerca de 20.000 cópias de uma única proteína chamada de flagelina (codificada no gene *fliC*), polimerizada em uma hélice complexa. A rotação do flagelo é controlada no corpo basal pelo interruptor do motor flagelar, que é composto pelas proteínas codificadas nos genes *fliG*, *fliM* e *fliN* (MACNAB, 1996) além de muitas outras proteínas adicionais que constituem o corpo basal do flagelo e aparelho de secreção, que são evolutivamente relacionadas ao SST3 (FERNANDEZ; BERENQUER, 2000).

A motilidade resolve muitos dos problemas enfrentados pelos microrganismos para obter mais ou melhores nutrientes, evitar substâncias tóxicas ou condições desfavoráveis do meio ambiente, encontrar um hospedeiro e permitir a dispersão de forma efetiva (TANS-KERSTEN; HUANG; ALLEN, 2001). Muitas espécies de bactérias, incluindo a maioria das espécies transmitidas pelo solo, podem se mover nadando, deslizando, se contorcendo ou pulando (MACNAB, 1996; VANDE BROEK; ANDERLEYDEN, 1995).

A maioria das fitobactérias de solo, incluso *R. solanacearum*, possuem motilidade por natação (VANDE BROEK; ANDERLEYDEN, 1995). Este tipo de motilidade exerce uma importante contribuição quantitativa à virulência da bactéria nos estágios iniciais de invasão e colonização do hospedeiro (CORRAL *et al.*, 2020). Em *R. solanacearum*, a motilidade é mediado por flagelos polares, constituídos pelas proteínas estruturais FliC (a proteína da subunidade flagelar) ou FliM (a proteína do interruptor do motor flagelar) (TANS-KERSTEN; HUANG; ALLEN, 2001). Mutantes sem flagelina (*fliC*) de *R. solanacearum* inoculados em tomateiro tiveram a virulência reduzida significativamente (TANS-KERSTEN; HUANG; ALLEN, 2001).

O termo “metabolismo secundário” é mais frequentemente usado para vias metabólicas específicas de diversos organismos como bactérias, fungos e plantas sendo raramente utilizado para compostos do metabolismo animal (SCHRIPEMA; DAGNI, 2015). Estes compostos são formados a partir de vias biossintéticas de distribuição relativamente restrita e os precursores derivam do metabolismo primário (SCHRIPEMA; DAGNI, 2015). Sua regulação ocorre através do *quorum-sensing*, que consiste em um sistema de comunicação molecular entre as células bacterianas onde elas liberam, detectam e respondem a pequenas moléculas de sinal difusíveis, permitindo-lhes regular suas atividades cooperativas e fisiológicas (LI; TIAN, 2012).

A capacidade das bactérias de se comportarem como um grupo, semelhantes a um organismo multicelular, fornece benefícios significativos em termos de colonização do hospedeiro, formação de biofilmes, defesa contra competidores e adaptação a mudanças ambientais (MORI *et al.*, 2018). Todos esses fatores favorecem o estabelecimento dentro da planta hospedeira e garante multiplicação eficaz em seus tecidos, porém o patógeno necessita ser metabolicamente proficiente e implantar energia para configurar os elementos necessários para o processo de infecção (PLENER *et al.*, 2012).

Em *R. solanacearum*, a contribuição dos metabólitos secundários para a virulência permanece pouco esclarecida (KAI *et al.*, 2014), mas sabe-se que o *quorum sensing* (QS) possui um papel fundamental, pois consiste em um mecanismo de comunicação que controla a virulência nessas bactérias e, conseqüentemente, é responsável pela produção dos metabólitos secundários (YOSHIHARA *et al.*, 2020). Esse mecanismo de comunicação é sinalizado em *R. solanacearum* pela molécula acyl homoserine lactone (KUMAR *et al.*, 2016). A identificação de metabólitos secundários e sua regulação por *quorum sensing*, assim como a elucidação de seus papéis biológicos, tornou-se um tema importante no estudo das interações planta-bactéria (KAI *et al.*, 2014).

### **1.5. Genômica comparativa de *Ralstonia solanacearum***

A técnica de sequenciamento genômico permite identificar, na ordem correta, a sequência das bases nucleotídicas de uma molécula, que pode ser de DNA ou RNA, objetivando conhecer a informação genética contida nesta estrutura. Este sequenciamento trabalha com DNA advindo diretamente do DNA genômico (que guarda a maior parcela da informatividade genética dos organismos) ou com outras moléculas de DNA celular como: DNA mitocondrial, DNA cloroplastídico, DNA plasmidial, entre outros (FIETTO; MACIEL, 2015).

O conhecimento da informação gênica de determinado organismo possibilita compreender os mecanismos de interação planta-patógeno, analisar a relação filogenética entre espécies (LIU *et al.*, 2017a), detectar diferentes componentes da história evolutiva (PRIOR; FEGAN, 2005) e identificar proteínas associadas a patogenicidade (SALANOUBAT *et al.*, 2002). Além disso, o sequenciamento possibilita obter informações referentes a estrutura e função dos genes, diversidade genética, presença de elementos móveis no genoma, presença de genes adquiridos por transferência lateral e relações evolutivas, além de permitir a construção de mapas metabólicos dentre outros (NIERMAN *et al.*, 2000), tudo isso aliado com utilização da bioinformática como ferramenta na manipulação dos dados genômicos de diversos

microrganismos (AILLOUD *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2017a; PRIOR *et al.*, 2016; REMENANT *et al.*, 2010).

Na fitobacteriologia, a genômica iniciou com o sequenciamento completo da bactéria *Xylella fastidiosa* 9a5c (WELLS *et al.*, 1981) agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CVC), em plantas do gênero *Citrus* (SIMPSON *et al.*, 2000), que acabou por impulsionar as pesquisas de genomas de bactérias fitopatogênicas nos anos seguintes, com o sequenciamento de representantes dos principais gêneros fitopatogênicos (GOODNER *et al.*, 2001; WOOD *et al.*, 2001; DA SILVA; FERRO; REINACH, 2002; BUELL *et al.*, 2003; SALANOUBAT *et al.*, 2002; BELL *et al.*, 2004).

A fitobactéria *R. solanacearum*, patogênica a mais de 200 espécies de plantas (DENNY, 2006), teve o primeiro isolado (GMI1000), proveniente de tomateiro, sequenciado em 2002, sendo classificado como pertencente a raça 1, sequevar I-18 (SALANOUBAT *et al.*, 2002). Atualmente, sabe-se que de acordo com a reclassificação de Safni *et al.* (2014), tal isolado pertence ao filotipo I renomeado como *R. pseudosolanacearum*. De acordo com Salanoubat *et al.* (2002), o genoma de GMI1000 possui 66,97% de conteúdo G+C médio, constituído de dois *replicons*, cromossomo e megaplasmídeo, com tamanho de 3,7 Mb e 2 Mb, respectivamente. O maior *replicon*, também chamado de cromossomo, carrega características clássicas dos genomas bacterianos, associados à origem de replicação e outros genes constitutivos (*housekeeping*). O *replicon* menor apresenta uma presumível origem plasmidial devido à quantidade de genes *repA* próximos ao sítio de replicação. Entretanto, devido a ambos *replicons* possuírem genes essenciais e associados a patogênese, existe a possibilidade de ter havido uma co-evolução e, na realidade, esse grupo possua um genoma com dois cromossomos (COENYE; VANDAMME, 2003; GUIDOT *et al.*, 2009).

Para suportar esse tipo de análise, é extremamente importante ter sequências genômicas disponíveis que possam representar grupos de organismos. Desde a publicação da sequência do genoma do isolado GMI1000, houve um aumento significativo da disponibilização de sequências genômicas de *Ralstonia* spp. em bancos de dados, fato que está diretamente relacionado com o baixo custo da técnica de sequenciamento de genoma (ZHANG; QIU, 2016) em alguns países.

Atualmente, os genomas de 203 isolados de *R. solanacearum* estão disponíveis no NCBI, destes 23 são provenientes de banana ou banana-da-terra da América Central (Costa Rica), Caribe (Granada), América Norte (México), América Sul (Brasil, Colômbia, Venezuela e Peru) e Ásia (Filipinas) (NCBI, 2020) (Tabela 2). Como observado na Tabela 2, do Brasil estão disponíveis apenas sete genomas de isolados de *R. solanacearum* ecótipo Moko da



bananeira, sendo cinco que causam sintomas típicos e dois que causam a síndrome Sergipe.

**Tabela 2.** Descrição dos genomas de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko disponíveis no NCBI

Isolado	Sequevar	Origem	Nível	Tamanho (Mb)	Acesso
B50 <sup>M</sup>	IIA-24	Peru	<i>Scaffold</i>	5,6	GCF_000825785.1
CFBP1416 <sup>M</sup>	IIB-3	Costa Rica	<i>Scaffold</i>	5,7	GCF_000825925.1
CCRMrs277 <sup>M</sup>	IIA-24	Brasil	<i>Chromossome</i>	5,6	GCA_014210395.1
CCRMrs287 <sup>M</sup>	IIB-4	Brasil	<i>Chromossome</i>	5,4	GCA_014210375.1
CCRMrs304 <sup>M</sup>	IIA-24	Brasil	<i>Chromossome</i>	5,6	GCA_014210335.1
CCRMrsB7 <sup>M</sup>	IIB-25	Brasil	<i>Chromossome</i>	5,8	GCA_014210345.1
Grenada 9-1 <sup>M</sup>	IIA-6	Granada	<i>Scaffold</i>	5,5	GCF_000825845.1
IBSBF1900 <sup>M</sup>	IIA-24	Brasil	<i>Scaffold</i>	5,8	GCF_001373275.1
Po82 <sup>M</sup>	IIB-4	México	<i>Complete</i>	5,4	GCF_000215325.1
UW163 <sup>M</sup>	IIB-4	Peru	<i>Complete</i>	5,6	GCF_001587135.1
UW179 <sup>M</sup>	IIB-4	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5,4	GCF_000825805.1
UW181 <sup>M</sup>	IIA-6	Venezuela	<i>Scaffold</i>	5,4	GCF_001373315.1
UA-1609 <sup>M</sup>	IIB-4	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5,1	GCF_003860765.1
UA-1617 <sup>M</sup>	IIB-4	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5,4	GCF_003860745.1
UA-1579 <sup>M</sup>	IIB-4	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5,1	GCF_003860725.1
UA-1591 <sup>M</sup>	IIB-4	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5,3	GCF_003860705.1
UA-1611 <sup>M</sup>	IIA-6	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5,2	GCF_003860685.1
UA-1612 <sup>M</sup>	IIA-6	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5,0	GCF_003860665.1
CIP417 <sup>B</sup>	IIB-3	Filipinas	<i>Scaffold</i>	5,5	GCF_000825825.1
MOLK2 <sup>B</sup>	IIB-3	Filipinas	<i>Contig</i>	5,5	GCF_000212635.3
10314	II	Filipinas	<i>Contig</i>	5,4	GCF_008271875.1
SFC <sup>SE</sup>	IIA-53	Brasil	<i>Chromossome</i>	5,7	GCF_003590625.1
IBSBF2570 <sup>SE</sup>	IIA-53	Brasil	<i>Chromossome</i>	5,7	GCF_003590585.1

<sup>M</sup> – Sintomas típicos de Moko;

<sup>B</sup> – Sintomas de Bugtok;

<sup>SE</sup> – Sintomas de síndrome Sergipe.

Com a elevação do número de genomas disponíveis, viu-se a possibilidade de estudos mais aprofundados, como as análises de genômica comparativa, que abrem caminho para análises com maior refinamento. As análises comparativas são utilizadas para identificar padrões genômicos entre organismos (CAMARGO, 2018) para suportar análises filogenéticas (FEGAN; PRIOR, 2005; SAFNI *et al.*, 2014), para contribuir no entendimento da adaptação a hospedeiros específicos (AILLOUD *et al.*, 2015) e para compreender a história evolutiva de genes de virulência (GENIN; BOUCHER, 2004), entre outros.

A análise comparativa das sequências genômicas de *R. solanacearum* confirmou a diferenciação dos isolados do antigo complexo de espécie em quatro filotipos e considerou uma nova reclassificação em três espécies independentes (REMENANT *et al.*, 2010). Evidências genômicas e proteômicas também confirmaram a divisão (PRIOR *et al.*, 2016) e essas espécies foram nomeadas nas três espécies independentes (SAFNI *et al.* 2014).

Além dos avanços na classificação taxonômica do grupo, análises comparativas também podem detectar a evolução de genes de virulência, como os genes *hrp* e genes efetores tipo III (T3E), assim como fatores de patogenicidade relacionados entre isolados de *Ralstonia* e outras bactérias fitopatogênicas. Também foi possível inferir sobre mecanismos que contribuem para a rápida adaptação da bactéria ao ambiente em geral e a interação desta com as plantas em particular (GENIN; BOUCHER, 2004). Uma das constatações obtidas através de genômica comparativa entre dois isolados de *R. solanacearum* foi a existência de alto nível de identidade na região *hrp*, concluindo-se que essa região é antiga e estável no grupo (GENIN; BOUCHER, 2004). Além disso, os autores explicaram que a análise de sequências de outras linhagens de *R. solanacearum* é importante para estimar a extensão da diversidade genômica nas espécies, considerando a versatilidade ecológica da fitobactéria e sua habilidade natural para competência.

A genômica comparativa também foi a ferramenta utilizada para analisar a estreita relação entre organismos que possuem uma alta afinidade com determinados hospedeiros, denominados de ecótipo. Ao comparar representantes de *R. solanacearum* que causam Moko com linhagens tolerantes ao frio que causam podridão parda em batata (também conhecidas como ‘brown root’ e R3bv2) e as novas linhagens não patogênicas a banana (NPB), verificou-se poucas características divergentes entre elas, uma vez que o grupo dos isolados de Moko (polifilético) incluem linhagens que são filogeneticamente próximas aos isolados que causam podridão parda da batata e NPB (monofiléticos) (AILLOUD *et al.*, 2015). Contudo, diferenças marcantes na expressão de genes relacionados à virulência (AILLOUD *et al.*, 2015) e ao metabolismo (AILLOUD *et al.*, 2016) foram associadas ao surgimento dessa estreita relação. Foram identificados eventos de perda gênica, polimorfismos não-sinônimos e transferência horizontal de genes dos efetores do tipo III, que foram associados a diferença na gama de hospedeiros (AILLOUD *et al.*, 2015).

Os avanços obtidos com a genômica comparativa em *R. solanacearum* são evidentes, no entanto, esta técnica ainda não foi aplicada aos genomas dos isolados que causam sintomas típicos de Moko e suas variantes (Bugtok e síndrome Sergipe), evidenciando a necessidade de mais pesquisas para melhorar a compreensão das características intrínsecas desses organismos,

como fatores de patogenicidade e virulência dos três quadros sintomatológicos de Moko. Sendo assim, os objetivos desta tese foram (i) sequenciar, montar, anotar e comparar genomas de *R. solanacearum* ecótipo Moko do Brasil, pertencentes às sequevares IIA-24, IIB-4 e IIB-25; e (ii) realizar genômica comparativa e filogenômica com o ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas, visando investigar as peculiaridades relacionadas aos fatores de patogenicidade e virulência.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, A. M.; PITTIUS, N. C. G.; CHAMPION, P. A. D., COX, J.; LUIRINK, J., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E.; APPELMELK, B. J.; BITTER, W. Type VII secretion--mycobacteria show the way. **Nature reviews microbiology**, London, v. 5, n. 11, p. 883-91, 2007.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.
- AGROSTAT - **Estatísticas de comercio exterior do agronegócio brasileiro**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018. Disponível em: <<http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>> Acesso em: 21 Abril de 2020.
- AILLOUD, F.; CELLIER, G.; YAHIAOUI, N.; REMENANT, B.; ALLEN, C.; PRIOR, P. Banana Moko disease and diversity of its unpredictable causative agent *Ralstonia solanacearum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 45. 2012. Manaus. **Anais...** Manaus: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2012. CD-ROM 2.
- AILLOUD, F.; LOWE, T. L.; ROBÈNE, I.; CRUVEILLER, S.; ALLEN, C.; PRIOR, P. In planta comparative transcriptomics of host-adapted strains of *Ralstonia solanacearum*. **PeerJ**, Corte Madera, p. 1-18, 2016.
- AILLOUD, F.; LOWE, T.; CELLIER, G.; ROCHE, D.; ALLEN, C.; PRIOR, P. Comparative genomic analysis of *Ralstonia solanacearum* reveals candidate genes for host specificity. **BMC Genomics**, London, v. 16, p. 270-281, 2015.
- ALBUQUERQUE, G. M. R.; LILIANA, A. SANTOS, L. A.; FELIX, K. C. S.; ROLLEMBERG, C. L.; SILVA, A. M. F.; SOUZA, E. B.; CELLIER, G.; PRIOR, P.; MARIANO, R. L. R. Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II. **Phytopathology**, Ithaca, v. 104, n. 11, p. 1175-1182, 2014.
- ALMEIDA, C. O.; SOUZA, J. S.; CORDEIRO, Z. J. M. Aspectos socioeconômicos. In: CORDEIRO, Z.J.M. (Org.). **Banana produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia (Frutas do Brasil, 1), 2000. 142 p.
- ÁLVAREZ, B.; BIOSCA, E. G.; LÓPEZ, M. M. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. cap. 1, p. 267-279.

ARAUD-RAZOU, I.; VASSE, J.; MONTROZIER, H.; ETCHEBAR, C.; TRIGALET, A. Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 104, p. 795-809, 1998.

BECKMAN, C.H.; BRUN, W.A.; BUDDENHAGEN, J.W. Water relations in banana plants infected with *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, Ithaca, v. 52, p.1144-1148, 1962.

BEDENDO, I. P. Murchas vasculares. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5ª.ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. cap.25, p.333-338.

BELL, K. S.; SEBAIHIA, M.; PRITCHARD, L.; HOLDEN, M. T. G.; HYMAN, L. J.; HOLEVA, M. C.; THOMSON, N. R.; BENTLEY, S. D.; CHURCHER, L. J. C.; MUNGALL, K.; ATKIN, R.; BASON, N.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CLARK, K.; DOGGETT, J.; FRASER, A.; HANCE, Z.; HAUSER, H.; JAGELS, K.; MOULE, S.; NORBERTCZAK, H.; ORMOND, D.; PRICE, C.; QUAIL, M. A.; SANDERS, M.; WALKER, D.; WHITEHEAD, S.; SALMOND, G. P. C.; BIRCH, P. R. J.; PARKHILL, J.; TOTH, I. K. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 30, p. 11105-10, 2004.

BLOMME, G.; DITA, M.; JACOBSEN, K. S.; VICENTE, L. P.; MOLINA, A.; WALTER, O.; POUSSIER, S.; PRIOR, P. Bacterial Diseases of Bananas and Enset : Current State of Knowledge and Bacterial Diseases of Bananas and Enset : Current State of Knowledge and Integrated Approaches Toward Sustainable Management. **Plant Microbe Interactions**, Lausanne, v. 8, n. 1290, p. 1-26, 2017.

BOCSANCZY, A. M.; HUGUET-TAPIA, J. C.; NORMAN, D. J. Comparative Genomics of *Ralstonia solanacearum* Identifies Candidate Genes Associated with Cool Virulence. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne. v. 8, p. 1-16, 2017.

BOUCHER, C. A.; VAN GIJSEGEM, F.; BARBERIES, P. A.; ARLAT, M.; ZISCHEK, C. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, n. 12, p. 5626–5633, 1987.

BOUCHER, C.; GENIN, S. The *Ralstonia solanacearum*-plant interaction. In: TALBOT, N. J. **Plant-Pathogen Interactions**. USA: CRC Press LLC, 2004, cap. 4, p. 92-102.

BUDDENHAGEN, I.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, Ithaca, v. 52, p.726, 1962.

BUELL, C. R.; JOARDAR, V.; LINDEBERG, M. SELENGUT, J.; PAULSEN, I. T.; GWINN, M. L.; DODSON, R. J.; DEBOY, R. T.; DURKIN, A. S.; KOLONAY, J. F.; MADUPU, R.; DAUGHERTY, S.; BRINKAC, L.; BEANAN, M. J.; HAFT, D. H.; NELSON, W. C.; DAVIDSEN, T.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; LIU, J.; YUAN, Q.; KHOURI, H.; FEDOROVA, N.; TRAN, B.; RUSSELL, D.; BERRY, K.; UTTERBACK, T.; VAN AKEN, S. E.; FELDBLYUM, T. V.; D'ASCENZO, M.; DENG, W. L.; RAMOS, A. R.; ALFANO, J. R.; CARTINHO, S.; CHATTERJEE, A. K.; DELANEY, T. P.;

- LAZAROWITZ, S. G.; MARTIN, G. B.; SCHNEIDER, D. J.; TANG, X.; BENDER, C. L.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; COLLMER. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 18, p. 10181-6, 2003.
- CALDWELL, D.; KIM, B-S.; IYER-PASCUZZI, A. S. *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. **Phytopathology**, Ithaca, v. 107, p. 528-536, 2017.
- CAMARGO, L. E. A. Genômica aplicada a fitopatologia. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. p.473-478.
- CLOUGH, S. J, FLAVIER A. B.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Differential expression of virulence genes and motility in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* during exponential growth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 844–850, 1997.
- COBURN, B.; SEKIROV, I.; FINLAY, B. B. Type III secretion systems and disease. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, p. 535-549, 2007.
- COELHO NETTO, R. A.; NUTTER JÚNIOR, F. W. Use of GPS and GIS technologies to map the prevalence of Moko disease of banana in the amazon region of Brazil. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p. 431-436.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Simple sequence repeats and compositional bias in the bipartite *Ralstonia solanacearum* GMI1000 genome. **BMC Genomics**, London, v. 4, n. 10, p. 1-9, 2003.
- CORDEIRO, Z. J. M. **Banana: fitossanidade**. Brasília: Embrapa para transferência de Tecnologia, 2000. 121 p (Frutas do Brasil, 8).
- CORDEIRO, Z. J.M.; MATOS, A. P. Doenças fúngicas e bacterinas. In: CORDEIRO, Z. J.M. **Banana fitossanidade**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2000. p. 36-65 (Frutas do Brasil, 8).
- CORRAL, J.; SEBASTIÀ, P.; COLL, N. S. BARBÉ, J.; ARANDA, J.; VALLS, M. Twitching and Swimming Motility Play a Role in *Ralstonia solanacearum*. **mSphere**, Washington, v. 5, n. 2, 1-16, 2020.
- DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v. 417, n. 6887, 459-63, 2002.
- DENNY, T. Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: GNANAMANICKAM, S.S. **Plant-Associated Bacteria**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 573-644.
- FAO. Fao-Food and Agriculture Organization. **Faostat**. 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 04 Abril 2020.

- FEGAN, M.; PRIOR, P. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilt of banana. **Australasian Plant Pathology**, Rockhampton, v. 35, n. 2, p. 93-101, 2006.
- FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. Saint Paul: APS Press, 2005. p. 449-461.
- FERNÁNDEZ, L. A.; BERENGUER, J. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 21– 44, 2000.
- FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando genomas. In: MOREIRA, L. M. **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto, 2015. p. 27-64.
- GENIN, S.; BOUCHER, C. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 107-134, 2004.
- GENIN, S.; DENNY, T. P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 67-89, 2012.
- GENIN, S.; GOUGH, C. L.; ZISCHEK, C.; BOUCHER, C. A. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 20, p. 3065-3076, 1992.
- GOODNER, B.; HINKLE, G.; GATTUNG, S.; MILLER, N.; BLANCHARD, M.; QUOROLLO, B.; GOLDMAN, B. S.; CAO, Y.; ASKENAZI, M.; HALLING, C.; MULLIN, L.; HOUMIEL, K.; GORDON, J.; VAUDIN, M.; IARTCHOUK, O.; EPP, A.; LIU, F.; WOLLAM, C.; ALLINGER, M.; DOUGHTY, D.; SCOTT, C.; LAPPAS, C.; MARKELZ, B.; FLANAGAN, C.; CROWELL, C.; GURSON, J.; LOMO, C.; SEAR, C.; STRUB, G.; CIELO, C.; SLATER, S. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, London, v. 294, n. 5550, p. 2323-8, 2001.
- GRIMAUULT, V.; PRIOR, P. Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 42, p. 589-594, 1993.
- GUERRERO-MANDUJANO, A.; HERNÁNDEZ-CORTEZ, C. IBARRA, J. A.; CASTRO-ESCARPULLI, G. The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. **Traffic**, Copenhagen, v. 18, p. 425-432, 2017.
- GUIDOT, A.; ELBAZ, M.; CARRERE, S.; SIRI, M. I.; PIANZZOLA, M. J.; PRIOR, P.; BOUCHER, C. Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. **Phytopathology**, Ithaca, v.99, n. 9, p.1105-1112, 2009.
- GUTARRA, L.; HERRERA, J.; FERNANDEZ, E.; KREUZE, J.; LINDQVIST-KREUZE, H. Diversity, pathogenicity, and current occurrence of bacterial wilt bacterium *Ralstonia solanacearum* in Peru. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8. n. 1221, p. 1-12, 2017.
- 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.

HAYWARD, A. C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of applied bacteriology**, London, v. 27, p. 265-277, 1964.

HAYWARD, A. C.; EL-NASHAAR, H. M.; NYDEGGER, U.; DE LINDO, L. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of applied bacteriology**, London, v. 69, p. 269-80, 1990.

HE, Y. W.; WU, J.; ZHOU, L.; YANG, F.; HE, Y. Q.; JIANG, B. L.; BAI, L.; XU, Y.; DENG, Z.; TANG, J. L.; ZHANG, L. H. *Xanthomonas campestris* diffusible factor is 3-hydroxybenzoic acid and is associated with xanthomonadin biosynthesis, cell viability, antioxidant activity, and systemic invasion. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 24, n. 8, p. 948-957, 2011.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuario 2017**: Sistema IBGE de recuperação automática [on line]. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuaria/censo-agropecuaria-2017>> Acesso em: 21 Novembro 2020.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA 2018**: Sistema IBGE de recuperação automática [on line]. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>> Acesso em: 10 Novembro 2020.

JEONG, Y.; KIM, J.; KIM, S.; KANG, Y.; NAGAMATSU, T.; HWANG, I. Toxoflavin Produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 8, p. 890-895, 2003.

JONES, J. D. G.; DANGLE, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

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

KAI, K.; OHNISHI, H.; KIBA, A.; OHNISHI, K.; HIKICHI, Y. Studies on the biosynthesis of ralfuranones in *Ralstonia solanacearum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, England, v. 80, n. 3, p. 440–444, 2016.

KAI, K.; OHNISHI, H.; MORI, Y.; KIBA, A.; OHNISHI, K.; HIKICHI, Y. Involvement of ralfuranone production in the virulence of *Ralstonia solanacearum* OE1-1. **Chembiochem**, Germany, v. 15, n. 17, p. 2590-2597, 2014.

KANG, Y.; HUANG, J.; MAO, G.; HE, L. Y.; SHELL, M. A. Dramatically reduced virulence of mutants of *Pseudomonas solanacearum* defective in export of extracellular proteins across the outer membrane. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 7, n. 3, p. 370-377, 1994.

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

KIM, J.; KIM, J. G.; KANG, Y.; JANG, J. Y.; JOG, G. J.; LIM, J. Y.; KIM, S.; SUGA, H.; NAGAMATSU, T.; HWANG, I. Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 921-934, 2004.

KUMAR, J.; UMESHA, S.; PRASAD, S.; NIRANJANA, P. Detection of Quorum Sensing Molecules and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. **Current Microbiology**, United States, v. 72, n. 3, 2016.

LI, Y. H.; TIAN, X. *Quorum sensing* and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors**, Stevenson Ranch, v. 12, n. 3, p. 2519-2538, 2012.

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 Ch United States ina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 7, p. 1288-1296, 2016.

LIU, H.; ZHANG, S.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, p. 1296-1305, 2005.

LIU, Y.; TANG, Y.; QIN, X.; YANG, L.; JIANG, G.; LI, S.; DING, W. Genome sequencing of *Ralstonia solanacearum* CQPS-1, a phylotype I Strain collected from a highland area with continuous cropping of tobacco. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 8, n. 5, p. 974-983, 2017a.

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**, London, n. 147, p. 541-551, 2017b.

LOPES, C. A.; ROSSATO, M. **Diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013. 10 p (Comunicado técnico, 92).

LOWE-POWER, T. M.; KHOKHANI, D.; ALLEN, C. How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 26, n. 11, p. 1-14, 2018.

MACNAB, R. M. Flagella and motility. In: NEIDHARDT, F. C.; CURTISS, R.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW K. B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W. S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER H. E. (Eds.) ***Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology**, 2. ed. Washington: ASM Press, 1996, v. 1, p. 123-145.

MALAVOLTA JR., V. A.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G. Doenças causadas por bactérias. In: NOGUEIRA, E. M. C.; ALMEIDA, I. M. G.; FERRARI, J. T.; BERIAM, L. O. S. (Eds.) **Bananicultura: Manejo Fitossanitário e Aspectos Econômicos e Sociais da Cultura**. São Paulo: Instituto Biológico, 2013, p. 105-115.



MAPA. **Instrução Normativa Nº 17**, de 27/05/2009. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>> Acesso em: 3 Janeiro 2021.

MAPA. **Instrução Normativa Nº 25**, de 07/04/2020. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-25-de-7-de-abril-de-2020-251968344>>. Acesso em: 19 Novembro 2020.

MAPA. **Instrução Normativa Nº 38**, de 01/10/2018. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=02/10/2018&jornal=515&pagina=14/>>. Acesso em: 10 de abril 2020.

MEHAN, V. K.; LIAO, B. S.; TAN, Y. J.; ROBINSON-SMITH, A.; MCDONALD, D.; HAYWARD, A. C. **Bacterial wilt of groundnut**. Patancheru: Internacional Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1994. 25 p. (ICRISAT Information Bulletin, 35).

MEHAN, V. K.; MCDONALD, D. **Techniques for diagnosis of *Pseudomonas solanacearum* and for resistance screening against groundnut bacterial wilt**. Patancheru: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1995. 77 p. (ICRISAT Technical Manual no. 1).

MORI, Y.; HOSOI, Y.; ISHIKAWA, S.; HAYASHI, K.; ASAI, Y.; OHNISHI, H.; SHIMATANI, M.; INOUE, K.; IKEDA, K.; NAKAYASHIKI, H.; NISHIMURA, Y.; OHNISHI, K.; KIBA, A.; KAI, K.; HIKICHI, Y. Ralfuranones contribute to mushroom-type biofilm formation by *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. **Molecular Plant Pathology**, England, v. 19, n. 4, p. 975-985, 2018.

NASCIMENTO, R.; GOURAN, H.; CHAKRABORTY, S.; GILLESPIE, H. W.; ALMEIDA-SOUZA, H. O.; TU, A.; RAO, B. J.; FELDSTEIN, P. A.; BRUENING, G., GOULART, L. R.; DANDEKAR, A. M. The type II Secreted Lipase/Esterase LesA is a Key Virulence Factor Required for *Xylella fastidiosa* Pathogenesis in Grapevines. **Scientific Reports**, London, v. 6, p.1-16, 2016.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 20 de Novembro 2020.

NIERMAN, W. C.; EISEN, J. A.; FLEISCHMANN, R. D.; FRASER, C. M. Genome data: what do we learn? **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 10, n. 3, p. 343-348, 2000.

NOGUEIRA, E. M. C. Moko ou murcha bacteriana da bananeira. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 13. 2005. São Paulo. **Anais ...** Instituto Biológico, 2005. p. 23-27.

PEETERS, N.; CARRÈRE, S.; ANISIMOVA, M.; PLENER, L.; CAZALÉ, A. C.; GENIN, S. Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex. **BMC Genomics**, London, v. 14, n. 859, p. 1-18, 2013.

PENSEC, F.; LEBEAU, A.; DAUNAY, M. C.; CHIROLEU, F.; GUIDOT, A.; WICKER, E. Towards the identification of Type III effectors associated with *Ralstonia solanacearum* virulence on tomato and eggplant. **Phytopathology**, Ithaca, v. 105, n. 12, p. 1529-1544, 2015.

PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A. F. S.; VERAS, S. M. **Doenças da bananeira no estado do Amazonas**. Manaus: EMBRAPA, 2003. 12 p. (Circular técnica, 20).

PERRIER, X.; DE LANGHE, E.; DONOHUE, M.; LENTFER, C.; VRYDAGHS, L.; BAKRY, F.; CARREEL, F.; HIPPOLYTE, I.; HORRY, J. P.; JENNY, C.; LEBOT, V.; RISTERUCCI, A. M.; TOMKPE, K.; DOUTRELEPONT, H.; BALL, T.; MANWARING, J.; DE MARET, P.; DENHAM, T. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa spp.*) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 28, p. 11311-11318, 2011.

PLENER, L.; BOISTARD, P.; GONZÁLEZ, A.; BOUCHER, C.; GENIN, S. Metabolic adaptation of *Ralstonia solanacearum* during plant infection: a methionine biosynthesis case study. **Plos One**, California, v. 7, n. 5, p. 1 - 10, 2012.

PLOETZ, R. C.; THOMAS, J.E; SLABAUGH, W.R. Diseases of banana and plantain. In: PLOETZ, R. C. **Diseases of tropical fruit crops**. Cambridg: CABI Publishin, 2003. cap. 4, p. 73-134.

PRESTON, G. M.; STUDHOLME, D.J.; CALDELARI, I. Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 331-360, 2005.

PRIOR, P.; FEGAN, M. Recent Developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. **Acta horticulturae**, Netherlands, v. 695, p. 127-136, 2005.

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.; COUPAT-GOUTALAND, B.; GUIDOT, A.; CELLIER, G.; WICKER, E.; ALLEN, C.; FEGAN, M.; PRUVOST, O.; ELBAZ, M.; CALTEAU, A.; SALVIGNOL, G.; MORNICO, D.; MANGENOT, S.; BARBE, V.; MÉDIGUE, C.; PRIOR, P. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 6, p. 379, 2010.

ROBBS, C. F. Moko ou murcha bacteriana da bananeira no Brasil. In: 1º SIMPOSIO SOBRE BANANEIRA PRATA, 1983. Cariacica. **Anais...** Cariacica. 1983, p. 113-119.

ROPEROS, N. I. Notes on the occurrence of a new disease in cooking banana in the Philippines. **Coffee and Cacao Journal**, Indonesia, v. 8, p. 135-136, 1965.

ROQUE, R.L.; AMORIM, T.B.; FERREIRA, C.F.; LEDO, C. A. S.; AMORIM, E. P. Desempenho agrônômico de genótipos de bananeira no recôncavo da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 598-609, 2014.

SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L.; KAPPLER, U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *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. 3087-3103, 2014.

SAFNI, I.; SUBANDIYAH, S.; FEGAN, M. Ecology, epidemiology and disease management of *Ralstonia syzygii* in Indonesia. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 9, n. 419, p. 1-11, 2018.

SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULTK, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J. C.; CATTOLICO, L.; CHANDLER, M.; CHOISNE, N.; CLAUDEL-RENARDI, C.; CUNNAC, S.; DEMANGE, N.; GASPIN, C.; LAVIE, M.; MOISAN, A.; ROBERT, C.; SAURIN, W.; SCHIEX, T.; SIGUIER, P.; THEÂBAULT, P.; WHALEN, M.; WINCKER, P.; LEVY, M.; WEISSENBACH, J.; BOUCHER, C. A. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, Londres, v. 415, p. 497-520, 2002.

SALOMÃO, L. C. C.; SIQUEIRA, D. L. **Cultivo de bananeira**. Viçosa: Editora UFV, 2015. p. 109.

SANTIAGO, T. R.; LOPES, A. C.; MIZUBUTI, E. S. G. Diversidade e variabilidade de *Ralstonia* spp. In: GAMA, M. S.; NICOLI, A.; GUIMARÃES, L. M. P.; LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. **Estudo da arte em fitopatologia**. Recife: EDUFRPE, 2016. p. 243-255.

SANTIAGO, T. R.; LOPES, C. A. CAETANO-ANOLLOES, G.; MIZUBUTIA, E. S. G. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. **Plant Pathology**, Oxford, v. 66, n. 3, p. 383-392, 2016.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNI, D. S. Metabolômica. In: MOREIRA, L. M. **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Editora Cubo, 2015, p. 199-225.

SEQUEIRA, L. Bacterial wilt: The missing element in international banana improvement programs. In: PRIOR, P.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. **Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects**. Berlin: Springer, 1998. p. 6-14.

SILVA JUNIOR, W. J.; ASSIS, T. C.; ANDRADE, D. E. G. T.; GURGEL, L. M. S.; ROSA, R. C. T. Revisões Manejo do mal-do-panamá da bananeira. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 15, n. 2, p. 73-90, 2018.

SILVA, J. R.; PAIS, A. K. L.; ALBUQUERQUE, G. M. R.; SILVA, A. M. F.; SILVA JUNIOR, W. J.; BALBINO, V. Q.; FONSECA, M. E. N.; GAMA, M. A. S.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Genomic sequencing of two isolates of *Ralstonia solanacearum* causing Sergipe facies and comparative analysis with Bugtok disease isolates. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirao Preto, v. 43, p. 4, 2020.

SIMPSON, A. J.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.; BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; BOVÉ, J.M.; BRIONES, M. R.; BUENO, M. R.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, L. E.; CARRARO, D. M.; CARRER, H.; COLAUTO, N. B.; COLOMBO, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C.; COSTA-NETO, C. M.; COUTINHO, L. L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, V. C.; FERRO, J. A.; FRAGA, J. S.; FRANÇA, S. C.; FRANCO, M. C.; FROHME, M.; FURLAN, L. R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; GOMES, S.L.; GRUBER, A.; HO, P. L.; HOHEISEL, J. D.; JUNQUEIRA, M.L.; KEMPER, E. L.; KITAJIMA, J. P.; KRIEGER, J.

E.; KURAMAE, E. E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M. R.; LEITE, L. C.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOPES, S. A.; LOPES, C. R.; MACHADO, J. A.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MADEIRA, H. M.; MARINO, C. L.; MARQUES, M. V.; MARTINS, E. A.; MARTINS, E. M.; MATSUKUMA, A. Y.; MENCK, C. F.; MIRACCA, E. C.; MIYAKI, C. Y.; MONTERIRO-VITORELLO, C. B.; MOON, D. H.; NAGAI, M. A.; NASCIMENTO, A. L.; NETTO, L. E.; NHANI JÚNIOR, A.; NOBREGA, F. G.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, M. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE OLIVEIRA, R. C.; PALMIERI, D. A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B. R.; PEREIRA, G. A.; PEREIRA JÚNIOR, H. A.; PESQUERO, J. B.; QUAGGIO, R. B.; ROBERTO, P. G.; RODRIGUES, V.; DE ROSA JÚNIOR, V. E.; DE SÁ, R. G.; SANTELLI, R. V.; SAWASAKI, H. E.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DA SILVA, F. R.; DA SILVA JÚNIOR, W. A.; DA SILVEIRA, J. F.; SILVESTRI, M. L.; SIQUEIRA, W. J.; DE SOUZA, A. A.; DE SOUZA, A. P.; TERENCEZI, M. F.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; TSUHAKO, M. H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A. L.; ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J. C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, London, v. 406, n. 6792, p. 151-9, 2000.

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

SOGUILON, C. E.; MAGNAYE, L. V.; NATURAL, M. P. Bugtok disease of Banana. **Inibap**: Montpellier, v. 33, p. 4, 1995.

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

TAN, X.; QIU, H.; FENG LI, F.; CHENG, D.; ZHENG, X.; WANG, B.; HUANG, M.; LI, W.; LI, Y.; SANG, K.; SONG, B.; DU, J.; CHEN, H.; XI, C. Complete genome sequence of sequenced 14M *Ralstonia solanacearum* strain HA4-1 reveals novel Type III effectors acquired through horizontal gene transfer. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 10, n. 1893, p. 1-16, 2019.

TANS-KERSTEN, J.; HUANG, H. Y.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 12, p. 3597-3605, 2001.

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 12, n. 4, p. 420-430, 2000.

THWAITES, R.; EDEN-GREEN, S. J.; BLACK, R. Diseases caused by bacteria. In: JONES, D. R. **Diseases of banana, abaca and enset**. Wallingford: CABI Publishing; 2000. p. 213-239.

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

VAN GIJSEGEM, F.; VASSE, J.; CAMUS, J. C.; MARENDA, M.; BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 2, p.

249-260, 2000.

VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 8, n. 6, p. 800-810, 1995.

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

VON BODMAN, S. B.; BAUER, W. D.; COPLIN, D. L. *Quorum sensing* in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 455-482, 2003.

WALLIS, C.M.; WALLINGFORD, A. K.; CHEN, J. Effects of cultivar, phenology, and *Xylella fastidiosa* infection on grapevine xylem sap and tissue phenolic content. **Physiological and molecular plant pathology**, London, v. 84, p. 28-35, 2013.

WARDLAW, C. W. **Banana Diseases Including Plantains and Abaca**. 2<sup>a</sup>.ed. London. Longman. 1972. 878 p.

WEIBEL, J.; TRAN, T. M.; BOCSANCZY, A. M.; DAUGHTREY, M.; NORMAN, D.J.; MEJIA, L.; ALLEN, C. A *Ralstonia solanacearum* strain from Guatemala infects diverse flower crops, including new asymptomatic hosts Vinca and Sutera, and causes symptoms in geranium, mandevilla vine, and new host african daisy (*Osteospermum ecklonis*). **Plant Health Progress**, Valencia, v. 17, p. 114-121, 2016.

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**, England, v. 6, n. 5, p. 961-974, 2012.

WOOD, D. W.; SETUBAL, J. C.; KAUL, R.; MONKS, D. E.; KITAJIMA, J. P.; OKURA, V. K.; ZHOU, Y.; CHEN, L.; WOOD, G. E.; ALMEIDA, N. F. J.; WOO, L.; CHEN, Y.; PAULSEN, I. T.; EISEN, J. A.; KARP, P. D.; BOVEE, D. S.; CHAPMAN, P.; CLENDENNING, J.; DEATHERAGE, G.; GILLET, W.; GRANT, C.; KUTYAVIN, T.; LEVY, R.; LI, M. J.; MCCLELLAND, E.; PALMIERI, A.; RAYMOND, C.; ROUSE, G.; SAENPHIMMACHAK, C.; WU, Z.; ROMERO, P.; GORDON, D.; ZHANG, S.; YOO, H.; TAO, Y.; BIDDLE, P.; JUNG, M.; KRESPAN, W.; PERRY, M.; GORDON-KAMM, B.; LIAO, L.; KIM, S.; HENDRICK, C.; ZHAO, Z. Y.; DOLAN, M.; CHUMLEY, F.; TINGEY, S. V.; TOMB, J. F.; GORDON, M. P.; OLSON, M. V.; NESTER, E. W. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, London, v. 294, n. 5550, p. 2317-2323, 2001.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUNCHI, Y. 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.

YADETA, K. A.; THOMMA, B. P. H. J. The xylem as battle- ground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 97, p. 1-14, 2013.

YAO, J.; ALLEN, C. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 188, n. 10, p. 3697-3708, 2006.

YOSHIHARA, A.; SHIMATANI, M.; SAKATA, M.; TAKEMURA, C.; SENUMA, W.; HIKICHI, Y.; KAI, K. Quorum sensing inhibition attenuates the virulence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* species complex. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 15, n. 11, p. 3050-305, 2020.

OLIVEIRA, Y.M. **Diversidade de espécies do complexo *Ralstonia solanacearum* no estado de Alagoas**. 56 f. 2020. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2020.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: Editora UFV, 2002. v. 2, 1309 p.

ZEISS, D. R. MHLONGO, M. I.; TUGIZIMANA F., STEENKAMP, P. A.; DUBERY I. A. Metabolomic Profiling of the Host Response of Tomato (*Solanum lycopersicum*) Following Infection by *Ralstonia solanacearum*. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 20, p. 1-22, 2019.

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

CAPÍTULO II

**Genomic sequencing of different sequevars of *Ralstonia solanacearum* belonging to the Moko ecotype**

Aceito para publicação na *Genetics and Molecular Biology*

**Genomic sequencing of different sequevars of *Ralstonia solanacearum* belonging to the Moko ecotype**

Ana Karolina Leite Pais<sup>1</sup>; Jéssica Rodrigues da Silva<sup>2</sup>; Leandro Victor Silva dos Santos<sup>1</sup>; Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque<sup>1</sup>; Antonio Roberto Gomes de Farias<sup>1</sup>; Wilson José Silva Júnior<sup>3</sup>; Valdir de Queiroz Balbino<sup>3</sup>; Adriano Márcio Freire Silva<sup>4</sup>; Marco Aurélio Siqueira da Gama<sup>1</sup>; Elineide Barbosa de Souza<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife, PE, Brazil.

<sup>2</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – IFPI, Piauí, PI, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil.

<sup>4</sup> Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Maceió, AL, Brazil.

<sup>5</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife, PE, Brazil.

Short running title: Genomics of *Ralstonia solanacearum*

*Keywords:* plant pathogenic bacteria, banana tree, NGS, bacterial wilt, *Musa* spp.

Corresponding Author: Ana Karolina Leite Pais. Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, AV. D. Manoel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, 52171-900 Recife PE Brazil. E-mail: karolinapais@gmail.com ORCID ID. 0000-0003-4058-6678.



## **Abstract**

Banana vascular wilt or Moko is a disease caused by *Ralstonia solanacearum*. This study aimed to sequence, assemble, annotate, and compare the genomes of *R. solanacearum* Moko ecotypes of different sequevar strains from Brazil. Average nucleotide identity analyses demonstrated a high correlation (> 96%) between the genome sequences of strains CCRMRs277 (sequevar IIA-24), CCRMRs287 (IIB-4), CCRMRs304 (IIA-24), and CCRMRsB7 (IIB-25), which were grouped into phylotypes IIA and IIB. The number of coding sequences present in chromosomes and megaplasms varied from 3,070 to 3,521 and 1,669 to 1,750, respectively. Pangenome analysis identified 3,378 clusters in the chromosomes, of which 2,604 were shared by all four analyzed genomes and 2,580 were single copies. In megaplasms, 1,834 clusters were identified, of which 1,005 were shared by all four genomes and 992 were identified as single copies. Strains CCRMRsB7 and CCRMRs287 differed from the others by having unique clusters in both their chromosomes and megaplasms, and CCRMRsB7 possessed the largest genome among all Moko ecotype strains sequenced to date. Therefore, the genomic information obtained in this study provides a theoretical basis for the identification, characterization, and phylogenetic analysis of *R. solanacearum* Moko ecotypes.

*Keywords:* plant pathogenic bacteria, banana tree, NGS, bacterial wilt, *Musa* spp.

*Ralstonia solanacearum* is a soil-inhabiting plant pathogenic bacterium that is known to infect several economically important crops (Wicker *et al.*, 2007), including banana (*Musa* spp.). Upon infecting banana trees, *R. solanacearum* causes vascular wilt, also known as Moko disease. *R. solanacearum* species complex were subdivided into a hierarchical classification system (including phylotypes) based on sequence analysis of the 16S–23S internal transcribed spacer (ITS) region, the endoglucanase (*egl*) gene, and the *mutS* (DNA repair) genes (Prior and Fegan, 2005). Each phylotype was associated with to a geographic origin: phylotype I (Asia), phylotype II (the Americas), phylotype III (Africa), and phylotype IV (Indonesia; Genin and Denny, 2012). Moreover, strains were grouped into sequevars that exhibited variations of  $\leq 1\%$  within *egl* gene sequences (Fegan and Prior, 2005).

Nevertheless, since 2014, *R. solanacearum* species complex have been reclassified into three different species according to their phylotypes: *R. pseudosolanacearum* (phylotypes I and III), *R. solanacearum* (phylotype II – IIA and IIB), and *R. syzygi* (phylotype IV and closely related strains) (Safni *et al.*, 2014). Among these, the strains that cause Moko disease belong to sequevars IIA-6, IIA-24, IIA-41, IIA-53, IIB-3, IIB-4, and IIB-25 (Cellier and Prior, 2010; Albuquerque *et al.*, 2014; Santiago *et al.*, 2017).

There are currently 203 publicly-available *R. solanacearum* genome sequences deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, of which only 17 belong to sequevar isolates IIA-6, IIA-24, IIA-53, IIB-3, and IIB-4 of the Moko ecotype. In Brazil, *R. solanacearum* strains belonging to the Moko ecotype are considered quarantine pests restricted to the northern (Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, and Roraima) and northeastern (Alagoas and Sergipe) states (MAPA 2018). Although Brazil is likely the biodiversity center of *R. solanacearum* (Santiago *et al.*, 2017), there are only three genome sequences of Brazilian strains (IBSBF1900 - IIA-24, IBSBF2570 - IIA-53, and SFC - IIA-53) deposited in the NCBI database. Therefore, our study sought to sequence, assemble, annotate, and compare the genomes of Brazilian *R. solanacearum* strains belonging to sequevars IIA-24,

IIB-4, and IIB-25 of the Moko ecotype.

In this study, CCRMRs277 (IIA-24), CCRMRs287 (IIB-4), CCRMRs304 (IIA-24), and CCRMRsB7 (syn. B7; IIB-25) were isolated from Brazilian Amazon banana trees exhibiting Moko disease symptoms. Bacterial strains were cultivated on 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride medium for 48 h at 28 °C and white-colored colonies with pink centers were selected for DNA extraction, which was performed using the PureLink® Genomic DNA Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions.

For genome sequencing, pair-end DNA library preparation was performed using the Illumina Nextera DNA Flex Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's recommendations, and sequencing was performed on an Illumina MiSeq-2500 sequencer (100 cycles). Read quality was first assessed with the FastQC software (Andrews, 2010), and sequence trimming was performed using Sickle v.1.33 (Joshi and Fass, 2011). All reads that met the quality control requirements were assembled *de novo* using Unicycler version 3 (Wick *et al.*, 2017) and were then evaluated with Quast v.5.0.2 (Gurevich *et al.*, 2013) to estimate genome size, contig number, N50, and GC content (%). Additionally, single-copy orthologs were identified and gene content conservation was analyzed with the BUSCO software (Seppey *et al.*, 2019).

The average nucleotide identity (ANI) between assembled genome sequences was obtained via global alignment with the MUMmer algorithm (Kurtz *et al.*, 2004) using the Pyani 0.2.7 Python3 module (Pritchard *et al.*, 2016). The ABACAS v.1.3.1 software (Assefa *et al.*, 2009) was implemented with the PROmer and NUCmer algorithms (Kurtz *et al.*, 2004) to perform chromosome and megaplasmid alignments using the Po82 and UW163 strains (*R. solanacearum* Moko ecotype, sequevar IIB-4) as a reference, as these are the only strains whose whole genomes are deposited in the NCBI database. The QUAST software v.5.0.2 (Gurevich *et al.*, 2013) was used to evaluate contigs and select alignment scaffolds with the lowest number of Ns and the largest number of predicted genes. Synteny and visualization of the four *R.*

*solanacearum* genome alignments and the two reference genomes were performed using the Mauve software (Darling *et al.*, 2004) and CGView Server (Grant and Stothard, 2008), respectively.

Genome annotation was performed using the RAST online platform (Brettin *et al.*, 2015), which also groups genes into subsystems based on the reconstruction of metabolic systems. The pangenome was built based on data obtained from RAST annotation using the Orthovenn online platform (Wang *et al.*, 2015) to identify clusters of specific genes/orthologs for each strain.

The sequences of the four *R. solanacearum* genomes were assembled into different sizes, of which the CCRMRs287 genome was the smallest (5,464,210 bp) and the CCRMRsB7 genome was the largest (5,847,640 bp) (Table 1). Compared to other Moko ecotype genome sequences available in the NCBI database, strain CCRMRsB7 was found to possess the largest genome sequence identified to date. The coverage between the four genome sequences varied from 129.8x (CCRMRs304) to 163x (CCRMRsB7). Additionally, different strains exhibited considerable variations in assembled contig number and N50 values; however, a gene conservation rate of > 97% was observed in all examined strains, indicating that the assemblies were reliable. Additional genome assembly details are summarized in Table 1.

ANIm analysis demonstrated a > 96% sequence similarity between the genome sequences, confirming that they belonged to the same species based on an ANIm cut-off value of 95–96% for species delineation (Richter and Rossello-Mora, 2009). Even though the genomes of all strains exhibited high sequence similarity, it was possible to differentiate the strains corresponding to phlotypes IIA (99.9%) and IIB (98.7%). Moreover, even though strain CCRMRsB7 (sequevar IIB-25) belongs to phlotype IIB, it formed a subdivision within this group (Figure 1). Nonetheless, this strain displayed ANIm values of 98% and 96.4% when compared with the other members of phlotypes IIB and IIA, respectively.

*R. solanacearum* possess chromosomes and megaplasmids, and our study determined

the lowest number of Ns and the largest number of predicted genes in the replicons. The chromosome scaffolds of CCRMRs277, CCRMRs304, and CCRMRsB7 were formed from alignments with Po82, and the chromosome scaffold of CCRMRs287 and all megaplasmid scaffolds had UW163 as a reference (Table 1).

The synteny of the genomic sequences is illustrated in Figure 2A and 2B, for Po82 and UW163, respectively. In both cases, the linear arrangement of the genomes exhibited a high level of collinearity for the two replicons. However, we also observed translocations and inversions of the locally collinear blocks (LCBs). When Po82 was used as a reference (Figure 2A), inversions were detected in the blue- and violet-colored LCBs and the violet-colored LCB of the CCRMRs287 and CCRMRsB7 strains, respectively. Similarly, when UW163 was used as a reference (Figure 2B), we noted that compared with the other three strains, there were substantial rearrangements in the pink- and green-colored LCBs of the CCRMRs287 strain. We assume that these features are attributable to the evolutionary relatedness of the CCRMRs287 and UW163 (sequevar IIB-4) strains, as well as the proximity of their geographical origins (the cities of Benjamin Constant-BR, and Nauta-PE, respectively, on the border between Brazil and Peru). Although this process has yet to be clarified, it is known to be a common event and can lead to adaptive phenotypic effects, as in the case of transposable elements that carry genes related to antibiotic resistance (Ceccatto, 2015). The circular visualization of the alignment of the genomic sequences produced by CGView showed that most of the genomic regions were highly conserved between the genomes (Figure 2C and 2D).

Table 1 details the number of coding sequences (CDS), RNAs, and subsystems of the genome assemblies of strains CCRMRs277, CCRMRs287, CCRMRs304, and CCRMRsB7, as well as the reference genomes and algorithms used for assembly. The chromosomes from the four genomes exhibited higher CDS, RNAs, and subsystem numbers, and therefore contained more information than megaplasmids. This observation may be related to the size and

conservation of the chromosome, which represents the larger region (Genin and Denny, 2012) and is more conserved than the megaplasmid (Guidot *et al.*, 2007).

The four most represented subsystems found in the four *R. solanacearum* chromosomes were (I) amino acids and derivatives; (II) protein metabolism; (III) carbohydrates; and (IV) cofactors, vitamins, prosthetic groups, and pigments, which accounted for 49–51% of the total subsystems (Figure 3A). For the megaplasmids, only 15% of the annotated genes were grouped into subsystems of which the most represented were (I) membrane transport; (II) virulence, disease, and defense; (III) carbohydrates; and (IV) nitrogen metabolism, which ranged from 53% to 64% of the total subsystems among the examined strains (Figure 3B).

In the Venn diagram based on the chromosome sequences, 3,378 gene clusters were identified, of which 2,604 were shared by all four genomes analyzed (Figure 3C, top panel), 798 were orthologous, and 2,580 were characterized as single copies. The number of clusters identified in the four sequenced genomes ranged from 2,993 (CCRMRS304) to 3,064 (CCRMRSB7; Figure 3C, bottom panel). Only five clusters were strain-specific, four were specific to strain CCRMRSB7 (sequevar IIB-25), and one to strain CCRMRS287 (sequevar IIB-4); however, none of the clusters were associated with known functions. In the megaplasmid, 1,834 clusters were identified, of which 1,005 were shared by all four genomes analyzed (Figure 3D, top panel), 842 were orthologous, and 992 were identified as single copies. The number of clusters identified in the four genomes ranged between 1,308 (CCRMRSB7) and 1,627 (CCRMRS277; Figure 3D, bottom panel). Nine unique clusters were found; however, only five were associated with known functions, such as peptide transport, antibiotic biosynthesis, cholesterol metabolism (CCRMRSB7), transmembrane transport, and metabolic processes (CCRMRS287).

Among strains of the *R. solanacearum* Moko ecotype sequenced in this study, the genome of CCRMRSB7 is the largest sequenced to date, whereas that of CCRMRS287 is the smallest. However, both genomes are characterized by significant rearrangement of the LCB,

which requires further in-depth investigation. Moreover, the replicons of both these strains contain unique clusters. Our results indicate that the genomes of strains CCRMRsB7 (sequevar IIB-25) and CCRMRs287 (sequevar IIB-4) have distinct characteristics compared with other sequenced genomes examined thus far, and accordingly, both strains warrant further analysis in this regard. Moreover, the genomic data elucidated by our study provides a theoretical basis that will facilitate the future identification, characterization, and phylogenetic analysis of the *R. solanacearum* Moko ecotype.

### **Genome sequence accession number.**

The accession numbers are as follows: GCA\_014210395.1 for CCRMRs277, GCA\_014210375.1 for CCRMRs287, GCA\_014210335.1 for CCRMRs304 and GCA\_014210345.1 for CCRMRsB7.

### **Acknowledgment**

To the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) for the awarding a scholarship to Ana Karolina Leite Pais (Processo CNPq n° 143017/2016-0) and the Laboratory of Bioinformatics and Evolutionary Biology (LABBE) of Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) for the availability of the servers used in bioinformatics analysis.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

### **Authors Contributions**

EBS, GMRA and AMFS conceived and designed the study, AKLP, LVSS, ARGF and WJSJ conducted the in silico analysis, AKLP, JRS, WJSJ, VQB and MASG analyzed the data, AKLP and GMRA wrote the manuscript with contributions from WJSJ, AMFS, MASG and

EBS, all authors read and approved the final manuscript version.

## References

- Albuquerque GMR, Santos LA, Felix KCS, Rollemberg CL, Silva AMF, Souza EB, Cellier G, Prior P and Mariano RLR (2014) Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II. *Phytopathology* 104:1175-1182.
- Andrews S (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinforma HannonLab. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Assefa S, Keane TM, Otto TD, Newbold C and Berriman M (2009) ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics* 25(15):1968-9.
- Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD *et al.*, (2015) RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep* 5:8365.
- Cellier G and Prior P (2010) Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology* 100:1250–1261.
- Ceccatto V M (2015) Variação gênica. In: Ceccatto V M (ed) *Biologia molecular*. 2nd edition. EdUECE, Fortaleza, pp 63-86.
- Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT (2004) Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 14:394-1403.
- Fegan M and Prior P (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex?”. In: Allen C, Prior P and Hayward AC (eds) *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*. MN: APS Press, St Paul, pp 449–461.
- Genin S and Denny TP (2012) Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu Rev Phytopathol* 50:67–89.



- Grant JR, Stothard P (2008) The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res* 36:W181-W184.
- Guidot A, Prior P, Schoenfeld J, Carrere S, Genin S and Boucher C (2007) Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *J. Bacteriol* 189:377–87.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N and Tesler G (2013) QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075.
- Joshi NA and Fass JN (2011) Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software].
- Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot ML, Shumway M, Antonescu C and Salzberg SL (2004) Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* 5:R12.
- Prior P and Fegan M (2005) Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Hort* 695:127-136.
- Pritchard L, Glover RH, Humphris S, Elphinstone JG and Toth IK (2016) Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal Methods* 8:12–24.
- Richter M and Rossello-Mora R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19126-19131.
- Safni I, Cleenwerck I, Vos P De, Fegan M, Sly L and Kappler U (2014) Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:3087–3103.

- Santiago TR, Lopes CA, Caetano-Anollés G and Mizubuti ESG (2017) Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. *Plant Pathol* 66:383–392.
- Seppy M, Manni M and Zdobnov EM (2019) BUSCO: Assessing Genome Assembly and A annotation completeness. In: Kollmar M. (eds) Gene prediction. *Methods in Molecular Biology*. Humana, New York, pp 227-245.
- Wang Y, Coleman-derr D, Chen G and Gu YQ (2015) OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Res* 43:78–84.
- Wick RR, Judd LM, Gorrie CL and Holt KE (2017) Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13:1-22.
- Wicker E, Grassrt L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M and Prior P (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *J Appl Environ Microbiol* 73:6790-6801.

### **Internet resources**

- On-line (National Center for Biotechnology Information) NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Maio 15, 2019).
- On-line Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), [http://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43461167/do1-2018-10-02-instrucao-normativa-n-38-de-1-de-outubro-de-2018-43461024](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43461167/do1-2018-10-02-instrucao-normativa-n-38-de-1-de-outubro-de-2018-43461024) (Junho 20, 2019).

**Table 1.** Characteristics of the genome sequences of four different *Ralstonia solanacearum* strains of the Moko ecotype from Brazil

Features	CCRMRs277 <sup>a</sup>		CCRMRs287 <sup>b</sup>		CCRMRs304 <sup>c</sup>		CCRMRsB7 <sup>d</sup>	
Coverage	133x		148x		129.8x		163x	
Size before alignment (bp)	5.659.851		5.464.210		5.654.054		5.847.640	
GC content (%)	66.54		66.59		66.55		66.46	
Number of contigs	360		92		368		88	
N50	43.891		150.675		45.590		216.010	
BUSCO (%)	97.97		98.65		97.97		97.97	
Size after alignment (bp)	5.636.326		5.444.697		5.645.239		5.854.658	
	Chrom <sup>e</sup>	Plasmid <sup>f</sup>	Chrom	Plasmid	Chrom	Plasmid	Chrom	Plasmid
References strains	PO82 <sup>g</sup>	UW163 <sup>h</sup>	UW163 <sup>g</sup>	UW163 <sup>h</sup>	PO82 <sup>g</sup>	UW163 <sup>h</sup>	PO82 <sup>h</sup>	UW163 <sup>h</sup>
Size after alignment (bp)	3.549.795	2.086.531	3.512.030	1.932.667	3.549.663	2.095.576	3.716.474	2.138.184
Coding sequences	3.099	1.718	3.315	1.669	3.070	1.720	3.521	1.750
Subsystems number	299	81	318	83	291	88	321	93
RNAs	46	1	52	1	45	1	51	4

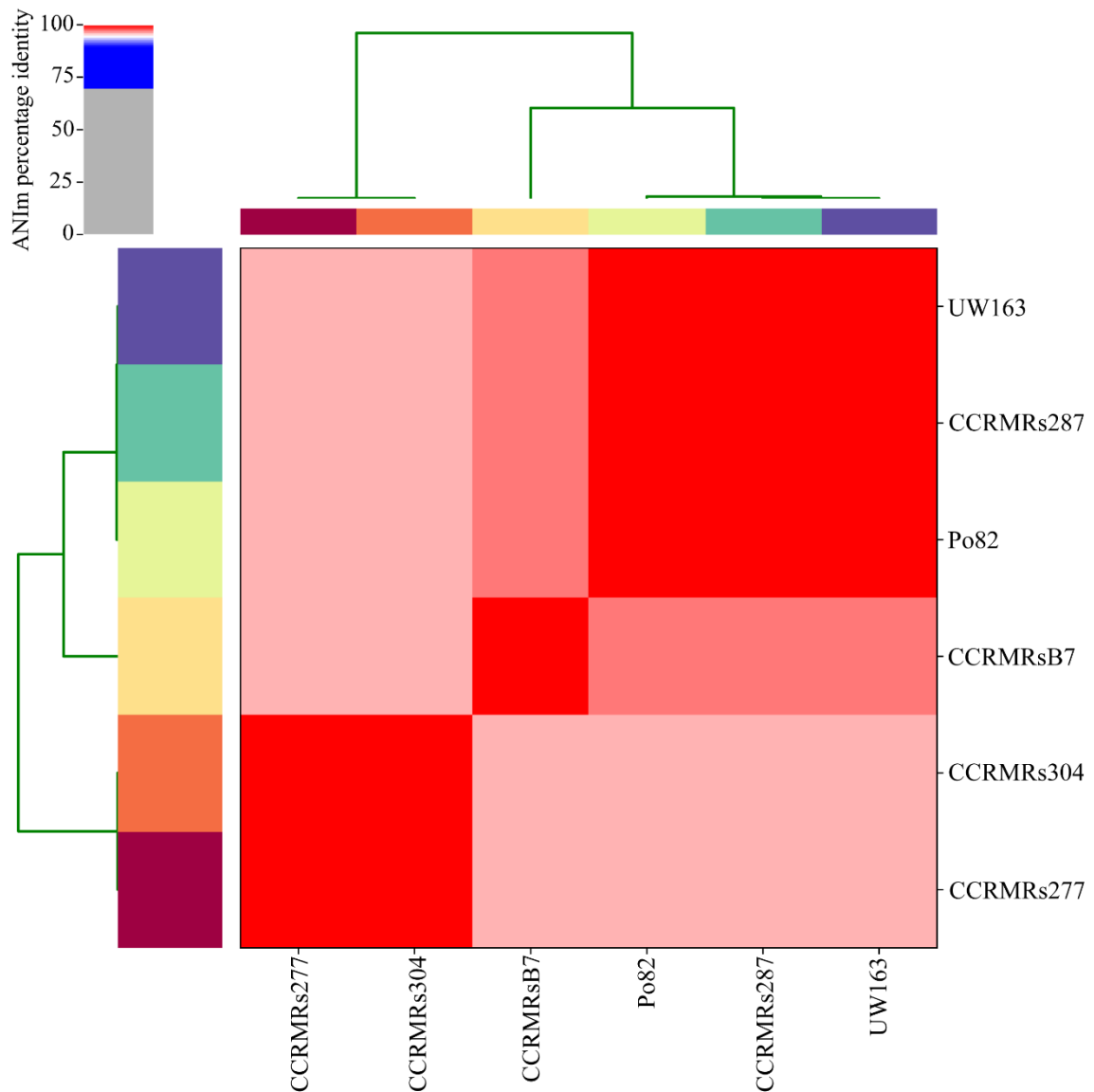
<sup>a</sup>- CCRMrs277 = sequevar IIA-24; <sup>b</sup>- CCRMrs287 = sequevar IIB-4; <sup>c</sup>- CCRMrs304 = sequevar IIA-24; <sup>d</sup>- CCRMrsB7 = sequevar IIB-25.

<sup>e</sup>- Chromosome;

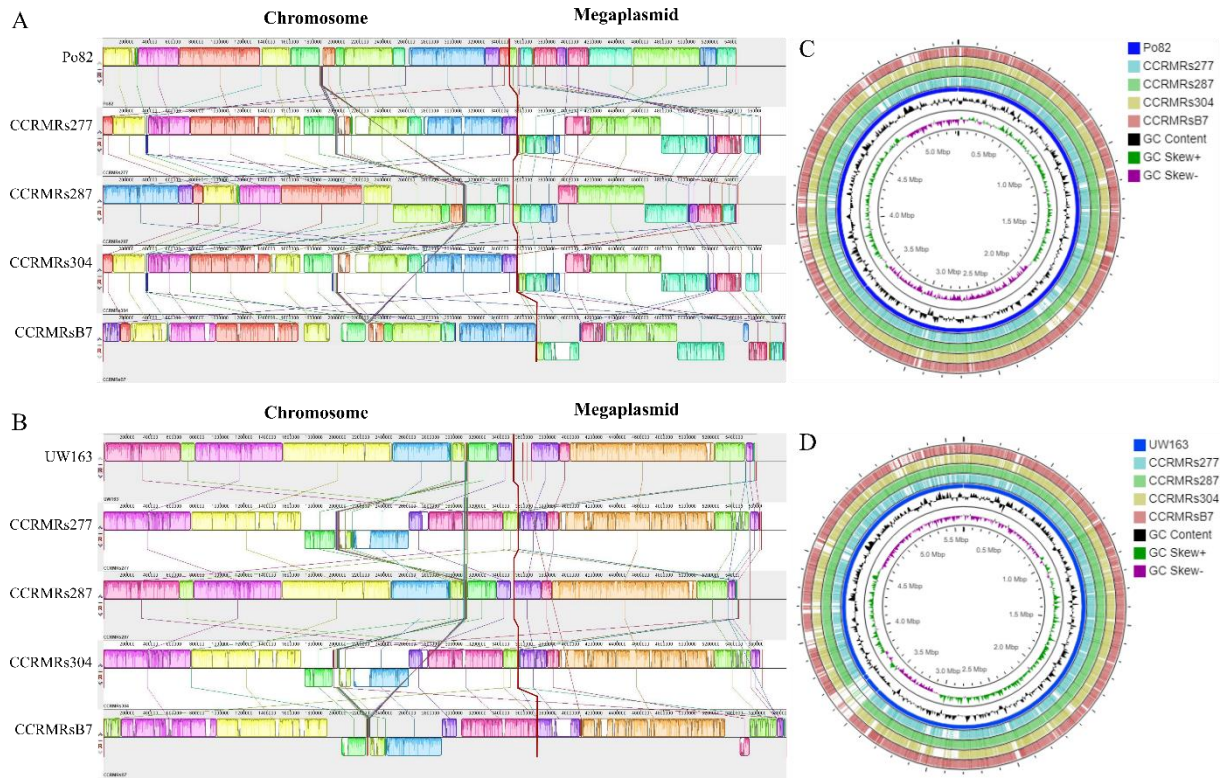
<sup>f</sup>- Megaplasmid;

<sup>g</sup>- NUCmer alignment algorithm;

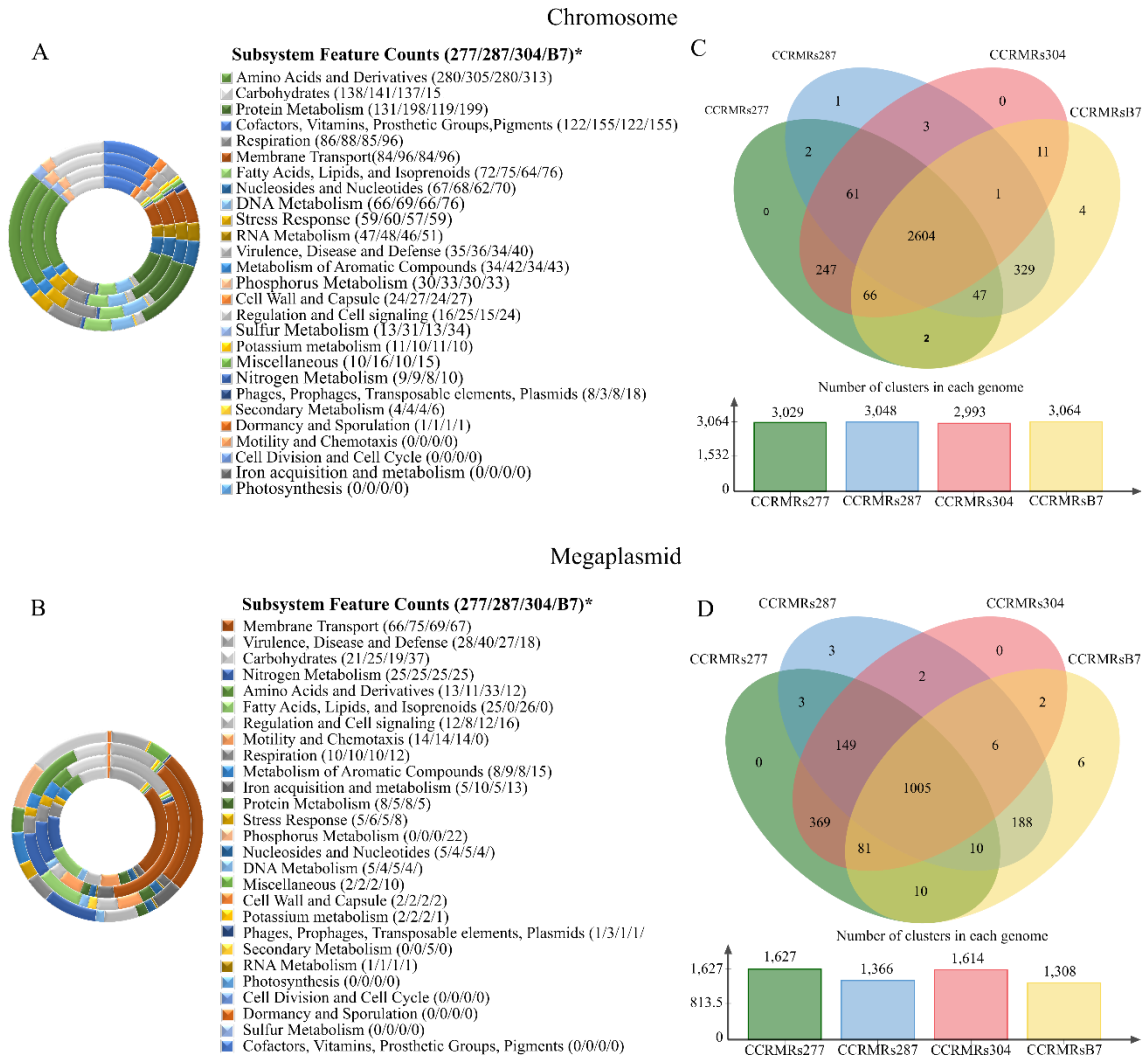
<sup>h</sup>-PROmer alignment algorithm.



**Figure 1.** Average Nucleotide Identity (ANIm) of four *Ralstonia solanacearum* strains belonging to the Moko ecotype (CCRMRs277 and CCRMRs304, sequevar IIA-24; CCRMRs287, sequevar IIB-4; and CCRMRsB7, sequevar IIB-25) from Brazil, as well as the employed reference strains (UW163 and Po82, sequevar IIB-4).



**Figure 2.** Synteny of four *Ralstonia solanacearum* strains belonging to the Moko ecotype (CCMRs277 and CCRMRs304, sequevar IIA-24; CCRMRs287, sequevar IIB-4; and CCRMRsB7, sequevar IIB-25) from Brazil and reference strains Po82 (A) and UW163 (B). Visualization of the chromosome and megaplasmid alignments of the *R. solanacearum* strains and reference strains Po82 (C) and UW163 (D).



**Figure 3.** Graphic representation of cluster subsystems of chromosomes (A) and megaplasmids (B) and Venn diagram of the chromosome (C) and megaplasmid (D) clusters of four strains of *Ralstonia solanacearum* belonging to the Moko ecotype (CCRMRs277 = 277, sequevar IIA-24; CCRMRs287 = 287, sequevar IIB-4; CCRMRs304 = 304, sequevar IIA-24; and CCRMRsB7 = B7, sequevar IIB-25) from Brazil, as well as the employed reference strains (UW163 and Po82, sequevar IIB-4B).

## **CAPÍTULO III**

---

### **Genômica comparativa e filogenômica de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas**

## **Genômica comparativa e análise filogenômica de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas**

Ana Karolina Leite Pais<sup>1</sup>; Leandro Victor Silva dos Santos<sup>1</sup>; Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque<sup>1</sup>; Antônio Roberto Gomes de Farias<sup>1</sup>; Wilson José Silva Júnior<sup>2</sup>; Valdir de Queiroz Balbino<sup>2</sup>; Adriano Márcio Freire Silva<sup>3</sup>; Marco Aurélio Siqueira da Gama<sup>1</sup>; Elineide Barbosa de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE;*

<sup>2</sup>*Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE;*

<sup>3</sup>*Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, AL;*

<sup>4</sup>*Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.*

### **Resumo**

A murcha bacteriana em bananeira também conhecida como Moko da bananeira é causada por isolados do filotipo IIA e IIB de *Ralstonia solanacearum*, denominados de ecótipo Moko. Esse grupo possui divergência no quadro sintomatológico, sendo possível diferenciar o Moko com sintomas típicos e duas variantes (Bugtok com ocorrência nas Filipinas e síndrome Sergipe com ocorrência no estado de Sergipe e Alagoas – Brasil). Devido a ausência de estudos genômicos com o ecótipo Moko, o trabalho teve como objetivo utilizar abordagens de genômica comparativa e filogenômica para investigar as peculiaridades relacionadas aos fatores de patogenicidade e virulência de isolados dos três quadros sintomatológicos. As análises de identidade média de nucleotídeos (ANI) e hibridização DNA-DNA (DDH*is*) demonstraram alta correlação (> 96% e > 78%, respectivamente) entre os genomas do ecótipo Moko, não sendo suficientes para diferenciação dos quadros sintomatológicos, os quais também não foram diferenciados pelos fatores de patogenicidade e virulência investigados. A análise de Pan-genoma identificou 21,3% de regiões herdáveis entre os representantes do ecótipo Moko e a variante sintomatológica síndrome Sergipe destaca-se por apresentar o maior número de *clusters* de homólogos exclusivos. Os representantes de Bugtok e da síndrome Sergipe não compartilharam exclusivamente genes ortólogos, mas codificaram o mesmo arsenal de enzimas degradadoras da parede celular, componentes essenciais na colonização. Estudos com outras abordagens são necessários para melhor caracterização dos isolados do ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas.

**Palavras-chaves:** Bugtok; Síndrome Sergipe; Filotipo II; Fatores de patogenicidade e virulência.



## Introdução

*Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko foi descrita pela primeira vez por Schomburgk durante suas viagens a Guiana Britânica entre 1840-1844, porém apenas ganhou importância econômica após devastar áreas de bananeiras da variedade "Moko" (*Musa* ABB, Bluggoe subgroup) na ilha de Trinidad, no início do século XX (SEQUEIRA, 1998). A terminologia "ecótipo" relaciona-se a um grupo altamente adaptado ao hospedeiro e o ecótipo Moko possui uma íntima relação com *Musa* sp., sendo de natureza polifilética (FEGAN; PRIOR, 2006; AILLOUD *et al.*, 2015).

Esse grupo apresenta uma variação no quadro sintomatológico que é expresso de três maneiras: sintomas típicos de Moko, Bugtok e síndrome Sergipe (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; BLOMME *et al.*, 2017). Nos sintomas mais difundidos, ou típicos do Moko, a infecção se inicia nos rizomas e segue em direção ao pseudocaule com escurecimento vascular na região central; as folhas apresentam-se amareladas e murchas; os frutos exibem deformação (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014); e o aspecto geral da planta é de murcha (SEQUEIRA, 1998). Nas Filipinas a sequevar IIB-3 de *R. solanacearum* quando associada as cultivares "Saba" (*Musa* BBB) e "Cardaba" (*Musa* ABB) causa uma doença denominada de Bugtok ou Tapurok (ROPEROS, 1965; SOGUILON *et al.*, 1995) com a infecção iniciada na inflorescência, resultado da inoculação por insetos vetores (BLOMME *et al.*, 2017). Os sintomas de Bugtok são restritos ao pedúnculo/raque, podendo haver uma descoloração marrom-avermelhada do tecido vascular do pseudocaule, mas raramente esse sintoma se estende ao rizoma (BLOMME *et al.*, 2017). Outra variante do Moko ocorre no estado de Sergipe, Nordeste do Brasil, associada à sequevar IIA-53, denominada de síndrome Sergipe. O quadro sintomatológico se assemelha ao descrito para Bugtok, porém os frutos apresentam amadurecimento desuniforme e prematuro (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014) e necrose externa.

O quadro sintomatológico do ecótipo Moko e suas variantes foram relatados, porém nenhum estudo de genômica foi direcionado a identificar fatores que os relacionem às diferenças sintomatológicas causadas por diferentes sequevares de *R. solanacearum* ecótipo Moko. Sabe-se que para infecção e desenvolvimento da doença, *R. solanacearum* utiliza um massivo arsenal de fatores de patogenicidade e virulência, que incluem a síntese de exopolissacarídeos (EPS) (GENIN; DENNY, 2012); enzimas de degradação de componentes da parede celular, como pectinases e celulasas (GENIN; BOUCHER, 2004); e efetores que podem agir suprimindo a defesa das plantas (JONES; DANGL, 2006). Todos esses fatores utilizam os sistemas de secreção, sendo os do tipo II e III os mais relevantes para *R.*

*solanacearum* (POUEYMIRO; GENIN, 2009), juntamente com componentes relacionados à motilidade (CHOI *et al.*, 2020).

Com base nas diferentes sintomatologias do ecótipo Moko por diferentes sequevares de *R. solanacearum* e considerando a hipótese de que a similaridade genômica entre os isolados do ecótipo Moko e suas variantes, Bugtok e síndrome Sergipe, possivelmente apresente relação com os quadros sintomatológicos, o objetivo deste trabalho foi utilizar abordagens genômica comparativa e filogenômica para investigar as peculiaridades relacionadas aos fatores de patogenicidade e virulência de isolados do ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas.

## **Material e métodos**

### **Sequências genômicas**

Os genomas de *R. solanacearum* depositados no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) foram filtrados, de acordo com os dados disponíveis na literatura, para o *dataset* final conter apenas representantes dos três quadros sintomatológicos do ecótipo Moko, sendo assim distribuídos: (M) Moko – sintomas típicos (19 genomas dos filotipos IIA e IIB, de diferentes sequevares); (B) Bugtok – sintomas de Bugtok, Filipinas (2 genomas do filotipo IIB-3); e (SE) síndrome Sergipe, Brasil (2 genomas do filotipo IIA-53 ). A origem e características dos genomas de *R. solanacearum* estão descritas na Tabela 1.

### **Genômica comparativa de *R. solanacearum* ecótipo Moko**

As comparações entre os 23 genomas foram iniciadas pela análise de Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) utilizando o alinhamento global do algoritmo MUMmer (ANIm; KURTZ *et al.*, 2004) e a análise de Tetranucleotídeos (TETRA), ambos calculados pelo módulo pyani 0.2.7 Python3 (PRITCHARD *et al.*, 2016). Os valores de hibridização DNA-DNA *in silico* (DDHis) foram calculados na plataforma Genome-to-Genome Distance Calculator – GGDC (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2013), sendo utilizada a fórmula 2 (DDH estimates based on identities/HSP - High Scoring Pair length), recomendada para genomas incompletos. As matrizes de similaridade obtidas pelas análises de ANIm e DDHis foram transformadas em *heatmap* pela plataforma Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

### **Análise do Pan-genoma e filogenômica de *R. solanacearum* ecótipo Moko**

A análise do Pan-genoma dos isolados foi realizada no Roary v. 3.13.0 1. 1 (PAGE *et al.*, 2015), a partir de sequências dos genomas obtidos do RefSeq/NCBI. Os ortólogos resultantes foram classificados como genes *core* (Genes comum a todos os genomas), *softcore* (Genes contidos em 95% dos genomas), *shell* (Genes moderadamente conservados, presentes em vários genomas) e *cloud* (Genes raros, presentes em apenas alguns genomas) de acordo com a configuração padrão do software. O conjunto dos genes *core* foi automaticamente alinhado no software MAFFT v. 7.310 2 (KATOHI; STANDLEY, 2013) com a criação de um alinhamento multi-FASTA das sequências de nucleotídeos de todos os genes do conjunto, utilizando como parâmetro *-e--mafft* no Roary. A filogenômica dos genes *core* foi construída a partir do alinhamento multi-FASTA pelo método de Máxima Verossimilhança no software IQ-TREE versão 2.0.4 (NGUYEN *et al.*, 2015), utilizando ModelFinder (KALYAANAMOORTHY *et al.*, 2017) para selecionar o melhor modelo. O suporte dos nós foi determinado por ultrafast bootstrap (MINH *et al.*, 2013) com 100.000 repetições. A árvore de Máxima verossimilhança foi visualizada no software FigTree v.1.4.4 (RAMBAUT, 2009). A filogenia da matriz de presença/ausência de gene foi construída pelo software IQ-TREE com a mesma configuração de bootstrap e seguindo o mesmo processo descrito anteriormente para a visualização.

### **Fatores de patogenicidade e virulência de *R. solanacearum* ecótipo Moko**

As anotações das proteínas estruturais dos sistemas de secreção Tipo II (SST2) e Tipo III (SST3) e os genes relacionados à motilidade de *R. solanacearum* foram obtidas pela plataforma KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) e em seguida comparadas via Blast (Basic Local Alignment Search Tool), com as anotações dos genomas do ecótipo Moko disponíveis no NCBI, utilizando os parâmetros mínimos de 80% de identidade e 75% de cobertura. Para a visualização dos resultados foram construídos *heatmaps* a partir das matrizes binárias com a plataforma online Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

Enzimas ativas de carboidratos (carbohydrate-active enzymes – CAZy) e sequências codificantes de enzimas associadas foram anotadas no servidor dbCAN (YIN *et al.*, 2012). Os metabólitos secundários e efetores do SST3 foram anotados nos programas antiSMASH (BLIN *et al.*, 2019) e RalstoT3E (PEETERS *et al.*, 2013), respectivamente.

Os dados obtidos pelo RalstoT3E e dbCAN foram transformados em matrizes binárias e, posteriormente, plotados *heatmaps* pela plataforma online Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

## Resultados

### Genômica comparativa de *R. solanacearum* ecótipo Moko

A análise de ANIm dos 23 genomas de *R. solanacearum* ecótipo Moko mostrou valor médio de similaridade de 97,6% entre todos os genomas (Tabela 2). Dentro dos grupos formados pelos genomas dos diferentes quadros sintomatológicos, observou-se uma grande similaridade entre os genomas de Moko com sintomas típicos (M), Bugtok (B) e síndrome Sergipe (SE) (Figura 1 Suplementar). Ao comparar esses quadros sintomatologias, observou-se que o “M” quando confrontado com “B” e “SE” obteve 97,3% e 97,4% de similaridade, respectivamente, enquanto “B” confrontado com “SE” apresentou 96,3% de similaridade. Os valores de TETRA apresentaram alta similaridade (99,9% - 100%) para todos os genomas analisados, não sendo possível a diferenciação dos quadros sintomatológicos a partir dessa análise (Tabela 2).

Com base nos resultados de DDH<sub>is</sub>, os genomas do ecótipo Moko obtiveram valor médio de 78,8% com variação entre 66,1% e 100% (Tabela 2). Os valores médios encontrados para o filotipo IIA e IIB foram de 94% e 87,8%, respectivamente, e ao confrontá-los obteve-se 67,1% de similaridade. O grupo “M” apresentou 73,2% de similaridade e os grupos “B” e “SE”, valores acima de 99%. Ao confrontar esses grupos, observa-se que o “M” quando confrontado com “B” e “SE” obteve 77,2% e 67,3% de similaridade, respectivamente, e “B” confrontado com “SE” apresentou 67,7% de similaridade (Tabela 2).

O *heatmap* construído com as médias calculadas pelo ANIm e DDH<sub>is</sub> do ecótipo Moko, agruparam os isolados em dois grandes grupos (filotipo IIA e IIB) que foram subdivididos em dois subgrupos, cada, denominados neste estudo como: filotipo IIA(1), IIA(2), IIB(1) e IIB(2). Os genomas de “M” estão presentes exclusivamente nos subgrupos IIA(1) e IIB(2), porém não agrupam todos os genomas deste grupo, tendo alguns representantes nos demais subgrupos. Os genomas de “B” apresentam uma grande similaridade genômica e constituem um grupo com alguns representantes de “M”, e o mesmo aconteceu com os representantes de “SE”.

### Análise do Pan-genoma e MLSA de *R. solanacearum* ecótipo Moko

Análises dos *cores* revelaram a presença de 9.164 *clusters* de informação, dos quais 1.951 estiveram presentes em todos os genomas (*core genes*) (Figura 1A). Entre os representantes do grupo com sintomas típicos de Moko foram anotados 3.308 *clusters*, porém

nenhum presente em todos os representantes (Figura 1B). Os genomas dos isolados que causam sintomas de Bugtok revelaram a presença de 135 *clusters*, dos quais duas sequências de inserção e duas sequências desconhecidas foram verificadas em todas as sequências do grupo. Nos genomas associados à síndrome Sergipe foram anotados 113 *clusters*, dos quais 60 foram verificados em todos os isolados e relacionaram-se a processos biológicos, funções moleculares, relacionamento com moléculas de ligação, sistema de secreção SST3, sequências de inserção (IS) e CRISPR.

Os genomas dos isolados de sintomas típicos de Moko e Bugtok compartilharam 15 *clusters* exclusivos enquanto os de Moko e síndrome Sergipe compartilham apenas um *cluster* (Figura 1B). As informações compartilhadas entre os genomas de sintomas típicos de Moko e Bugtok foram relacionadas a processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares. Com relação à síndrome Sergipe, a informação compartilhada pode estar envolta na função molecular e/ou processo biológico.

As árvores filogenômicas apresentaram forte suporte de bootstrap em todos os ramos, indicando uma filogenia robusta para *R. solanacearum*. Conforme indicado pelo ANI e DDH<sub>is</sub>, a árvore filogenômica baseada em *core genes* diferenciou os dois filotipos (IIA e IIB) e os quatro subgrupos (IIA(1), IIA(2), IIB(1) e IIB(2)) (Figura 2). A inferência baseada na presença e ausência de *clusters* gênicos não conseguiu organizar os genomas do ecótipo Moko da mesma forma que as análises anteriores, uma vez que os genomas IBSBF2570 e SFC (filotipo IIA) não agruparam com outros representantes do subgrupo IIA(2) (Figura 3).

### **Sistemas de secreção Tipo II (SST2), Tipo III (SST3) e motilidade**

Os sistemas de secreção SST2 e SST3 estão presentes em todos os genomas do ecótipo Moko (Figuras 4, 5). Várias proteínas estão envolvidas na composição dos sistemas, para SST2 há uma variação de 61- 81 genes por genoma e os valores médios por grupo foram superiores a 70 genes: sintomas típicos (71,3 genes), Bugtok (72 genes) e síndrome Sergipe (76 genes).

Alguns genomas não possuíam regiões codificantes para todas as proteínas relacionadas a estrutura do sistema, como o genoma do isolado UA-1612 que não possuiu os genes *gpsG/gspG*, o genoma UA-1611 que não codificou para *gspC* e o genoma B50 para *gspD*. Além disso, alguns genes que codificam para as proteínas translocases, Sec ou Tat, que são indispensáveis para o SST2 foram ausentes no genoma MolK2 (filotipo IIB(1), sequevar IIB-3; *SecA*) e genoma de Granada91 (filotipo IIA(2), sequevar IIA-6; *TatA*).

Nos genomas do ecótipo Moko, 27 genes foram associados ao SST3, desses 48,1%

foram encontrados em todos os genomas analisados (Figura 5). Os genomas dos isolados B50 e CCRMRsB7 codificaram para 18 proteínas, sendo esses os representantes do ecótipo Moko com a menor quantidade de genes associados ao SST3. Com relação as proteínas anotadas para motilidade, 124 regiões codificadoras foram encontradas no ecótipo Moko e com uma ampla variação (77- 124 genes por genoma) entre seus representantes. Os valores médios por grupo foram superiores a 110 genes: sintomas típicos de Moko (113,5 genes), Bugtok (112 genes) e síndrome Sergipe (122 genes).

### **Enzimas degradadoras de parede celular (CWDE)**

A análise do genoma revelou a presença de 673 genes que codificaram para a síntese de enzimas degradadoras da parede celular (CWDE) em *R. solanacearum* ecótipo Moko, que foram distribuídos em 59 famílias/subfamílias. Esses genes estão distribuídos em seis classes (auxiliary activity – AA, carbohydrate-binding module – CBM, carbohydrate esterase – CE, glycoside hydrolases - GH, glycosyl transferase - GT e polysaccharide lyase – PL) (Figura 6) com funções relacionadas a degradação celulósica, hemicelulósica, pectinolítica e do amido. Os representantes do ecótipo Moko-sintomas típicos possuíram de 42 a 50 CWDE e os genomas de síndrome Sergipe e Bugtok, compartilharam as mesmas sequências para codificação de 49 famílias/subfamílias de enzimas.

### **Proteínas efetoras do sistema de secreção Tipo III (SST3)**

Foram anotados 92 efetores do SST3, destes 16 representaram os core efetores (RipA2, RipA5, RipAB, RipAC, RipAO, RipAP, RipAY, RipD, RipF2, RipI, RipM, RipO1, RipR, RipS5, RipU e RipV2) encontrados em todos os genomas do ecótipo Moko (Tabela 3). Os genomas de Moko com sintomas típicos e Bugtok apresentaram distribuição aleatória no dendrograma, porém os isolados da síndrome Sergipe agruparam-se, caracterizando um grande compartilhamento de informação do SST3 (64 efetores compartilhados) (Figura 7).

### **Metabólitos secundários**

Todos os isolados do ecótipo Moko de sintoma típicos apresentaram regiões codificantes para metabólitos secundários, sendo capazes de expressar 13 informações distintas (Tabela 4). Os isolados de Bugtok (CIP417 e Molk2) e síndrome Sergipe (IBSBF2570 e SFC) codificaram, respectivamente, oito metabólitos secundários (aryl polyene, bacteriocin, furan, NRPS, NRPS-like, siderophore, T1PKS e terpene) e dez (aryl

polyene, bacteriocin, hserlactone, NRPS, NRPS-like, siderophore, T1PKS, terpene, transAT-PKS e transAT-PKS-like) (Figura 8). Porém, os isolados de Moko com sintomas típicos não apresentaram um padrão definido, variando em número e em informação.

## Discussão

No atual estudo, as análises de ANIm e DDHs não foram suficientes para diferenciar os quadros sintomatológicos de Moko (Figura 1 Suplementar), mas constatou que os genomas de Bugtok e Síndrome Sergipe apresentaram uma alta similaridade gênômica entre seus representantes e, quando comparados, uma baixa similaridade (Tabela 2). Sendo assim, refuta-se a hipótese de que a similaridade dos quadros sintomatológicos poderiam apresentar uma maior proximidade genômica entre os organismos.

Os genomas de Moko sintomas típicos e suas variantes, Bugtok e síndrome Sergipe compartilham 1.951 regiões homólogas, conferindo ao ecótipo 21,3% de regiões herdáveis. Com base nesse resultado e nas hipóteses listadas no trabalho de Ailloud *et al.* (2015), concluímos que possivelmente o ecótipo Moko herdou patogenicidade a bananeira do ancestral recente comum devido ao compartilhamento de regiões homólogas. Em contrapartida, os mesmo autores avaliaram alguns grupos de patógenos altamente adaptados a hospedeiros e entre eles tem-se a representação de Moko da bananeira que foi caracterizado pela ausência de regiões homólogas exclusivas, sendo esse resultado crucial para indicar que esse ecótipo possivelmente surgiu a partir de uma evolução convergente, de várias linhagens, que findou na capacidade de infectar banana (AILLOUD *et al.*, 2015).

Para os representantes de Moko com sintomas típicos, nenhum *cluster* gênico homólogo foi anotado exclusivamente. Em contrapartida, os representantes de síndrome Sergipe detiveram o maior número de *clusters* exclusivos (113 *clusters*), dos quais 51,1% foram observados em ambos os isolados, caracterizando o grupo com maior diversificação. Esse fato poder estar relacionado à alta taxa de mutação necessária para garantir sua prevalência no ambiente, tendo em vista que é o grupo sintomatológico relatado mais recente (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2020). Das informações contidas nos *clusters* exclusivos, 13,3% estão associadas ao SST3 e 10% de IS que podem favorecer vários processos genéticos. Os ISs são elementos genéticos móveis amplamente distribuídos entre as bactérias, com impacto multifacetado nos genomas bacterianos, incluindo ativação ou repressão de genes e rearranjos de DNA resultando em deleções, inversões e amplificação de genes (CHANDLER; MAHILLON, 2002). Eles podem ser classificados em 20 famílias com base na conservação do sítio catalítico, semelhanças na organização genética, sequências de

transposase e repetições terminais invertidas (IRs) (MAHILLON; CHANDLER, 1998).

Em estudo anterior, isolados de *R. solanacearum* que causam sintomas típicos de Moko e Bugtok não foram diferenciados por análises filogenéticas a partir do gene *egl* (FEGAN; PRIOR, 2006). Contudo, os resultados obtidos no atual trabalho identificaram quatro *clusters* ortólogos exclusivos nos representantes de Bugtok, os quais podem ser usados para distinguir estes dois quadros sintomatológicos. Os *clusters* identificados fornecem ao grupo duas informações: família transposase IS3 e IS5 e duas proteínas de função desconhecida (Proteína contendo o domínio DUF4158 e proteína hipotética). No complexo de espécies *R. solanacearum*, há um padrão de famílias IS entre os isolados e a maioria das famílias IS que estão espalhadas por todo o complexo, sendo as transposases da família IS3 e IS5 compartilhadas por todos os genomas. Além disso, isolados intimamente relacionados tendem a ter padrões semelhantes de ISs (GONÇALVES *et al.*, 2020).

A análise de filogenômica do gênero *Ralstonia* separou isolados dos filotipos IIA e IIB (ZHANG; QIU, 2016). Foi relatado que o filotipo IIA é altamente recombinogênico e diverso, com expansão de espécies ocorrendo; em contraste, ao filotipo IIB que é quase clonal, na análise de sequência multilocus (MLSA) baseada em nove locus (WICKER *et al.*, 2012). A descrição do filotipo IIA como recombinogênico e diverso pode ser o indício para o comportamento dos genomas de isolados da síndrome Sergipe (IIA-53) em ambas as análises filogenômicas (Figura 3). Em contrapartida, os genomas de Bugtok (IIB-3) apresentaram uma grande similaridade gênica, podendo este fato relacionar-se com a descrição de Wicker *et al.* (2012) para o filotipo IIB.

Nos genomas dos 23 isolados de ecótipo Moko, independente da sintomatologia que ocasionam na bananeira, o maquinário do SST2 foi estabelecido com uma ampla variedade de proteínas, sendo o genoma do isolado UA-1612 o que codificou o menor número de genes para esse sistema (61 sequências), contudo a informação presente possivelmente é suficiente para o funcionamento do SST2. De acordo com pesquisas anteriores, o SST2 é constituído de 40 a 70 proteínas de 12 a 15 tipos diferentes, que podem ser divididas em quatro subconjuntos: o complexo da membrana externa, a plataforma da membrana interna, a secreção de ATPase e o pseudópilo (KOROTKOV *et al.*, 2012).

O SST2 é essencialmente dependente das proteínas Sec e Tat e essas foram identificadas em vários organismos (PAPANIKOU *et al.*, 2007; ROBINSON; BOLHUIS, 2004). Nos genomas de Moko analisados ambas as vias estão presentes e a ausência das proteínas *SecA* e *TatA* nos genomas Molk2 e Granada91, respectivamente, podem não comprometer o funcionamento do SST2 nesses genomas. Essa informação pode ter sido



perdida no processo de sequenciamento e/ou montagem ou não estar no limiar utilizado no processo de anotação (via Blast; parâmetros descritos na metodologia), já que ambos os genomas estão incompletos (Tabela 1). Contudo, alternativamente, o genoma Molk2 possui a via Tat e o genoma Granada91 possui a via Sec, mantendo assim o funcionamento do SST2. Em *R. solanacearum*, a maioria das enzimas degradadoras da parede celular vegetal (CWDEs) são liberadas via SST2 (PRESTON *et al.*, 2005; SCHELL, 2000). A ausência do SST2 reflete de forma negativa na capacidade de colonização e multiplicação das bactérias (KANG *et al.*, 1994), concretizando assim a importância do SST2 na fase de patogênese.

O SST3 de bactérias fitopatogênicas é composto por aproximadamente 20 componentes proteicos, sendo nove conservados entre as bactérias patogênicas de plantas e animais (BUTTNER; HE, 2009). Os genomas B50 e CCRMRsB7 codificaram o menor número de proteínas estruturais para o SST3, podendo comprometer a liberação de efetores, que constitui uma importante ferramenta no processo de infecção de *R. solanacearum*, sendo essencial na patogenicidade (GENIN; BOUCHER, 2004). Além da importância no processo de liberação de efetores, as proteínas ligadas ao maquinário do SST3 foram correlacionadas às proteínas do sistema flagelar, que promove a locomoção e motilidade bacteriana (BLOCKER *et al.*, 2003; SAIER, 2004).

Em *R. solanacearum*, o SST3 é essencial para a patogenicidade (DESLANDE; GENIN, 2014), sendo sua ausência correspondente a mutantes avirulentos (VAN GIJSEGEM *et al.*, 1993). As proteínas efetoras secretadas por esse sistema de secreção são denominadas de Rip (*Ralstonia injected proteins* – proteínas injetoras de *Ralstonia*). Algumas famílias de efetores (RipA2) podem contribuir na patogenicidade de *R. solanacearum* a diversas culturas (SOLÉ *et al.*, 2012), como também podem ser um fator responsável por desencadear as reações de hipersensibilidade (HR; RipA5) (SOLÉ *et al.*, 2012) ou, em muitos casos, não apresentar função definida (RipAO, RipD, RipO1 e RipU). Contudo, estudos comprovaram ações relacionadas ao processo de infecção, como o efector RipAB, que mesmo não apresentando uma função definida, desencadeia uma patogenicidade intermediária no acesso M82 de tomateiro (CLARKE *et al.*, 2015). Dos efetores anotados apenas 16,3% foram compartilhados por todos os isolados e dentro dos quadros sintomatológicos houve variação expressiva, no entanto, os isolados de síndrome Sergipe compartilharam 94% dos efetores anotados (Figure 5). Com exceção dos representantes de síndrome Sergipe, não houve correlação entre os efetores anotados e as diferentes sintomatologias, sendo a análise inespecífica para diferenciar as diferentes sintomatologias.

Estudos anteriores relataram extensivamente que microrganismos com grande

variedade de CAZymes podem exibir maiores habilidades de degradação de biomassa vegetal (DALY *et al.*, 2017; LÓPEZ *et al.*, 2018; MIR *et al.*, 2017; MIYAUCHI *et al.*, 2018; O'CONNELL *et al.*, 2012). Embora as frequências absolutas dos domínios CAZy entre representantes de *R. solanacearum* ecótipo Moko tenham variado (Figura 6B) entre os quadros de diferentes sintomatologias as proporções das cinco classes funcionais dos CAZy (AA, CBM, CE, GH, GT e PL) foram notavelmente semelhantes (Figura 6A).

Os metabólitos que não estão associados a funções primárias são denominados de metabólitos secundários e por muitas vezes participam direta ou indiretamente da patogenicidade e virulência de fitobactérias. Estudos anteriores comprovaram que *R. solanacearum* pode sintetizar esses metabólitos quando associados a reguladores vegetais (SCHNEIDER *et al.*, 2009), contudo poucas foram as abordagens direcionadas a esses compostos para o ecótipo Moko (KREUTZER *et al.*, 2011; PAULY *et al.*, 2013).

Os isolados do ecótipo Moko analisados possuíram em seus genomas 30,8% das regiões codificantes anotadas para todos os genomas do grupo. Esse percentual garante ao ecótipo ação antimicrobiana que pode ser desencadeada pela capacidade antioxidativa (ex: Aryl polyenes - APE) ou pela produção de substâncias específicas (ex: bacteriocinas). Além desse potencial, os representantes de Bugtok produziram T1PKS, sideróforos, NRPS-like e furano. Esse último composto possui ação inseticida, atividades fitocidas (phytocidal) (WAKITA *et al.*, 2003) e expressiva ação antimicrobiana (ZHENG *et al.*, 2011). Assim como os furanos, as vias PKS / NRPS conferem ao grupo potencial atividade contra bactérias (ROBINSON *et al.*, 2019). Dentre os metabólitos secundários presentes em Bugtok, os sideróforos compreenderam um grupo bem diverso que atua na disponibilização ferro (KRAMER *et al.*, 2020) o qual é cofator de enzimas que catalisam reações redox envolvidas em processos celulares fundamentais, como respiração, síntese de DNA e proteção de espécies reativas de oxigênio (ANDREWS *et al.*, 2003). Os isolados de síndrome Sergipe codificaram para sideróforos, hserlactona, NRPS-like e PKS (T1PKS, transAT-PKS e transAT-PKS-like). O composto volátil hserlactona (homoserine lactona) pode estar relacionado à comunicação entre fungos e bactérias (SHINER *et al.*, 2005), detectado em 82,6% dos genomas do ecótipo Moko-síntomas típicos e ausente nos genomas de Bugtok.

## **Conclusões**

Os resultados obtidos permitem concluir que *R. solanacearum* ecótipo Moko consiste em um grupo de isolados com alta similaridade genômica, principalmente dentro dos quadros sintomatológicos síndrome Sergipe e Bugtok. A análise de Pan-genoma identificou 21,3% de

regiões herdáveis entre os representantes do ecótipo Moko e a variante sintomatológica síndrome Sergipe se destaca por apresentar o maior número de *clusters* de homólogos exclusivos. Com base nas análises descritas pelo atual estudo, a semelhança nos quadros sintomáticos de Bugtok e síndrome Sergipe não estão relacionadas à similaridade genômica, fatores de virulência, metabólitos secundários ou filogenômica. Sendo assim, novas análises devem ser realizadas usando outras abordagens possivelmente com foco na ecologia, tendo em vista que pouco se conhece sobre as interações entre os isolados bacterianos e os insetos responsáveis pela transmissão de Bugtok e síndrome Sergipe, sabendo-se que ambas as doenças ocorrem por infecção via inflorescência e esse ponto pode ser de grande relevância no entendimento das peculiaridades do Moko e suas variantes sintomatológicas.

## Referências

Ailloud, F., Lowe, T., Cellier, G., Roche, D., Allen, C., Prior, P. (2015) Rev Microbiol. 11, 95-105 <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>.

Daly, P., Van Munster, J.M. Blythe, M.J., Ibbett, R., Kokolski, M., Gaddipati, S., Lindquist, E., Singan, V.R., Barry, K.W., Lipzen, A., Yee N.C., Petzold, C.J., Chan, L.J.G., Pullan, S.T., Delmas, S., Waldron, P.R., Grigoriev, I.V., Tucker, G.A., Simmons, B.A., Archer D.B. (2017) Expression of *Aspergillus niger* CAZymes is determined by compositional changes in wheat straw generated by hydrothermal or ionic liquid pretreatments. Biotechnol Biofuels 10 (35), 1-19 <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0700-9>.

Comparative genomic analysis of *Ralstonia solanacearum* reveals candidate genes for host specificity. BMC Genomics. 16, 270-281 <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1474-8>.

Albuquerque, G.M.R., Santos, L.A., Felix, K.C.S., Rollemberg, C.L., Silva, A.M.F., Souza, E.B., Cellier, G., Prior, P., Mariano, R.L.R. (2014) Moko Disease-Causing Strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil Extend Known Diversity in Paraphyletic Phylotype II. Phytopathol. 104, 1175-1182 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-13-0334-R>.

Andrews, S.C., Robinson, A.K., Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiol. Rev. 27 (2-3), 215–237 [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X).

Baser, K. H. C., Buchbauer, G. (2015) Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. 2. ed. CRC Press, 2015. 1112 p.

- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, M. H., Weber, T. (2019) antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* 47 (W1), W81–W87 <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>.
- Blocker, A., Komoriya, K. and Aizawa, S.-I. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (6), 3027–3030 <https://doi.org/10.1073/pnas.0535335100>.
- Blomme, G., Dita, M., Jacobsen, K. S., Vicente, L. P., Molina, A., Walter, O., Poussier, S., Prior, P. (2017) Bacterial Diseases of Bananas and Enset : Current State of Knowledge and Bacterial Diseases of Bananas and Enset : Current State of Knowledge and Integrated Approaches Toward Sustainable Management. *Plant Microbe Interactions*, 8 (1290), 1-26 <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01290>.
- Bocsanczy, A.M., Huguet-Tapia, J.C., Norman, D. J. (2017) Comparative Genomics of *Ralstonia solanacearum* Identifies Candidate Genes Associated with Cool Virulence. *Front. Plant. Sci.* 13, 8:1565 <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01565/full>.
- Buttner, D., He, S. Y. (2009) Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiol.* 150, 1656–1664 <https://doi.org/10.1104/pp.109.139089>.
- Chandler, M., Mahillon, J. (2002) Insertion Sequences Revisited. In: Craig N, Craigie R, Gellert M, Lambowitz A (Eds.), *Mobile DNA II*. ASM Press, Washington (DC), p. 305-366.
- Chen, H., Bian, Z., Ravichandran, V., Li, R., Sun, Y., Huo, L., Fu, J., Bian, X., Xia, L., Tu, Q., Zhang, Y. (2019) Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases in Burkholderiales. *Crit. Rev. Microbiol.* 45, 162-181 <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1514365>.
- Choi, K., Son, G. J., Ahmad, S., Lee, S. Y., Lee, H. J., Lee, S. W. (2020). Contribution of the murI Gene Encoding Glutamate Racemase in the Motility and Virulence of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Pathol. J.* 36 (4), 355–363 <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2020.0049>.
- Clarke, C.R., Studholme, D.J., Hayes, B., Runde, B., Weisberg, A., Rongman Cai, R., Tadeusz Wroblewski, T., Marie-Christine Daunay, M-C., Wicker, E., Castillo, J.A., Boris A. Vinatzer, B.A. (2015) Genome-Enabled Phylogeographic Investigation of the Quarantine

- Pathogen *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 and Screening for Sources of Resistance Against Its Core Effectors. *Phytopathology*. 105, 587-607. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0373-R>.
- Cotter, P.D.; Ross, R. P.; Hill, C. (2013) Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics?. *Nat Rev Microbiol*. 11, 95-105 <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>.
- Deslandes, L., Genin, S. (2014) Opening the *Ralstonia solanacearum* type III effector tool box: insights into host cell subversion mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol*. 20, 110–117 <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.002>.
- Fegan, M., Prior, P. B. (2006) Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Australas. Plant Pathol*. 35, 93–101 <https://doi.org/10.1071/AP05105>.
- Genin, S., Boucher, C. (2004) Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol*. 42, 107-134 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.011204.104301>.
- Genin, S., Denny, T.P. (2012) Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathol*. 50, 67-89 <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173000>.
- Gomes, E.S., Schuch, V., Lemos, E.G.M. (2013) Biotechnology of polyketides: new breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. *Braz. J. Microbiol*. 44, 1007-1034 <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000400002>.
- Gonçalves, O.S., Gonçalves, K.F., Campos, J., Assis, A.S. (2020) Transposable elements contribute to the genome plasticity of *Ralstonia solanacearum* species complex. *Microb. Genom*. 6 (5), 1-12 <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000374>. 6.
- Guéron, M., Timmers, A. C., Boucher, C., Arlat, M. (2000) Two novel proteins, PopB, which has functional nuclear localization signals, and PopC, which has a large leucine-rich repeat domain, are secreted through the hrp- secretion apparatus of *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol*. 36, 261–277 doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01870.x.
- Jones, J.D., Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*. 444, 323–329.

<https://doi.org/10.1038/nature05286>.

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., Haeseler, A.V., Jermini, L.S. (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods.* 14, 587–589 <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.

Kang, Y.; Huang, J.; Mao, G.; He, L.Y.; Shell, M.A. (1994) Dramatically reduced virulence of mutants of *Pseudomonas solanacearum* defective in export of extracellular proteins across the outer membrane. *Mol Plant Microbe Interact.* 7, 370-377.

Katoh, K., Standley, D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772-780 <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.

Korotkov, K.V., Sandkvist, M., Hol, W.G.J. (2012) The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol.* 10:336–351 <https://doi.org/10.1038/nrmicro2762>

Kramer, J., Özkaya, Ö., Kümmerli, R. (2020) Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 152-163 <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>.

Kreutzer, M.F., Kage, H., Gebhardt, P., Wackler, B., Saluz, H.P., Hoffmeister, D., Nett, M. (2011) Biosynthesis of a complex yersiniabactin-like natural product via the mic locus in phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol.* 77, 6117–6124 <https://doi.org/10.1128/AEM.05198-11>.

Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C., Salzberg, S. L. (2004) Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-2-r12>. 5, R12.

Liu, Y., Tang, Y., Qin, X., Yang, L., Jiang, G., Li, S., Ding, W. (2017) Genome Sequencing of *Ralstonia solanacearum* CQPS-1, a Phylotype I Strain Collected from a Highland Area with Continuous Cropping of Tobacco. *Front. Microbiol.* 31, 8:974 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00974>.

López, R., Regier, J., Cole, M., Jordan, M., Yosef, N. (2018) Bayesian Inference for a Generative Model of Transcriptome Profiles from Single-cell RNA Sequencing. *Nat.*

Methods. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0229-2>.

Mahillon J, Chandler M. (1998). Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62 (3), 725–774 <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.725-774>.

Malladi, S., Nadh, R.V., Babu, K.S., Babu, P.S. (2017) Synthesis and antibacterial activity studies of 2,4-di substituted furan derivatives. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci.* 6, 345-353 <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.08.001>.

Martínez-Núñez, M.A., López, V.E.L. (2016) Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustain. Chem. Process.* 4 (13) <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0057-6>.

Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.P., Goker, M. (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinform.* 14 (60), 1-14 <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>.

Minh, B.Q., Nguyen, M.A.T., Von Haeseler, A. (2013) Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol. Biol. Evol.* <https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>. 30,1188-1195.

Mir, B.A., Myburg, A.A., Mizrahi, E., Cowan, D.A. (2017) In planta expression of hyperthermophilic enzymes as a strategy for accelerated lignocellulosic digestion. *Sci Rep* 7(1), 1-14 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11026-1>

Miyauchi, S., Rancon, A., Drula, E., Hage, H., Chaduli, D., Favel, A., Grisel, S., Henrissat, B., Herpoël-Gimbert, I., Ruiz-Dueñas, F.J., Chevret, D., Hainaut, M., Lin, J., Wang, M., Pangilinan, J., Lipzen, A., Lesage-Meessen, L., David Navarro, D., Riley, R., Grigoriev, I.V., Zhou, S., Raouche, S., Rosso, M.-N. (2018) Integrative visual omics of the white-rot fungus *Polyporus brumalis* exposes the biotechnological potential of its oxidative enzymes for delignifying raw plant biomass. *Biotechnol Biofuels* 11 (201), 1-14 <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1198-5>.

Mukaihara, T., Tamura, N., Iwabuchi, M. (2010) Genome-wide identification of a large repertoire of *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins by a new functional screen. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 23, 251-62 <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-3-0251>.

Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., Von Haeseler, A., Minh, B.Q. (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>.

O'connell, R.J. Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J. Torres, M.F., Damm, U., Buiate, E.A., Epstein, L., Alkan, N., Altmüller, J., Alvarado-Balderrama, L., Bauser, C.A., Becker, C., Birren, B.W., Chen, Z., Choi, J., Crouch, J.A., Duvick, J.P., Farman, M.A., Gan, P., Heiman, D., Henrissat, B., Howard, R.J., Kabbage, M., Koch, C., Kracher, B., Kubo, Y., Law, A.D., Lebrun, M.H., Lee, Y.H., Miyara, I., Moore, N., Neumann, U., Nordström, K., Panaccione, D.G., Panstruga, R., Place, M., Proctor, R.H., Prusky, D., Rech, G., Reinhardt, R., Rollins, J.A., Rounsley, S., Schardl, C.L., Schwartz, D.C., Shenoy, N., Shirasu, K., Sikhakolli, U.R., Stüber, K., Sukno, S.A., Sweigard, J.A., Takano, Y., Takahara, H., Trail, F., Van Der Does, H.C., Voll, L.M., Will, I., Young, S., Zeng, Q., Zhang, J., Zhou, S., Dickman, M.B., Schulze-Lefert, P., Ver Loren Van Themaat, E., MA, L.J., Vaillancourt, L.J. (2012) Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat Genet.* 44, 1060-1065 <https://doi.org/10.1038/ng.2372>.

Page, A.J., Cummins, C.A., Hunt, M., Wong, V.K., Reuter, S., Holden, M.T.G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J.A., Parkhill, J. (2015) Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 31, 3691–3693 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>.

Papanikou, E., Karamanou, S., Economou, A. (2007) Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol.* 5, 839–851 <https://doi.org/10.1038/nrmicro1771>.

Pauly, J., Spitteller, D., Linz, J., Jacobs, J., Allen, C., Nett, M., Hoffmeister, D. (2013) Ralfuranone thioether production by the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Chembiochem.* 14, 2169-2178 <https://doi.org/10.1002/cbic.201300364>.

Peeters, N., Carrère, S., Anisimova, M., Plener, L., Cazalé, A. C., Genin, S. (2013) Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *BMC Genom* 14, (859) <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-859>.

Poueymiro, M., Genin, S. (2009) Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred



- tricks to kill a plant. *Curr Opin Microbiol.* 12 (1), 44-52  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.11.008>.
- Preston, G.M.; Studholme, D.J.; Caldelari, I. (2005) Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 29 (2), 331–360  
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.004>
- Pritchard, L., Glover, R.H., Humphris, S., Elphinstone, J.G., Toth, I.K. (2016) Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal. Methods.* 8 (1), 1-32 <https://doi.org/10.1039/C5AY02550H>.
- Rambaut, A. (2009) FigTree v1.3.1. [computer program] <http://tree.bio.ed.ac.uk>.
- Robinson, C., Bolhuis, A. (2004) Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1694(1–3), 135–147  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.03.010>.
- Robinson, S., Robinson, L., Christenson, J.K., Wackett, L.P. (2019) Biosynthesis and chemical diversity of  $\beta$ -lactone natural products. *Nat. Prod. Rep.* 36, 458-475  
<https://doi.org/10.1039/c8np00052b>.
- Roperos, N.I. (1965) Note on the occurrence of a new disease of cooking banana in the Phillipines. *Coffee and Cacao J.* 8, 135-136.
- Saier Jr., M.H. (2004) Evolution of bacterial type III protein secretion systems. *Trends Microbiol.* 12(3), 113–115 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.01.003>.
- Schalk, I.J., Guillon, L. (2013) Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environ. Microbiol.* 15, 1661–1673  
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>
- Schell, M.A. (2000) Control of Virulence and Pathogenicity Genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu Rev Phytopathol.* 38, 263–92  
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.263>.
- Schneider, P., Jacobs, J.M., Neres, J., Aldrich, C.C., Allen, C., Nett, M., Hoffmeister, D. (2009) The global virulence regulators VsrAD and PhcA control secondary metabolism in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Chembiochem.* 10(17), 2730–2732

<https://doi.org/10.1002/cbic.200900510>

Sequeira, L. (1998) Bacterial wilt: the missing element in international banana improvement programs. In: Prior, P., Allen, C., Elphinstone, J. (Eds), *Bacterial Wilt Disease; Molecular and Ecological Aspects*. INRA Editions, Paris, p. 6–14.

Shiner, E.K., Rumbaugh, K.P., Williams, S.C. (2005) Interkingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol Rev.* 29 (5), 935–947  
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.001>

Silva, J.R.; Pais, A.K.L.; Albuquerque, G.M.R.; Silva, A.M.F.; Silva Junior, W.J.; Balbino, V.Q.; Fonseca, M.E.N.; Gama, M.A.S.; Souza, E.B.; Mariano, R.L.R. (2020) Genomic sequencing of two isolates of *Ralstonia solanacearum* causing Sergipe facies and comparative analysis with Bugtok disease isolates. *Genet Mol Biol.* v. 43 (4)  
<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2020-0155>

Soguilon, C.E., Magnaye, L.V., Natural, M.P. (1995) Bugtok disease of banana. *Musa Dis. Fact Sheet*, INIBAP, Montpellier, n. 6.

Solé, M., Popa, C., Mith, O., Sohn, K.H., Jones, J.D., Deslandes, L., Valls, M. (2012). The *awr* gene family encodes a novel class of *Ralstonia solanacearum* type III effectors displaying virulence and avirulence activities. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25 (7), 941–953  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-12-11-0321>.

Travin, D.Y., Watson, Z. L., Metelev, M., Ward, F. R., Osterman, I.A., Khven, I.M., Khabibullina, N. F., Serebryakova, M., Mergaert, P., Polikanov, Y.S., Cate, J.H.D., Severinov, K. (2019) Structure of ribosome-bound azole-modified peptide phazolicin rationalizes its species-specific mode of bacterial translation inhibition. *Nat. Commun.* 10(1), 4563 <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-12589-5>.

Van Gijsegem, F., Genin, S., Boucher, C. (1993) Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol.* 1(5), 175–180  
[https://doi.org/10.1016/0966-842X\(93\)90087-8](https://doi.org/10.1016/0966-842X(93)90087-8).

Wakita, T., Kinoshita, K., Yamada, E., Yasui, N., Kawahara, N., Naoi, A., Nakaya, M., Ebihara, K., Matsuno, H., Kodaka, K., (2003) The discovery of dinotefuran: a novel neonicotinoid. *Pest Manag. Sci.* 59 (9), 1016–1022 <https://doi.org/10.1002/ps.727>.

Wicker, E., Lefeuvre, P., Cambiaire, J.C., Lemaire, C., Poussier, S., Prior, P. (2012) Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. ISME J. 6, 961-974.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2011.160>.

Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., Xu, Y. (2012) DbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. Nucleic Acids Res.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks479>.

Zhang, Y., Qiu, S. (2016) Phylogenomic analysis of the genus *Ralstonia* based on 686 single-copy genes. Antonie Van Leeuwenhoek. 109 (1), 71–82  
<https://doi.org/10.1007/s10482-015-0610-4>.

Zheng, C.J., Jiang, S.M., Chen, Z.H., Ye, B.J., Piao, H.R. (2011) Synthesis and anti-bacterial activity of some heterocyclic chalcone derivatives bearing thiofuran, furan, and quinoline moieties. Arch. Pharm. 344 (10), 689–695  
<https://doi.org/10.1002/ardp.201100005>.

**Tabela 1.** Características dos isolados de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas utilizados neste estudo

Isolado	Sequevar	Origem	Nível	Tamanho (pb)	Acesso Genbank
B50 <sup>M</sup>	IIA-24	Peru	<i>Scaffold</i>	5.596,07	GCF_000825785.1
CFBP1416 <sup>M</sup>	IIB-3	Costa Rica	<i>Scaffold</i>	5.744,27	GCF_000825925.1
CCRMRs277 <sup>M</sup>	IIA-24	Brasil	<i>Chromossome</i>	5.636,32	GCA_014210395.1
CCRMRs287 <sup>M</sup>	IIB-4	Brasil	<i>Chromossome</i>	5.444,70	GCA_014210375.1
CCRMRs304 <sup>M</sup>	IIA-24	Brasil	<i>Chromossome</i>	5.645,24	GCA_014210335.1
CCRMRsB7 <sup>M</sup>	IIB-25	Brasil	<i>Chromossome</i>	5.854,66	GCA_014210345.1
Grenada 9-1 <sup>M</sup>	IIA-6	Granada	<i>Scaffold</i>	5.479,46	GCF_000825845.1
IBSBF1900 <sup>M</sup>	IIA-24	Brazil	<i>Scaffold</i>	5.812,60	GCF_001373275.1
Po82 <sup>M</sup>	IIB-4	México	<i>Complete</i>	5.430,26	GCF_000215325.1
UW163 <sup>M</sup>	IIB-4	Peru	<i>Complete</i>	5.596,24	GCF_001587135.1
UW179 <sup>M</sup>	IIB-4	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5.426,41	GCF_000825805.1
UW181 <sup>M</sup>	IIA-6	Venezuela	<i>Scaffold</i>	5.436,69	GCF_001373315.1
UA-1609 <sup>M</sup>	IIB-4	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5.068,05	GCF_003860765.1
UA-1617 <sup>M</sup>	IIB-4	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5.362,48	GCF_003860745.1
UA-1579 <sup>M</sup>	IIB-4	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5.081,43	GCF_003860725.1
UA-1591 <sup>M</sup>	IIB-4	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5.351,98	GCF_003860705.1
UA-1611 <sup>M</sup>	IIA-6	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5.195,69	GCF_003860685.1
UA-1612 <sup>M</sup>	IIA-6	Colômbia	<i>Scaffold</i>	5.003,36	GCF_003860665.1
CIP417 <sup>B</sup>	IIB-3	Filipinas	<i>Scaffold</i>	5.523,71	GCF_000825825.1
MOLK2 <sup>B</sup>	IIB-3	Filipinas	<i>Contig</i>	5.551,88	GCF_000212635.3
10314	II	Filipinas	<i>Contig</i>	5.458,21	GCF_008271875.1
SFC <sup>SE</sup>	IIA-53	Brasil	<i>Chromossome</i>	5.713,71	GCF_003590625.1
IBSBF2570 <sup>SE</sup>	IIA-53	Brasil	<i>Chromossome</i>	5.722,67	GCF_003590585.1

<sup>M</sup> – Sintomas típicos de Moko;

<sup>B</sup> – Sintomas de Bugtok;

<sup>SE</sup> – Sintomas de síndrome Sergipe.

**Tabela 2.** Estimativas de ANIm, Tetra e DDHs de isolados de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas

Análises	ANIm		Tetra		DDHs	
	Valor médio	Variação	Valor médio	Variação	Valor médio	Variação
Entre os genomas de <i>R. solanacearum</i> Ecótipo Moko	97,6	96,1 - 100	99,9	99,9 - 100	78,8	66,1 - 100
Entre os genomas de <i>R. solanacearum</i> phylotype IIA	99,4	98,9 – 100	99,9	99,9 - 100	94,0	88,9 – 99,9
Entre os genomas de <i>R. solanacearum</i> phylotype IIB	98,7	97,4 – 100	99,9	99,9 - 100	87,8	76,6 - 100
Entre os genomas do Filotipo IIA - Filotipo IIB	96,2	96,1– 96,4	99,9	99,7 – 99,9	67,1	66,1 – 68,6
Entre os genomas de Moko *	97,7	96,1 – 100	99,9	99,7 - 100	73,2	66,1 - 100
Entre os genomas de Bugtok *	100	99,9 - 100	99,9	99,9 - 100	99,8	99,5 – 99,7
Entre os genomas de síndrome Sergipe *	100	**	100	**	99,9	99,9 – 100
Moko – Bugtok*	97,3	96,2 – 100	99,9	99,7 – 99,9	77,2	66,8 – 66,8
Moko - síndrome Sergipe*	97,4	96,1 – 99,1	99,9	99,8 – 99,9	67,6	66,1 – 91,9
Bugtok – síndrome Sergipe	96,3	96,3	99,9	**	67,7	67,4 – 68,1

\*Moko = Sintomas típicos de Moko; Bugtok = Sintomas de Bugtok ocorrendo nas Filipinas; Síndrome Sergipe = Sintomas de síndrome Sergipe ocorrendo no Brasil.

\*\*Não houve variação.

**Tabela 3.** Core de efetores de isolados de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas

<b>Família</b>	<b>Gene</b>	<b>Nome alternativo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência*</b>
<b>RipA2</b>	<i>ripAB</i>	AWR2	Patogenicidade a tomate e tabaco	4;5
<b>RipA5</b>	<i>ripA5</i>	AWR5	HR-like em tabaco	1; 5
<b>RipAB</b>	<i>ripAB</i>	PopB, Rip48	Indeterminado	1; 3
<b>RipAC</b>	<i>ripAC</i>	PopC, Rip47	Repetições ricas em leucina	3; 6
<b>RipAO</b>	<i>ripAO</i>	Rip50, Hpx2, Brg34	Indeterminado	1;3
<b>RipAP</b>	<i>rip60</i>	Rip60	Repetições de anquirina	3
<b>RipAY</b>	<i>ripAY</i>	Rip55, Hpx21, Brg37	Indeterminado	3
<b>RipD</b>	<i>ripD</i>	avrPphD	Indeterminado	2
<b>RipF2</b>	<i>ripF2</i>	...	SST3	1
<b>RipI</b>	<i>ripI</i>	Rip1	Indeterminado	3
<b>RipM</b>	<i>ripM</i>	Rip16, Brg42	Indeterminado	3
<b>RipO1</b>	<i>ripO1</i>	Rip35, Brg12	Indeterminado	3
<b>RipR</b>	<i>ripR</i>	Rip64, Hpx24, Brg15, PopS	Indeterminado	1; 6
<b>RipS5</b>	<i>ripS</i>	SKWP5, Rip33, Hpx34	Domínio repetições de Heat/Armadillo	3
<b>RipU</b>	<i>ripU</i>	Rip59	Indeterminado	3
<b>RipV2</b>	<i>ripV</i>		Domínio ubiquitina ligase	1

\*<sup>1</sup>-Peeters *et al.* (2013)

<sup>2</sup>- Bocsanczy *et al.* (2017)

<sup>3</sup>- Mukaihara; Tamura; Iwabuchi (2010)

<sup>4</sup>- Liu *et al.* (2017)

<sup>5</sup>- Sole *et al.* (2012)

<sup>6</sup>- Guéron *et al.* (2000)

**Tabela 4.** Descrição dos metabólitos secundários e funções anotados para os genomas de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas

<b>Anotação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Função</b>
<b>Arylpolyene</b>	<i>Cluster</i> de Aryl polyene	Antioxidante <sup>1</sup>
<b>Bacteriocina</b>	Bacteriocina ou outro <i>cluster</i> de peptídeos ribossomicamente não especificados e modificados pós-tradução (RiPP)	Antimicrobiano <sup>2</sup>
<b>Betalactone</b>	Beta-lactone contendo inibidor de protease	Bioatividade potente contra bactérias e fungos <sup>3</sup>
<b>Furan</b>	<i>Cluster</i> de furan	Atividade antibacteriana <sup>4</sup>
<b>Hserlactone</b>	<i>Cluster</i> homoserine lactone	Comunicação entre fungos e bactérias <sup>5</sup>
<b>LAP</b>	Azol linear(in)e-contendo peptídeos	Atividade antibacteriana <sup>6</sup>
<b>NRPS</b>	<i>Cluster</i> de peptídeos não ribossomais	Alta afinidade para Fe <sup>3+</sup> <sup>7</sup> Atividade antibacteriana e antifúngica <sup>8</sup>
<b>NRPS-like</b>	Fragmento NRPS-Like	Indeterminado
<b>Sideróforo</b>	<i>Cluster</i> sideróforo	Alta afinidade para Fe <sup>3+</sup> <sup>9</sup>
<b>T1PKS</b>	Tipe I PKS (Policetídeo sintase)	Macrolides antibióticos (isto é, eritromicina) e polienos (ou seja, nistatina) <sup>12</sup>
<b>Terpeno</b>	Terpeno	Produtos farmacêuticos, aromatizantes, fragrâncias, antimicrobianos, pesticidas e combustíveis alternativos <sup>10</sup>
<b>TransAT-PKS</b>	Trans-AT PKS	Antibiótico, como mupirocin <sup>11</sup>
<b>TransAT-PKS-like</b>	Trans-AT PKS fragment, with trans-AT domain not found	Indeterminado

<sup>1-</sup> Schçner *et al.* (2016)

<sup>2-</sup> Cotter; Ross; Hill (2013)

<sup>3-</sup> Robinson *et al.* (2019)

<sup>4-</sup> Malladi *et al.* (2017)

<sup>5-</sup> Shiner *et al.* (2005)

<sup>6-</sup> Travin *et al.* (2019)

<sup>7-</sup> Schalk; Guillon (2013)

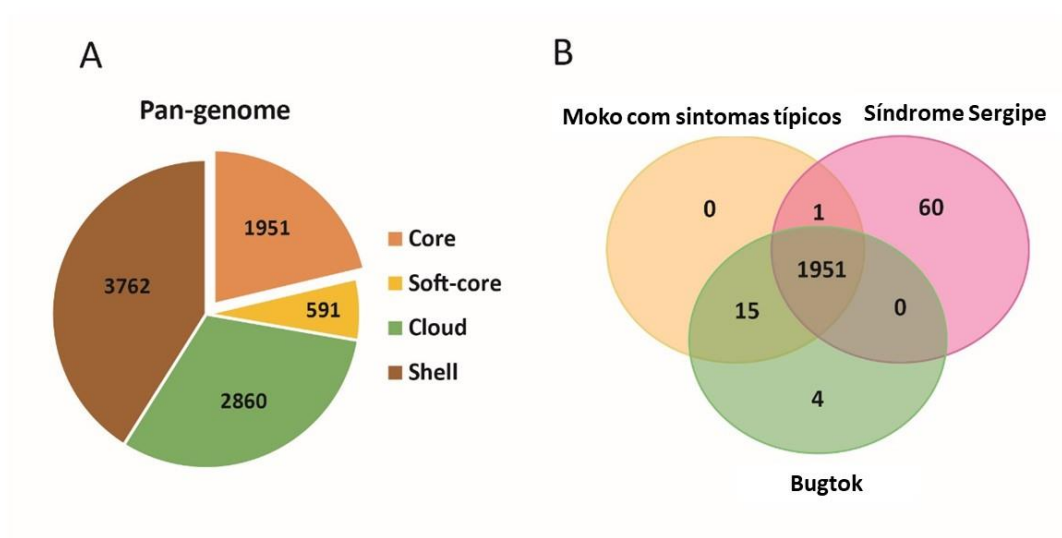
<sup>8-</sup> Martínez-Núñez; López (2016)

<sup>9-</sup> Kramer *et al.* (2020)

<sup>10-</sup> Baser; Buchbauer (2015)

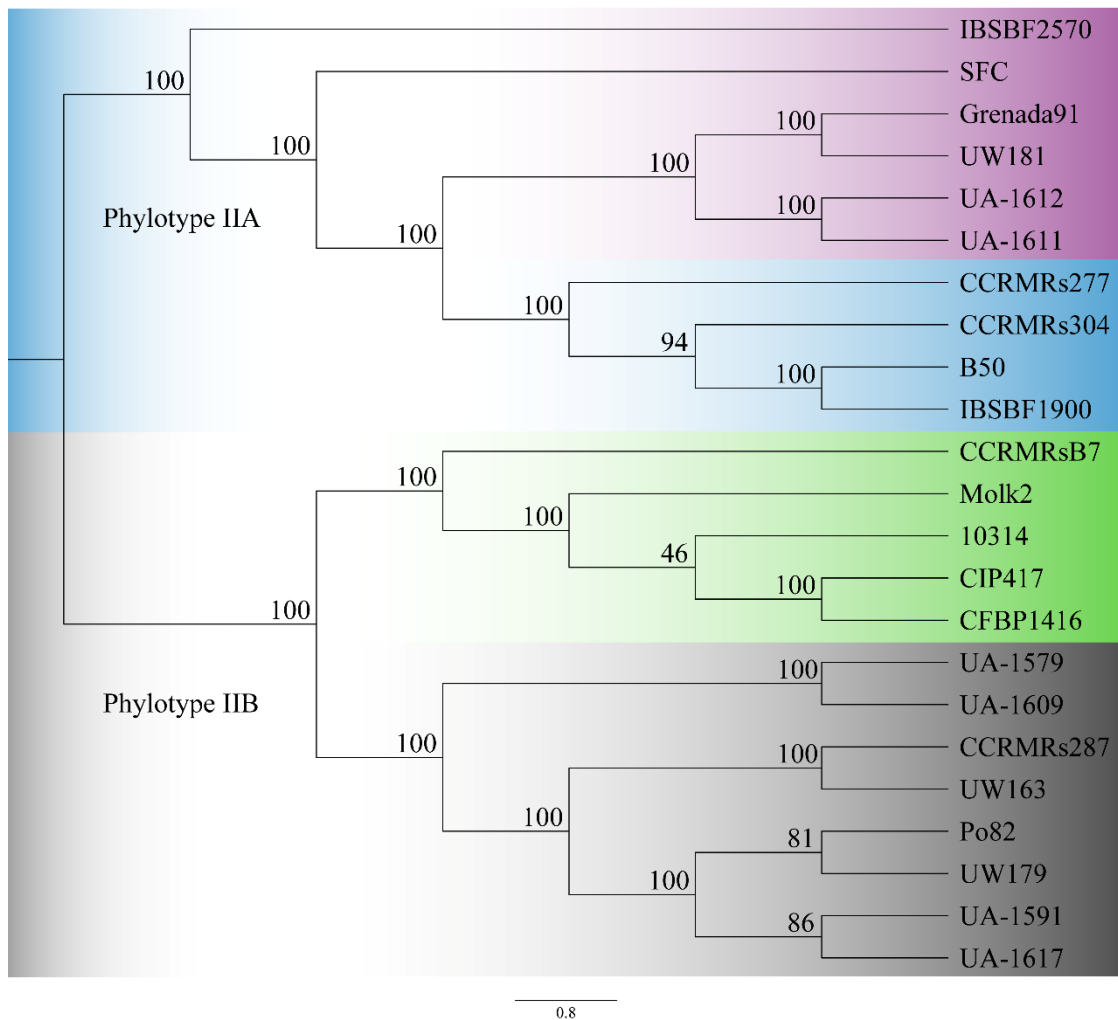
<sup>11-</sup> Chen *et al.* (2019)

<sup>12-</sup> Gomes; Schuch; Lemos (2013)

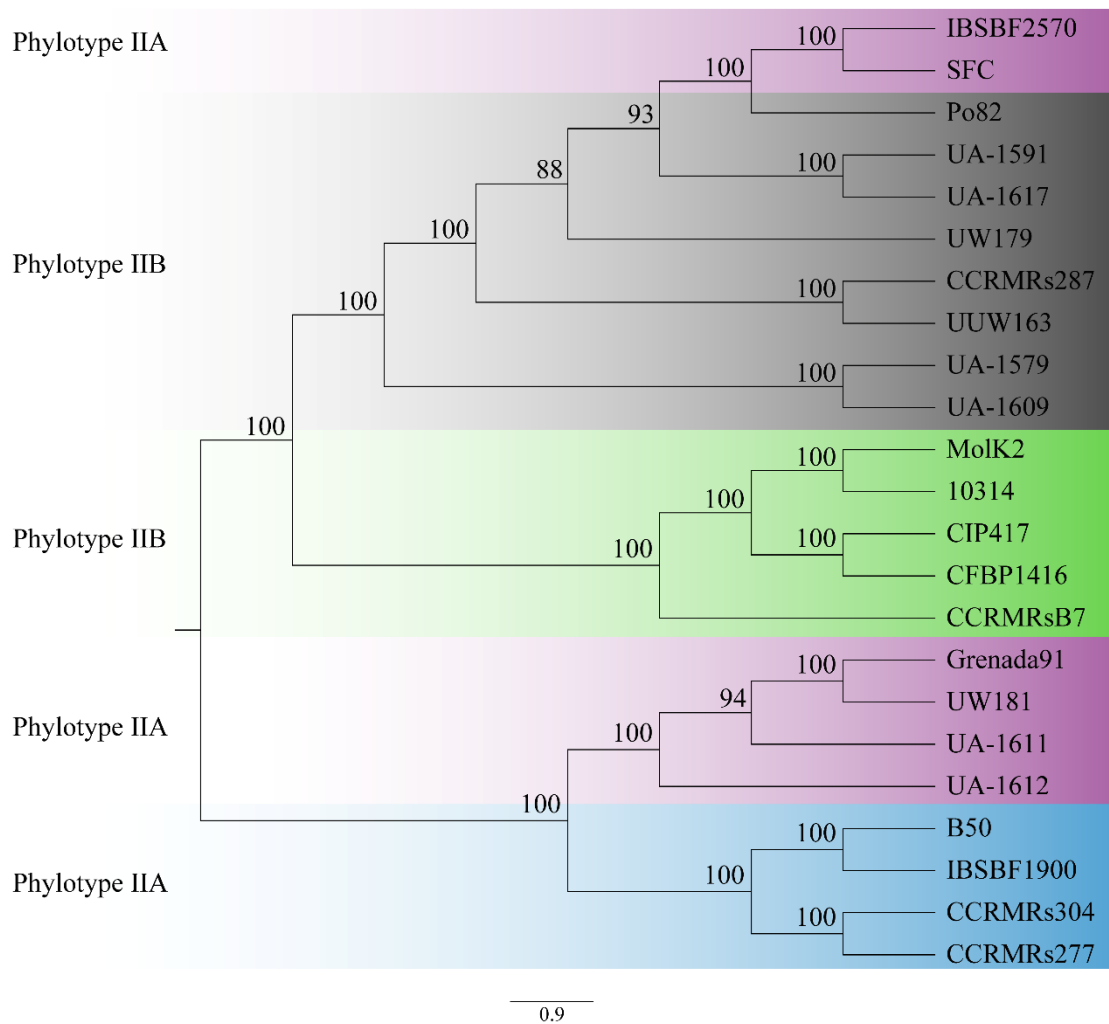


**Figura 1.** Representação do pan-genoma de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko gerado pelo software Roary. (A) Categorias de gene (core, soft-core, shell, and cloud) presentes nos genomas. (B) Diagrama de Venn mostrando os *clusters* presentes no genoma de isolados de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas. Isolados do ecótipo Moko: CIP417 e Molk2 - Bugtok; IBSBF2570 e SFC - síndrome Sergipe; demais isolados - sintomas típicos de Moko.

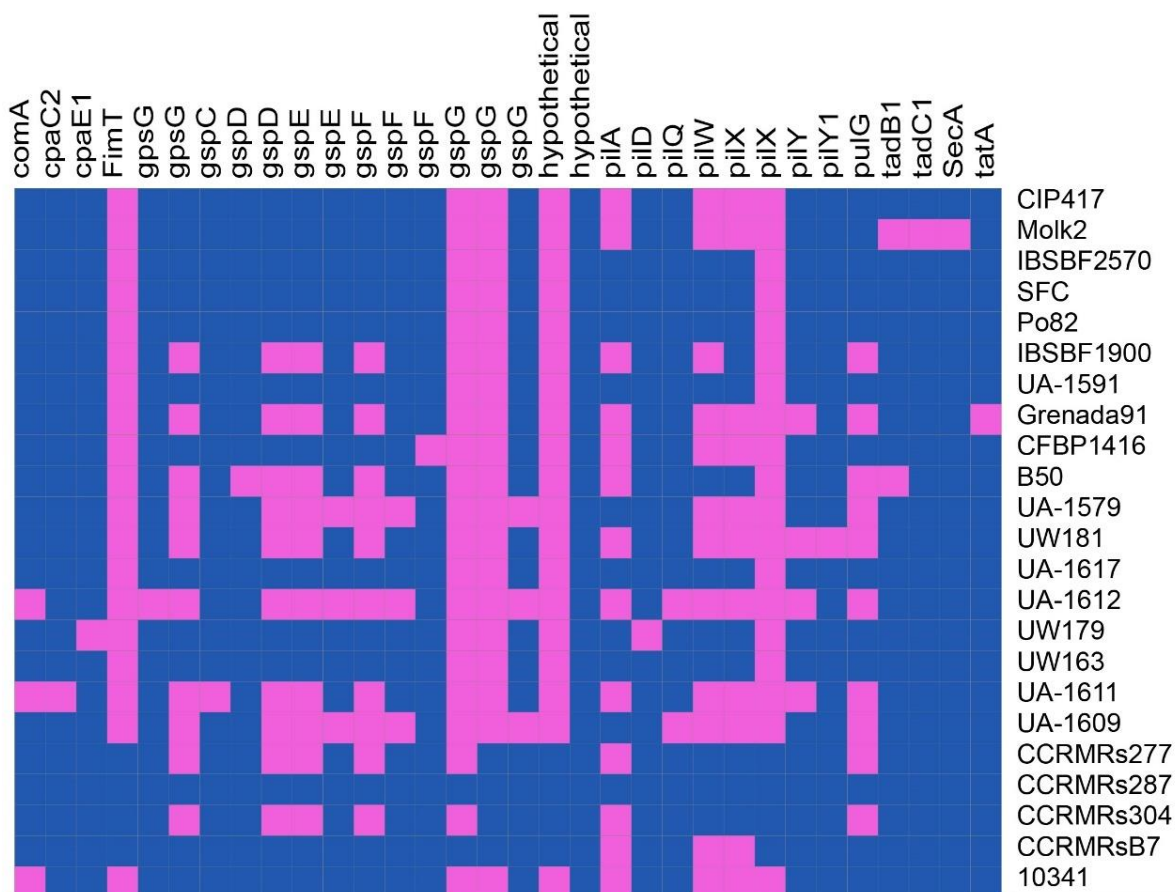




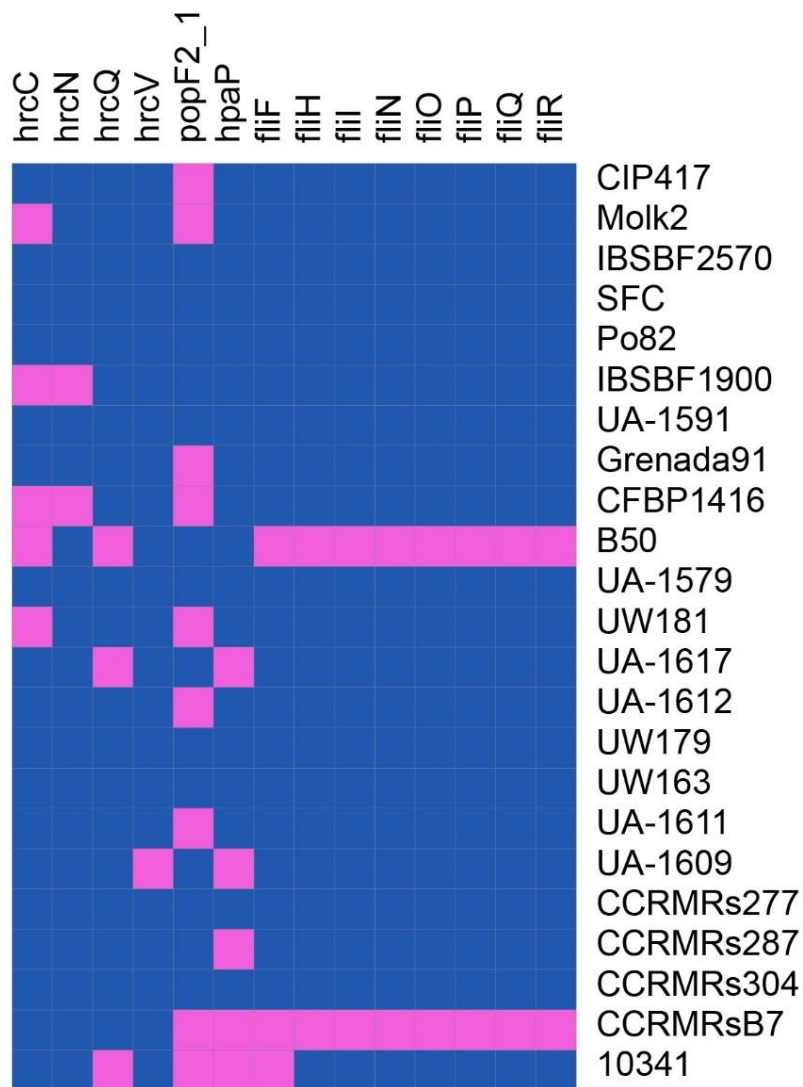
**Figura 2.** Árvore filogenética de Máxima verossimilhança das sequências dos *core genes* anotados para os genomas *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas. Descrição: Subgrupo IIA(1) em azul, IIA(2) em lilás, IIB(1) em verde e IIB(2) em preto. Isolados do ecótipo Moko: CIP417 e Molk2 - Bugtok; IBSBF2570 e SFC - síndrome Sergipe; e demais isolados - sintomas típicos de Moko.



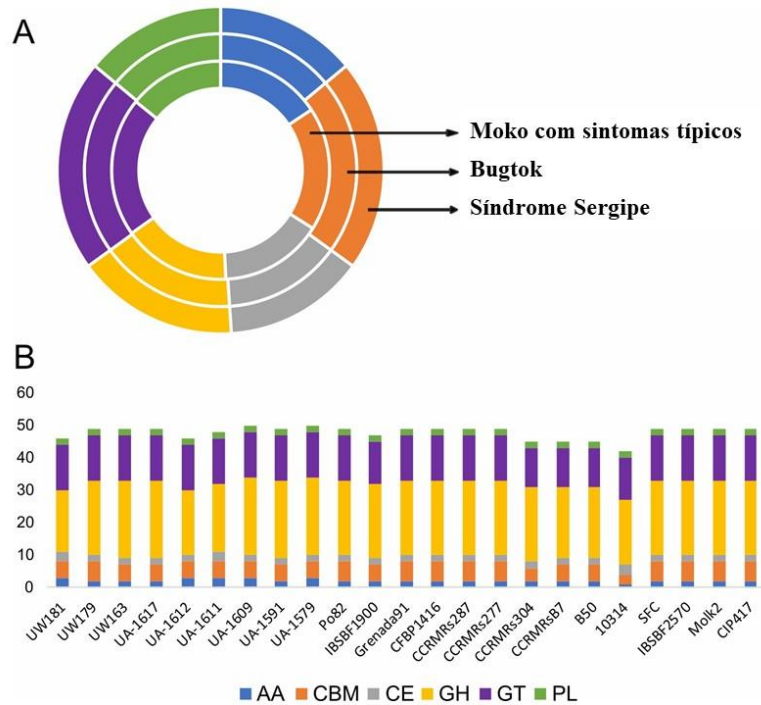
**Figura 3.** Árvore filogenética de Máxima verossimilhança com a presença e ausência de genes ortólogos dos genomas de *Ralstonia solanacearum* ecótipo e suas variantes sintomatológicas. Descrição: Subgrupo IIA(1) em azul, IIA(2) em lilás, IIB(1) em verde e IIB(2) em preto. Isolados do ecótipo Moko: CIP417 e MolK2 - Bugtok; IBSBF2570 e SFC - síndrome Sergipe; demais isolados - sintomas típicos de Moko.



**Figura 4.** Esquema de presença e ausência das proteínas estruturais do sistema de secreção Tipo II (SST2) dos genomas de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas. Na coluna: genes para codificação das proteínas estruturais do SST2. Na linha: isolados do ecótipo Moko (CIP417 e Molk2 - Bugtok; IBSBF2570 e SFC - síndrome Sergipe; demais isolados - sintomas típicos de Moko). Na representação esquemática foram excluídos genes presentes em todos os representantes analisados.



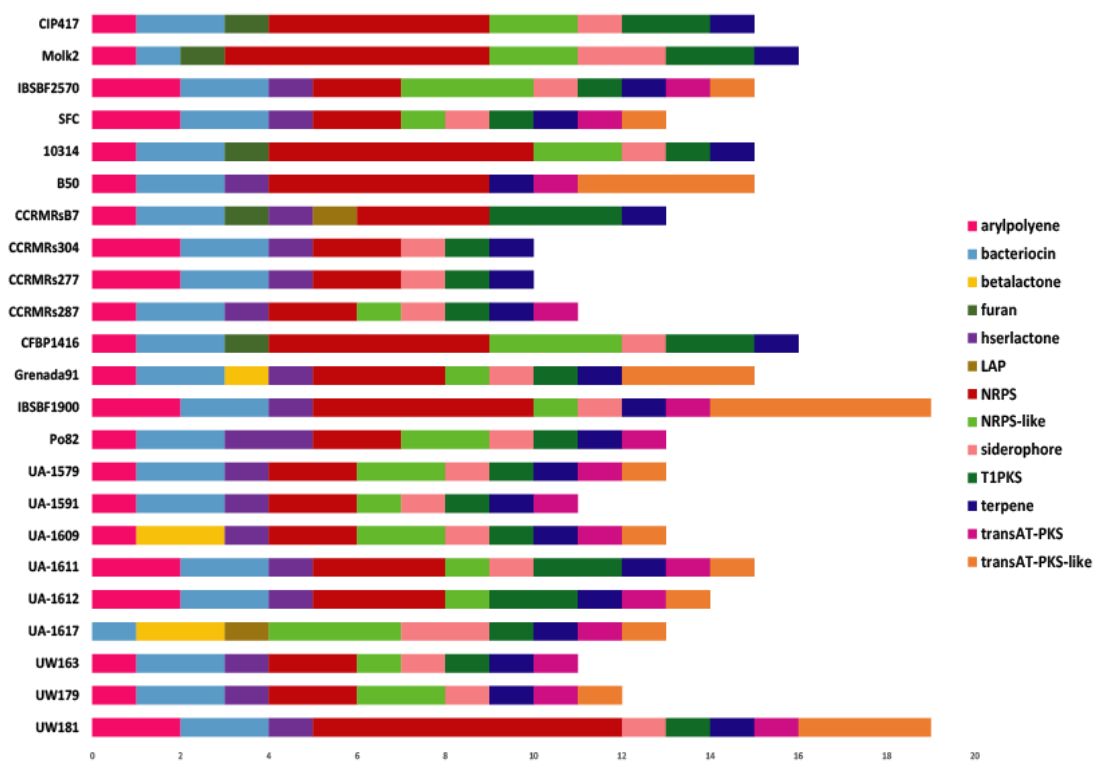
**Figura 5.** Esquema de presença e ausência das proteínas estruturais do sistema de secreção tipo III (SST3) dos genomas de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas. Na coluna: genes para codificação das proteínas estruturais do SST3. Na linha: isolados do ecótipo Moko (CIP417 e Molk2 - Bugtok; IBSBF2570 e SFC - síndrome Sergipe; e demais isolados - Moko com sintomas típicos de. Cor azul para presença e cor rosa para ausência. Na representação esquemática foram excluídos genes presentes em todos os representantes analisados.



**Figura 6.** Distribuição das classes de genes codificadores de CAZy (Cazymes) entre as variantes sintomatológicas de Moko (A) e os genomas (B) do ecótipo Moko de *Ralstonia solanacearum*. As classes de domínio estão assim representadas: atividade auxiliar (AA) em azul, módulo de ligação de carboidrato (CBM) em laranja, esterase de carboidrato (CE) em cinza, glicosídeo hidrolases (GH) em amarelo, glicosil transferase (GT) em roxo e polissacarídeo liase (PL) em verde. Isolados do ecótipo Moko: (CIP417 e Molk2 - Bugtok; IBSBF2570 e SFC - síndrome Sergipe; outros isolados - sintomas típicos de Moko).



**Figura 7.** Esquema de presença e ausência dos efetores secretados pelo sistema de secreção tipo III (SST3) dos genomas de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas. Isolados do ecótipo Moko: CIP417 e Molk2 - Bugtok; IBSBF2570 e SFC - síndrome Sergipe; demais isolados - sintomas típicos de Moko. Na coluna: Efetores anotados pela plataforma online RalstoT3. Na linha: Representantes do ecótipo Moko e suas variantes. Na representação esquemática foram excluídos efetores presentes/ausentes em todos os representantes analisados.



**Figura 8.** Distribuição de *clusters* de genes preditos biosintéticos putativos (BGCs) para metabólitos secundários anotados pela plataforma online antiSMASH em genomas de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas. Isolados do ecótipo Moko: CIP417 e Mok2 - Bugtok, IBSBF2570 e SFC - síndrome Sergipe; demais isolados - sintomas típicos de Moko.

**Figura 1 Suplementar.** Heatmap gerado da matriz de hibridação DNA-DNA *in silico* (isDDH; triângulo superior) e identidade média de nucleotídeos obtido por alinhamento global MUMmer – algoritmo ANIm calculado por pyani (triângulo inferior) de genomas de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko e suas variantes sintomatológicas. Isolados do ecótipo Moko: CIP417 e Molk2 - Bugtok; IBSBF2570 e SFC - síndrome Sergipe; demais isolados - sintomas típicos de Moko. Triângulo superior dados de DDHs e triângulo inferior ANIm.

	CIP417	CFBP1416	Molk2	10314	CCRMRsB7	UA-1579	Po82	CCRMRs287	UA-1617	UA-1591	UA-1609	UW179	UW163	CCRMRs277	CCRMRs304	IBSBF1900	B50	Grenada91	UW181	UA-1612	UA-1611	SFC	IBSBF2570
Phyloptype IIB(1)	99.80 99.70 99.70 86.40	78.20 77.40 77.60 77.60 77.60 78.30 77.80 77.30 67.70 67.70 67.20 67.20 68.20 68.10 68.60 68.30 67.80 68.10	CIP417																				
	99.98 99.60 99.50 86.10	78.10 77.10 77.30 77.30 77.20 78.00 77.50 77.00 67.40 67.40 67.00 66.90 68.00 67.90 68.40 68.10 67.50 67.80	CFBP1416																				
	99.96 99.95 99.50 85.80	77.80 77.00 77.20 77.20 77.20 77.80 77.40 76.90 67.30 67.20 66.90 66.80 67.70 67.70 68.10 67.80 67.40 67.60	Molk2																				
	99.94 99.94 99.92 85.80	77.90 77.10 77.30 77.30 77.20 77.90 77.40 77.00 67.40 67.30 66.90 66.80 67.70 67.70 68.10 67.90 67.40 67.60	10314																				
	98.55 98.55 98.51 98.51	77.50 76.70 76.70 76.70 76.70 77.50 76.80 76.60 68.40 68.40 68.00 67.90 68.30 68.10 68.50 68.20 68.10 68.50	CCRMRsB7																				
Phyloptype IIB(2)	97.58 97.57 97.55 97.54 97.52	95.40 95.70 95.70 100.00 95.80 95.40	UA-1579																				
	97.53 97.52 97.49 97.49 97.45	99.53 99.40 98.50 97.70 95.30 99.90 99.20	Po82																				
	97.53 97.52 97.50 97.49 97.44	99.52 99.92 99.40 99.40 95.70 99.40 99.90	CCRMRs287																				
	97.54 97.53 97.50 97.50 97.45	99.54 100.00 99.93 99.90 95.60 99.90 99.20	UA-1617																				
	97.54 97.53 97.50 97.50 97.45	99.54 99.99 99.93 99.99 95.70 99.90 98.50	UA-1591																				
Phyloptype IIA(1)	97.58 97.57 97.54 97.54 97.52	99.99 99.52 99.52 99.53 99.54 95.70 95.40	UA-1609																				
	97.55 97.54 97.51 97.51 97.47	99.54 99.98 99.92 99.98 99.98 99.54 99.20	UW179																				
	97.53 97.51 97.48 97.48 97.43	99.52 99.92 99.99 99.92 99.92 99.51 99.92	UW163																				
	96.27 96.26 96.24 96.24 96.41	96.16 96.19 96.19 96.20 96.20 96.17 96.20 96.18 99.90 99.50 99.50	CCRMRs277																				
	96.27 96.25 96.23 96.23 96.41	96.16 96.18 96.18 96.18 96.19 96.16 96.19 96.17 99.99 99.50 99.40	CCRMRs304																				
Phyloptype IIA(2)	96.25 96.24 96.21 96.21 96.37	96.11 96.15 96.15 96.16 96.16 96.11 96.17 96.14 99.97 99.97 99.90	IBSBF1900																				
	96.24 96.23 96.20 96.20 96.37	96.10 96.15 96.15 96.16 96.16 96.11 96.17 96.14 99.97 99.97 99.97	B50																				
	96.31 96.31 96.29 96.27 96.38	96.12 96.11 96.11 96.12 96.12 96.14 96.12 99.04 99.03 99.02 99.01 99.70 99.70 99.70 91.70 91.70	Grenada91																				
	96.31 96.31 96.28 96.27 96.35	96.11 96.10 96.11 96.11 96.11 96.11 96.13 96.12 99.02 99.02 99.01 99.01 99.98 99.70 99.70 91.60 91.60	UW181																				
	96.33 96.33 96.29 96.29 96.37	96.14 96.13 96.13 96.14 96.14 96.14 96.17 96.13 99.03 99.03 99.02 99.01 99.98 99.98 99.80 91.90 91.90	UA-1612																				
Phyloptype IIA(2)	96.32 96.32 96.29 96.28 96.36	96.13 96.13 96.14 96.14 96.14 96.13 96.16 96.14 99.04 99.04 99.02 99.01 99.98 99.97 99.98 91.60 91.70	UA-1611																				
	96.30 96.29 96.26 96.27 96.32	96.12 96.11 96.13 96.13 96.12 96.12 96.15 96.14 98.89 98.88 98.90 98.86 99.10 99.08 99.11 99.09 99.90	SFC																				
	96.32 96.31 96.29 96.29 96.36	96.13 96.14 96.16 96.16 96.15 96.14 96.17 96.15 98.91 98.90 98.91 98.86 99.11 99.09 99.11 99.09 100.00	IBSBF2570																				



## **CONCLUSÕES GERAIS**

---

## CONCLUSÕES GERAIS

- O sequenciamento de quatro novos genomas de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* ecótipo Moko das sequevares IIA-24, IIB-4 e IIB-25, oriundos de bananeiras no estado do Amazonas, disponibilizou informação necessária para suportar análises que visam caracterizar a diversidade desse grupo;
- O CCRMRsB7 foi o primeiro genoma sequenciado de *R. solanacearum* ecótipo Moko da sequevar IIB-25 no mundo;
- Os genomas dos isolados CCRMRs287 (sequevar IIB-4) e CCRMRsB7 (sequevar IIB-25) possuem características intrínsecas que precisam ser estudadas por outras abordagens;
- Isolados de *R. solanacearum* ecótipo Moko que induzem sintomas distintos em bananeiras (sintomas típicos de Moko, Bugtok e síndrome Sergipe) consistem em um grupo de patógenos com alta similaridade genômica e com 21,3% de regiões herdáveis;
- Os representantes de síndrome Sergipe possuem o maior número de *clusters* homólogos exclusivos;
- As variantes sintomatológicas de Bugtok e síndrome Sergipe possuem o mesmo arsenal para codificação das enzimas degradadoras de parede celular;
- A sintomatologia semelhante entre Bugtok e síndrome Sergipe não foi relacionada à similaridade genômica, fatores de virulência, metabólitos secundários ou filogenômica.