



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

ADAPTABILIDADE COMPARATIVA DE *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* EM SOLANÁCEAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Pedro Henrique Rodrigues da Silva

Recife-PE

2020

PEDRO HENRIQUE RODRIGUES DA SILVA

ADAPTABILIDADE COMPARATIVA DE *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* EM SOLANÁCEAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientadora: Prof. Dra. Elineide Barbosa de Souza

Coorientadora: Dra. Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque

Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

RECIFE-PE

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)

S586a

Silva, Pedro Henrique Rodrigues da
Adaptabilidade comparativa de *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* em solanáceas no estado de Pernambuco / Pedro Henrique Rodrigues da Silva. - 2020.
90 f. : il.

Orientadora: Elineide Barbosa de Souza.
Coorientadora: Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque.
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2020.

1. Ecologia de microrganismos. 2. Ecologia de populações. 3. Fitobacteriologia. 4. Murcha bacteriana. 5. Solanaceae.
I. Souza, Elineide Barbosa de, orient. II. Albuquerque, Greecy Mirian Rodrigues, coorient. III. Título

CDD 632

ADAPTABILIDADE COMPARATIVA DE *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* EM SOLANÁCEAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

PEDRO HENRIQUE RODRIGUES DA SILVA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 17/02/2020.

ORIENTADORA:

Prof. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Adriano Marcio Freire Silva (UFAL)

Prof. Dr. Jonas Alberto Rios (UFRPE)

**RECIFE - PE
FEVEREIRO – 2020**

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

À minha família, por ser minha fortaleza, por todo amor, apoio e incentivo, em especial aos meus pais Severino Ramos, Raimunda Rodrigues e a minha irmã Rayane Rodrigues.

DEDICO

*Aos amigos por estarem sempre ao meu lado,
pela torcida e por serem meu apoio em todos os momentos*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela estrutura cedida para estudos, pesquisas e demais atividades, e a Coordenação de Apoio e Pesquisa (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE, por tanto aprendizado, compreensão e amizade.

À professora Elineide Barbosa de Souza, pela inspiração, pelo amor e dedicação ao que faz, por nunca deixar o lado humano de fora de suas decisões, por toda a confiança e oportunidades que me foram dadas ao longo desses anos. Serei eternamente grato.

Aos professores do Laboratório de Fitobacteriologia, Marco Gama e Rosa Mariano, por terem sido tão boas referências de profissionais e pessoas.

À Dra. Greecy Mirian, por tanta dedicação na minha coorientação, por ser uma inspiração e exemplo de bondade, amizade e competência.

Ao Dr. Adriano Marcio, pela sua enorme disposição em ensinar e pela generosidade em ter compartilhado comigo tanto conhecimento.

Aos amigos, Victória Liberal, Marcelo Henrique e ao meu irmão Leandro Santos, vocês foram indispensáveis para realização deste trabalho, grande parte dele devo a vocês.

Aos meus grandes amigos, Adriele, Arlison, Aryma, Carmem Lúcia, Isamor, Letícia, Ludmila, Rodolfo, Rossana e Vinícius, por tornarem a vida leve e boa de ser vivida.

Aos amigos que fiz no LAFIBAC, Alba, Bia, Dulce, Bárbara, Velez, Marcelle, Bruno, Lucas N., Lucas C., Lucas L., Rayanne, Roberto, Joelly, Marcos, Edilaine, Emanuel, Kátia, Alessandra, Wal, Joelma, Alexandre, Jéssica e Carla por tanta troca ao longo dos anos, pela amizade e ensinamentos.

Aos laboratórios de micologia, fungos de solos e patologia de insetos por disponibilizarem seus equipamentos para a realização dos experimentos e aos companheiros que se dispuseram em me ajudar, Grazi, Iwanne, Elizabeth, Josi e Willie.

À equipe que compõe o PPGF, Darci Martins, Romildo Angeiras, Sr. Luis Coelho, Sr. Luiz Silva e Adelmo, pelo auxílio ao longo do curso.

E ao meu inestimável William Johnson, sem você nada disso teria sido possível. Obrigado pelas horas dos dias e as noites de sono deixadas de lado para estar ao meu lado, sei que nem sempre foi fácil, mas aqui estava você, esse trabalho é tão meu quanto seu, em toda parte dele tem você, serei eternamente grato.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	6
Introdução Geral	11
1. Murcha bacteriana das solanáceas: importância, ciclo da doença e medidas de controle	11
2. Bioquímica e taxonomia de <i>Ralstonia</i> spp.	14
3. Murcha bacteriana e adaptabilidade de <i>Ralstonia</i> spp. no estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO II – Adaptabilidade comparativa de isolados de <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> e <i>R. solanacearum</i> de solanáceas no estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil	30
Resumo	31
Introdução	32
Material e Métodos	34
Isolados bacterianos, condições de cultivo e preparação de inóculo.	34
Fisiologia térmica <i>in vitro</i>	34
Efeito do pH e da salinidade no crescimento bacteriano <i>in vitro</i>	34
Utilização de fontes de carbono e sensibilidade a substâncias inibitórias	35
Formação de biofilme	36
Produção e sensibilidade a bacteriocinas interespecíficas	36
Patogenicidade a solanáceas	37
Agressividade de espécies de <i>Ralstonia</i> e componentes epidemiológicos da murcha bacteriana em tomateiro	38
Colonização em raízes e caules de tomateiro	38
Análises estatísticas	39
Resultados	40
Fisiologia térmica <i>in vitro</i>	40
Efeito do pH no crescimento bacteriano <i>in vitro</i>	41
Efeito da salinidade no crescimento bacteriano <i>in vitro</i>	42
Perfil de utilização de fontes de carbono e sensibilidade a substâncias inibitórias	42
Formação de biofilme	44
Produção e sensibilidade a bacteriocinas interespecíficas	44

Patogenicidade a solanáceas	45
Agressividade de espécies de <i>Ralstonia</i> e componentes epidemiológicos da murcha bacteriana em tomateiro	45
Colonização em raízes e caules de tomateiro	45
Discussão	46
Agradecimentos	54
Referências Bibliográficas	55
Material Suplementar	80
CONCLUSÕES GERAIS	89

RESUMO GERAL

No estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil, a murcha bacteriana causada por *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rpsol*) (filotipo I) e *R. solanacearum* (*Rsol*) (filotipo II) dificulta o cultivo de solanáceas em municípios de todas as mesorregiões do estado, apresentando emergente prevalência de *Rpsol* nos campos de produção de algumas mesorregiões. Para esclarecer as condições adaptativas das duas espécies, o objetivo deste estudo foi comparar isolados de *Rpsol* e *Rsol* representativos da população presente no estado de Pernambuco, sob diferentes condições fisiológicas, bioquímicas, ecológicas e patogênicas, a fim de determinar possíveis vantagens adaptativas dessas espécies. Isolados de *Rpsol* utilizaram uma maior variedade de fontes de carbono e possuíram maior espectro de resistência a substâncias inibitórias, além de terem sido mais competentes a infectarem diferentes hospedeiros de solanáceas, apresentando um processo infectivo em raízes e caules de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) mais rápido que isolados de *Rsol*. Por outro lado, isolados de *Rsol* foram considerados mais aptos a se adaptarem a uma faixa maior de temperatura, pH e salinidade, além de terem mostrado maior habilidade para formação de biofilme e produção de bacteriocinas. Com base nos resultados, concluímos que a população estudada de *Rpsol* possuiu maior adaptabilidade patogênica e bioquímica enquanto a de *Rsol* maior adaptabilidade fisiológica e ecológica, e que por apresentarem vantagens adaptativas distintas, no momento não existem indícios de que uma espécie possa declinar ou extinguir a população da outra no estado de Pernambuco.

Palavras-chave: ecologia de microrganismos, ecologia de populações, fitobacteriologia, murcha bacteriana, Solanaceae.

GENERAL ABSTRACT

In the state of Pernambuco, Northeastern Brazil, bacterial wilt caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rpsol*) (phylotype I) and *R. solanacearum* (*Rsol*) (phylotype II) can hinder the solanaceae cultivation in municipalities in all the mesoregions of the state, presenting emerging prevalence of *Rpsol* in the production fields of some mesoregions. To elucidate the adaptive conditions of the two species, the aim of this study was to compare representative strains of *Rpsol* and *Rsol* of the population present in Pernambuco, under different physiological, biochemical, ecological and pathogenic conditions, in order to determine possible adaptive advantages of these species. The *Rpsol* strains used a greater variety of carbon sources and had a greater spectrum of resistance to inhibitory substances, in addition to being more competent to infect different solanaceous hosts, presenting a faster invasion and colonization process in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) roots and stems than strains from *Rsol*. On the other hand, *Rsol* strains were considered more apt to adapt to a wider range of temperature, pH and salinity, in addition to showing greater ability for biofilm formation and bacteriocin production. Based on our results, we conclude that the studied population of *Rpsol* had greater pathogenic and biochemical adaptability while *Rsol* population had greater physiological and ecological adaptability, and that because of their distinctive adaptive advantages, at the moment there is no evidence that one species may decline or extinguish the population of another one in Pernambuco state.

Keywords: bacterial wilt, microbial ecology, plant bacteriology, population ecology, Solanaceae.

Capítulo I
Introdução Geral

ADAPTABILIDADE COMPARATIVA DE *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* EM SOLANÁCEAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

INTRODUÇÃO GERAL

1. Murcha bacteriana das solanáceas: importância, ciclo da doença e medidas de controle

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia* spp. é considerada uma das doenças mais destrutivas na agricultura mundial, devido principalmente à ampla distribuição geográfica, difícil controle e vasta gama de hospedeiros, que reforçam a grande importância desta doença (GENIN; DENNY, 2012). Dentre as mais de 450 espécies de plantas hospedeiras afetadas, distribuídas em mais de 54 famílias botânicas (PRIOR *et al.*, 2016), encontram-se membros de grande importância econômica da família Solanaceae, como tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), batateira (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) (LOPES; ROSSATO, 2018).

Os primeiros relatos da murcha bacteriana no Brasil foram registrados em 1922 por Von Parseval, em plantas de fumo (*Nicotiniana tabacum* L.) no município de Santa Cruz, no Rio Grande do Sul (LOPES; ROSSATO, 2018). A murcha bacteriana das solanáceas ocorre em todas as regiões do Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste e em áreas com temperatura e umidade elevadas em outras regiões (LOPES, 2015), sendo atribuída a isolados das espécies *R. pseudosolanacearum* Safni *et al.* e *R. solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* emend. Safni *et al.* 2014 (SANTIAGO *et al.*, 2017). A doença é considerada um fator limitante ao cultivo de solanáceas podendo resultar em perdas de até 100% da produção, além de condenar os campos para plantios futuros, devido principalmente à capacidade de sobrevivência de *Ralstonia* spp. em solo por longos períodos (LOPES; DUVAL, 2007).

Por se tratar de um patógeno habitante do solo, o processo de infecção de *Ralstonia* spp. no hospedeiro inicia quando a bactéria ainda presente no solo detecta exsudatos radiculares que estimulam sua locomoção em direção às raízes, por onde penetram através de ferimentos de natureza mecânica ou natural decorrentes da emergência de raízes laterais. Pili e lipopolissacarídeos (LPS) auxiliam no processo de adesão às superfícies radiculares e na colonização nas zonas de alongamento da raiz

(ALVAREZ; BIOSCA; LÓPEZ, 2010). Em pouco tempo a bactéria invade os espaços intercelulares do córtex da raiz e em até três dias, além de colonizá-los inteiramente, também coloniza o parênquima vascular, onde se multiplica e é transportada pelos vasos do xilema para todas as partes da planta, juntamente com a água e os nutrientes (ALVAREZ; BIOSCA; LÓPEZ, 2010; LIU *et al.*, 2005; SAILE *et al.*, 1997). Em decorrência da colonização sistêmica dos vasos do xilema, o fluxo de seiva pode ser parcial ou totalmente bloqueado, impedindo que água e nutrientes absorvidos pelo sistema radicular supram a parte aérea da planta. Isto ocorre principalmente pela produção de exopolissacarídeo (EPS), considerado o principal fator de patogenicidade deste patógeno. A murcha observada é resultante do desequilíbrio hídrico causado pela obstrução dos vasos e a formação de tiloses pela planta em resposta à colonização pela bactéria (HIKICHI *et al.*, 2007).

A expressão dos sintomas da doença varia de acordo com a suscetibilidade do hospedeiro, virulência do isolado, condições edafoclimáticas e práticas culturais (ELPHINSTONE, 2005). A doença pode ocorrer em qualquer estágio fenológico da planta, sendo o de formação do primeiro cacho de frutos o mais suscetível à doença na cultura do tomateiro (LOPES, 2009). Normalmente a murcha inicia pelas folhas mais velhas e progride para as mais novas sem provocar alteração na coloração das folhas. Com o progresso da doença, os tecidos do caule e do ponteiro se tornam flácidos até os sintomas evoluírem para uma murcha permanente, com seca das folhas, caules, ramos e finalmente, a morte da planta (INOUE-NAGATA *et al.*, 2018). Os sintomas no campo são comumente observados em reboleiras que ficam localizadas nas partes mais baixas e úmidas das áreas de plantio (LOPES, 2009).

Outros sintomas que a planta pode apresentar em decorrência da doença são raquitismo, amarelecimento, epinastia foliar e crescimento de raízes adventícias em caules e ramos, resultantes do desequilíbrio hormonal de auxina e etileno (BUDDENHAGEN; KELMAN, 1964). Também é comum a observação da descoloração do xilema após a realização de um corte transversal ou longitudinal do caule da planta doente, principalmente na parte basal. O escurecimento dos vasos é resultante do transporte de substâncias decorrentes da oxidação de fenóis que dá origem à melanina (INOUE-NAGATA *et al.*, 2018), esse escurecimento evolui para porções da medula e do córtex até a necrose completa (KELMAN, 1953). Em ambientes de elevada umidade podem ser observados sinais do patógeno, caracterizados pela exsudação do

pus bacteriano externamente ao tecido do hospedeiro que apresentem microferimentos (INOUE-NAGATA *et al.*, 2018).

Além da produção de EPS, outros fatores de virulência e patogenicidade da bactéria são: a motilidade associada aos flagelos (KANG *et al.*, 2002; TANSKERSTEN *et al.*, 2004); a secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares que facilitam a colonização pela degradação dos tecidos vegetais, a exemplo das enzimas β -1,3-endoglucanase (egl), exoglucanase (ChbA), endopoligalacturonases (PehA e PglA), exopoligalacturonases (PehB e PehC) e pectinmetilesterase (Pme) (LIU *et al.*, 2005; GABRIEL *et al.*, 2006) e o sistema de secreção tipo III, codificado pelos genes *hrp* (GENIN; BOUCHER, 2004), que atuam translocando um conjunto de proteínas efetoras diretamente no interior da célula hospedeira (ALFANO; COLLMER, 2004).

No campo, uma forma de diagnose da doença em plantas que apresentam sintomas de murcha bacteriana é a observação direta de sinais, verificando a presença de pus bacteriano nos tecidos infectados ou pela realização do teste do copo que consiste na observação do fluxo bacteriano de um fragmento de caule infectado em direção à água, que indica a presença da bactéria nos vasos infectados (BEDENDO *et al.*, 2018). No entanto, para um diagnóstico preciso da doença, deve-se realizar em laboratório o isolamento do patógeno em meio de cultura específico, observar as colônias características de *Ralstonia* spp. e completar os postulados de Koch (LOPES, 2009).

Após a morte da planta doente e elevação do processo de decomposição dos tecidos vegetais, as novas células bacterianas são liberadas no solo, onde podem sobreviver por anos, a partir da utilização de matéria orgânica (VAN ELSAS *et al.*, 2000) e de forma epifítica na rizosfera de plantas hospedeiras, voluntárias, não hospedeiras e invasoras (WU *et al.*, 2015). Outras formas de sobrevivência de *Ralstonia* spp. se dão por meio de infecções latentes, sobrevivência em água e restos de cultura (CARUSO *et al.*, 2005; COUTINHO, 2005; ELPHINSTONE *et al.*, 1998; HAYWARD, 1994b). A sobrevivência em sementes já foi relatada em pimenta (UMESHA; KAVITHA; SHETTY, 2005), berinjela (SHARMA; SHARMA, 2014) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (MACHMUD; MIDDLETON, 1991), sendo uma excelente forma de sobrevivência e disseminação.

Entre as formas de dispersão de *Ralstonia* spp. a curtas distâncias estão a movimentação de solo, água de irrigação e a utilização de ferramentas, máquinas e implementos agrícolas contaminados (COUTINHO, 2005; HAYWARD, 1994b). A

dispersão a longas distâncias, ocorre principalmente pelo transporte de material vegetal infectado (HAYWARD, 1991). Após a ocorrência da murcha bacteriana em uma área, o controle torna-se bastante difícil, uma vez que medidas isoladas não surtem efeitos esperados, devendo-se adotar um conjunto de medidas em um programa de manejo integrado, principalmente de natureza preventiva (LOPES, 2009).

Dentre as medidas de controle recomendadas, as de caráter preventivo são as mais adequadas, das quais destacam-se: o manejo da água do solo, evitando encharcamento; evitar ferimentos nas raízes, por nematoides, insetos ou implementos agrícolas; evitar movimentação de áreas com focos da doença para outras áreas; eliminar plantas infectadas e invasoras da família Solanaceae; fazer rotação de culturas com gramíneas por no mínimo um ano; enxertia em porta enxertos resistentes e o uso de cultivares resistentes (LOPES; MENDONÇA, 2014; LOPES; QUEZADO SOARES, 2001). Para o cultivo de tomateiro, entre as variedades comerciais para porta-enxerto, estão os híbridos Magnet (Sakata®), Guardiã e Muralha (Takii®), que apresentam resistência à murcha bacteriana, sendo recomendados para uso em locais sem a presença de isolados de *Ralstonia* spp. altamente virulentos (LOPES; BOITEUX; ESCHEMBACH, 2015). Contudo, a fonte de resistência mundial mais estável é a cultivar Hawaii 7996 (LEBEAU et al., 2011), embora a resistência já tenha sido suplantada por alguns isolados de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* (HAI et al., 2008; LOPES; BOITEUX; ESCHEMBACH, 2015; WICKER et al., 2007).

2. Bioquímica e taxonomia de *Ralstonia* spp.

O gênero *Ralstonia* pertence ao reino Procariotae, domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, classe β -Proteobacteria, ordem Burkholderiales e família Ralstoniaceae (GENIN; BOUCHER, 2004; KADO, 2010; KERSTERS et al., 1996; LUDWIG et al., 1995). São bactérias aeróbicas estritas, Gram-negativas, apresentam forma de bastonete reto ou levemente curvo, com aproximadamente 0,5-0,7 x 1,5-2,5 μm de dimensão, não esporogênicas, apresentam um ou vários flagelos polares e isolados avirulentos normalmente são lofotríquios. Não produzem pigmentos fluorescentes, mas em meio de cultura contendo tirosina, alguns isolados produzem pigmentos marrons (HORITA et al., 2005; WILLIAMSON et al., 2002).

Entre as principais características bioquímicas do gênero estão a frequente redução de nitrato a nitrito com produção de gás (denitrificação), testes de oxidase e

catalase positivos, negativo para dihidrolase de arginina, liquefação de gelatina e hidrólise de amido. Não utilizam arginina ou betaína como fonte de carbono. Não formam levana a partir de sacarose e acumulam poli- β -hidroxibutirato (PHB) como fonte de carbono (EU, 1998), apresentam leve tolerância a sais e bom crescimento em temperaturas entre 25 e 35 °C apresentando nenhum ou pouco crescimento a 40 °C (MEHAN *et al.*, 1994).

Quando cultivados em meio de cultura, isolados virulentos de *Ralstonia* spp. apresentam colônias de coloração branca, retas, irregulares e fluídas em função da produção de EPS, enquanto os isolados avirulentos desenvolvem colônias pequenas, circulares e não fluídas de coloração branco-creme. Em meios diferenciais contendo cloreto de trifeniltetrazólio as colônias virulentas adquirem a coloração branca com centro róseo (EU, 2006; KELMAN, 1954).

O agente etiológico da murcha bacteriana foi classificado inicialmente por Erwin F. Smith em 1986 como *Bacillus solanacearum* Smith, após ter realizado o isolamento da bactéria de plantas de tomateiro infectadas, provenientes de Ocean Springs, Mississippi (SMITH, 1986). Alguns anos depois, em 1914, foi reclassificada como *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, e posteriormente considerada na lista de Bergey *et al.* como *Phytomonas solanacearum* (Smith) Bergey *et al.* (BERGEY, 1923). Em 1992 Yabuuchi *et al.* propuseram o novo gênero *Burkholderia*, que englobou sete espécies do gênero *Pseudomonas*, entre elas *P. solanacearum* que passou a se chamar *Burkholderia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (YABUUCHI *et al.*, 1992). Essa mudança não durou muito tempo, em 1995, por meio de análises moleculares de sequências da região 16S rRNA e por análises quimiotaxonômicas, a bactéria passou a ser classificada como *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (YABUUCHI *et al.*, 1996).

Devido à grande variabilidade infraespecífica, *R. solanacearum* foi considerada um complexo de espécies (FEGAN; PRIOR, 2005), o qual é definido como um grupo de isolados relacionados cujos membros individuais podem representar mais de uma espécie. Dentro deste complexo também estavam incluídas as espécies *Ralstonia syzigii* (Roberts *et al.*) Vaneechoutte *et al.*, agente causal da “doença de Sumatra do cravo da Índia” de ocorrência em Java e Sumatra, e ‘Blood disease bacterium’ (BDB) que ocorre na Indonésia (FEGAN; PRIOR, 2005), até o momento, sem relatos no Brasil (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; SILVA, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2017).

O complexo *R. solanacearum* apresentava uma alta diversidade de fenótipos e genótipos e compreendia uma alta variedade de isolados que diferiam em aspectos relacionados à agressividade, sobrevivência e latência (FEGAN; PRIOR, 2005; JAUNET; WANG, 1999). Na tentativa de caracterizar esta diversidade, a bactéria foi classificada anteriormente em nível infraespecífico em cinco raças patogênicas, de acordo com a gama de hospedeiros (BUDDENHAGEN *et al.*, 1962; HE *et al.* 1983) e em seis biovars, em virtude das propriedades bioquímicas (HAYWARD, 1964; HAYWARD, 1994a). Na classificação de raças, a raça 1 afeta o maior número de espécies hospedeiras incluindo solanáceas tais como tomate, batata, fumo, berinjela, pimentão e algumas plantas de outras famílias botânicas, como algumas bananas diplóides (*Musa spp.*), amendoim, oliveira (*Olea europaea* L.), entre outras; a raça 2 é patogênica às bananas triplóides e heliconiáceas (*Heliconia spp.*) (HAYWARD, 1994b); a raça 3 é considerada específica da batata e ocasionalmente tomate (BUDDENHAGEN *et al.*, 1962); a raça 4 foi relatada causando doença em gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) e a raça 5 reportada em amoreira (*Rubus sp.*) (HAYWARD, 1994b). A classificação em biovars é definida através da utilização e/ou oxidação de dissacarídeos (celobiose, lactose e maltose) e álcoois (dulcitol, manitol e sorbitol) (HAYWARD, 1964; HE *et al.*, 1983). O sistema se ampliou para incluir outros substratos, determinando a existência de seis biovars, sendo eles os biovars 1, 2-A, 2-T, 3, 4 e 5 (HAYWARD, 1994a).

Posteriormente o complexo foi subdividido em um sistema hierárquico de classificação, constituído de quatro filotipos, correlacionados à origem geográfica dos isolados, 61 sequevars baseados em análises genotípicas (ALBUQUERQUE, 2017; LI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2017; SANTIAGO *et al.*, 2017), clones (FEGAN; PRIOR, 2005) e oito clados (WICKER *et al.*, 2012). A classificação em filotipos se baseia na variação de tamanho de amplicons gerados da sequência ITS (*intergenic transcribed spacer*) do cromossomo entre os genes de RNA ribossomal 16S e 23S (FEGAN; PRIOR, 2005), essas análises foram posteriormente validadas por hibridização genômica comparativa (GUIDOT *et al.*, 2007). Os filotipos estão correlacionados a origem geográfica dos isolados, de modo que o filotipo I agrupa isolados da Ásia e Austrália, e compreende os biovars 3, 4 e 5; o filotipo II (IIA e IIB) inclui isolados das Américas e pertencem aos biovars 1, 2-A e 2-T; o filotipo III corresponde aos isolados

da África e ilhas vizinhas, e aos biovares 1 e 2-T; e o filotipo IV agrupa os isolados da Indonésia e Japão e aos biovares 1, 2-A e 2-T, além de isolados de *R. syzygii* e BDB.

Em cada filotipo estão várias sequevares, que são definidas como grupos de isolados que apresentam uma sequência altamente conservada dentro de uma determinada região do genoma, neste caso, definidas com base em sequências parciais do gene da endoglucanase (*egl*) e/ou de reparo do DNA (*mutS*), não podendo apresentar divergências nucleotídicas superiores a 1% (FEGAN; PRIOR, 2005). Os filotipos podem ser identificados por meio de Filotipo Multiplex PCR, uma variação da PCR que permite a amplificação simultânea de diferentes sequências pela utilização de múltiplos *primers* por reação, com *primers* da série Nmult. Por sua vez, cada sequevar pode compreender diferentes linhas clonais identificadas mediante técnicas de marcadores moleculares como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) ou rep-PCR (FEGAN; PRIOR, 2005).

Os clados são específicos aos filotipos, sendo o clado 1 correspondente ao filotipo I, os clados 2 e 3 ao filotipo IIA, os clados 4 e 5 ao filotipo IIB, clado 6 ao filotipo III e os clados 7 e 8 ao filotipo IV. O clado 2 comporta isolados causadores de murcha bacteriana e Moko da bananeira (sequevares IIA-6 e IIA-24); clado 3, compreende os isolados originados do sudeste dos Estados Unidos; o clado 4 é composto pela sequevar IIB-4 de Moko e isolados emergentes IIB-4NPB; e o clado 5, contém isolados que causam brown-root em batatateira (raça 3, biovar 2) e isolados de Moko (sequevar IIB-3) (WICKER *et al.*, 2012).

A partir de uma análise filogenética da sequência parcial do gene da endoglucanase e região ITS, e de características bioquímicas, culturais, fisiológicas e de hibridização DNA-DNA Safni *et al.* (2014) propuseram a reclassificação taxonômica do complexo *R. solanacearum* em três genoespécies independentes. As espécies continuaram relacionadas aos seus filotipos, de modo que *Ralstonia pseudosolanacearum* Safni *et al.* englobou os isolados pertencentes aos filotipos I e III; *R. solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* emend. Safni *et al.* consistiu dos isolados do filotipo II (IIA e IIB), que pode corresponder a duas subespécies ainda não determinadas; os isolados do filotipo IV foram reclassificados em três subespécies de *R. syzygii* (Roberts *et al.*) Vaneechoutte *et al.* emend. Safni *et al.*, em que *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* Safni *et al.* agrupou isolados de *Ralstonia* causadores de murcha, *R. syzygii* subsp. *syzygii* Safni *et al.* agrupou os isolados anteriormente denominados de *R.*

syzigii associados à doença de Sumatra do cravo da Índia, e *R. syzigii* subsp. *celebesensis* Safni *et al.* que incluiu isolados de “Blood disease bacterium” (SAFNI *et al.*, 2014). Baseados em análises de genômica comparativa, hibridização genômica comparativa, proteômica e características metabólicas, Remenant *et al.* (2010), Prior *et al.* (2016) e Zhang e Qiu (2016) também suportaram a divisão do complexo em três espécies com subespécies.

3. Murcha bacteriana e adaptabilidade de *Ralstonia* spp. no estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil

Os primeiros relatos da murcha bacteriana em Pernambuco ocorreram em 1987, em plantas de pimentão na mesorregião da Mata (MARIANO; CABRAL; SILVA, 1988), mas acredita-se que a sua ocorrência seja anterior a esta data (MARIANO *et al.*, 1989). A doença é causada por isolados de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum*, nas mesorregiões Agreste, Mata (GARCIA *et al.*, 2013; SILVA, 2014) São Francisco e Sertão (ALBUQUERQUE, 2017), dificultando o cultivo de solanáceas em todas as mesorregiões do estado.

A diversidade genética de *Ralstonia* spp. no estado de Pernambuco tem sido considerada elevada, das 14 sequevares que ocorrem em solanáceas no Brasil (I-17, I-18, I-31, IIA-41, IIA-50, IIA-58, IIA-59, IIB-2, IIB-25, IIB-28, IIB-54, IIB-55, IIB-56 e IIB-57) (ALBUQUERQUE, 2017; RODRIGUES *et al.* 2012; SANTIAGO *et al.* 2017; SILVA, 2014), cinco sequevares estão presentes em Pernambuco (I-17 e I-18 de *R. pseudosolanacearum* e IIA-50, IIA-58 e IIA-59 de *R. solanacearum*) (ALBUQUERQUE, 2017; SILVA, 2014), sendo a sequevar IIA-58 endêmica do clima semiárido, exclusiva de Pernambuco (ALBUQUERQUE, 2017). A diversidade fenotípica e epidemiológica também é elevada. Silveira *et al.* (1998) ao realizarem estudos de caracterização bioquímica e epidemiológica nos tomateiros do município de Camocim de São Félix (PE), verificaram a predominância da biovar 3 (78%) sobre a biovar 1 (22%) e identificaram cinco grupos de similaridade em uma população de 28 isolados de acordo com variáveis como índice de murcha, período de incubação e período latente (PL50).

Em estudos que avaliaram as populações de *Ralstonia* spp. em solanáceas das mesorregiões Agreste e Mata do estado de Pernambuco, Silva (2014) detectou maior prevalência de isolados de *R. pseudosolanacearum* filotipo I (91,7%) em comparação a

R. solanacearum filotipo II (8,7%), que apresentaram alta diversidade fenotípica. Estudos de prevalência realizados na região semiárida de Pernambuco, que inclui as mesorregiões Agreste, São Francisco e Sertão, revelaram que *R. pseudosolanacearum* (Filotipo I, biovar 3) prevaleceu no Agreste (78,6%) e *R. solanacearum* (Filotipo II, biovar 1) nas mesorregiões São Francisco (67,8%) e Sertão (71,4%) (ALBUQUERQUE, 2017). A partir destes estudos foi constatado que, na população mencionada, *R. pseudosolanacearum* apresentou baixa variabilidade genética enquanto *R. solanacearum* alta variabilidade (ALBUQUERQUE, 2017; SILVA, 2014).

A maior prevalência e variabilidade genética de *R. solanacearum* está relacionada ao fato do Brasil ser considerado seu centro de origem e diversidade (SANTIAGO *et al.* 2017; WICKER *et al.*, 2012), enquanto *R. pseudosolanacearum* (Filotipo I) são isolados recentemente introduzidos no país (GARCIA *et al.*, 2013). No entanto, a maior prevalência de *R. pseudosolanacearum* no Agreste indica um emergente estabelecimento da bactéria na região semiárida de Pernambuco. Essa prevalência tem sido explicada pelo fato de isolados do filotipo I competirem mais efetivamente com isolados de outros filotipos em determinado habitat. Tendo origem asiática, o filotipo I se disseminou rapidamente para outros continentes por meio de materiais vegetais infectados (WICKER *et al.*, 2007), sendo observados na África, Américas Central e Sul e Oceania, evidenciando uma grande aptidão para se estabelecer em condições tropicais (BUDDENHAGEN, 1986; ELPHINSTONE, 2005).

Isolados do filotipo I, atualmente classificados como *R. pseudosolanacearum*, são descritos na literatura como de grande versatilidade química sendo capazes de consumir uma ampla gama de compostos orgânicos (HAYWARD, 1994a; SILVA, 2014), ampla gama de hospedeiros (HAYWARD, 1994b; WICKER *et al.*, 2012), alta capacidade de recombinação (COUPAT *et al.*, 2008), ampla habilidade de disseminação e grande plasticidade de virulência (WICKER *et al.*, 2012), fatores que favorecem a colonização e estabelecimento no ambiente. No entanto, inexistem estudos a nível mundial que comparem isolados de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* visando determinar se as espécies possuem as mesmas habilidades adaptativas.

A adaptabilidade biológica de um fitopatógeno é descrita como a habilidade competitiva de um organismo para persistir em um ambiente por um longo período, comparado a outros indivíduos sob as mesmas condições, sendo, portanto, um conceito comparativo (NELSON, 1979). Essa aptidão está relacionada à capacidade de se

estabelecer, se desenvolver e reproduzir sob diferentes condições ambientais, aliada a suas características patogênicas, como a agressividade e eficiência na infecção (GHINI; KIMATI, 2002; LEACH *et al.*, 2001). O sucesso no estabelecimento do fitopatógeno em uma área é inicialmente determinado pela sua capacidade adaptativa a condições abióticas e posteriormente aos hospedeiros. Portanto, para uma infecção bem-sucedida, um fitopatógeno deve ser bem qualificado para todos os parâmetros fisiológicos (GHATAK, 2017).

A adaptabilidade de uma espécie é decorrente de alterações sofridas ao longo do tempo, que resultam em características vantajosas para sobreviver no ambiente (GHINI; KIMATI, 2002), sendo essas alterações influenciadas pelo ambiente e hospedeiro, alterando a condição física do patógeno (LANNOU, 2012). A capacidade dos organismos em se adaptarem a modificações do ambiente é resultado da interação de diversos fatores evolutivos e está diretamente relacionada com o nível de diversidade genética de suas populações (GUNTER *et al.*, 2000; MCDONALD; LINDE, 2002).

Sabe-se que uma espécie de fitopatógeno com maior adaptabilidade pode substituir outras espécies existentes do patógeno por exclusão competitiva, por meio de uma superior capacidade de colonização e melhor adaptação a estresses bióticos e abióticos no ambiente (BALODI *et al.*, 2017). Portanto, para um maior esclarecimento acerca das condições adaptativas de isolados representativos das populações de *Ralstonia* spp. presentes no estado de Pernambuco, nosso estudo teve por objetivo comparar isolados de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* de diferentes mesorregiões do estado, sob diferentes condições fisiológicas, bioquímicas, ecológicas e patogênicas, a fim de determinar possíveis vantagens adaptativas das espécies e avaliar se tais vantagens podem favorecer o estabelecimento de uma em detrimento da outra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, Saint Paul, v. 104, n. 11, p. 1175-1182, 2014.

ALBUQUERQUE, G. M. R. **Diversidade de *Ralstonia* spp. em Pernambuco, resistência de tomateiros silvestres à murcha bacteriana e expressão gênica na quebra de resistência.** 2017, 119 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017.

ALBUQUERQUE, G. M. R.; SILVA, A. M. F.; SILVA, J. R.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* on *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 11, p. 2319, 2016.

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

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

BEDENDO, I. P. Murchas vasculares. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. v. 1, p. 333-338.

INOUE-NAGATA, A. K.; LOPES, C. A.; REIS, A.; PEREIRA, E. B.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; PINHEIRO, J. B.; LIMA, M. F. Doenças do tomateiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 1, p. 697-731.

BALODI, R.; GHATAK, L. V.; BISHT, S.; SHUKLA, N. Reproductive fitness of fungal phytopathogens: deriving co-evolution of host-pathogen systems. In: GHATAK, A.; ANSAR, M. (eds.). **The phytopathogen: evolution and adaptation**. New Jersey: Apple Academic Press, 2017. p. 41-64.

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

BUDDENHAGEN, I. W. Bacterial wilt revisited. In: PERSLEY, G.J (ed.) **Bacterial wilt disease in Asia and the pacific**. Canberra: ACIAR, 1986. v. 1, p. 126-143.

BUDDENHAGEN, I. W.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 52, n. 7, p. 726, 1962.

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

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

CARUSO, P.; PALOMO, J. L.; BERTOLINI, E.; ÁLVAREZ, B.; LÓPEZ, M. M.; BIOSCA, E. G. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a

Spanish river: Recovery of stressed cells at low temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 140-148, 2005.

COUPAT, B., CHAUMEILLE-DOLE, F., FALL, S., PRIOR, P., SIMONET, P., AND NESME, X. Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. **FEMS Microbiology Ecology**, Delft, v. 66, n. 1, p. 14-24, 2008.

COUTINHO, T. A. Introduction and prospectus on the survival of *Ralstonia solanacearum*. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. 2. ed. Saint Paul: APS Press, 2005. v. 1, p. 29-38.

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

ELPHINSTONE, J. G.; STANFORD, H. M.; STEAD D. E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers, *Solanum dulcamara*, and associated irrigation water. In: PRIOR, P.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. (eds.). **Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects**. Berlin: Springer-Verlag, 1998, p. 133-139.

EU – EUROPEAN UNION. **Commission directive 2006/63/CE**. Brussels: Official Journal of the European Union, 2006. 71 p.

EU – EUROPEAN UNION. **Council directive 98/57/CE of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum*. Annex II-test scheme for the diagnosis, detection and identification of *Ralstonia solanacearum***. Brussels: Official Journal of the European Communities, 1998. 39 p.

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.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

GABRIEL, D. W.; ALLEN, C.; SCHELL, M.; DENNY, T. P.; GREENBERG, J. T.; DUAN, Y. P.; FLORES-CRUZ, Z.; HUANG, Q.; CLIFFORD, J. M.; PRESTING, G.; GONZÁLEZ, E. T.; REDDY, J.; ELPHINSTONE, J.; SWANSON, J.; YAO, J.; MULHOLLAND, V.; LIU, L.; FARMERIE, W.; PATNAIKUNI, M.; BALOGH, B.; NORMAN, D.; ALVAREZ, A.; CASTILLO, J. A.; JONES, J.; SADDLER, G.; WALUNAS, T.; ZHUKOV, A.; MIKHAILOVA, N. Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 19, n. 1, p. 69-79, 2006.

- GARCIA, A. L.; LIMA, W. G.; SOUZA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt bell pepper in the state of Pernambuco, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 95, n. 2, p. 237-245, 2013.
- GENIN, S.; BOUCHER, C. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 107-134, 2004.
- GENIN, S.; DENNY, T. P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, p. 67-89, 2012.
- GHATAK, A. Evolution and adaptation in phytopathosystems. In: GHATAK, A.; ANSAR, M. (eds.). **The phytopathogen: evolution and adaptation**. New Jersey: Apple Academic Press, 2017. p. 4-20.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 2. ed. Jaguariúna: EMBRAPA-CPMA, 2002. 78 p.
- GUIDOT, A.; PRIOR, P.; SCHOENFELD, J.; CARRÈRE, S.; GENIN, S.; BOUCHER, C. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, p. 377-387, 2007.
- HAI, T. T. H.; ESCH, E.; WANG, E. Resistance to Taiwanese race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in wild tomato germplasm. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, n. 3, p. 471-479, 2008.
- 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. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (eds.) **Bacterial wilt -The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. 1 ed. Wallingford: CAB International, 1994a. v. 1, p. 123-135.
- HAYWARD, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.) **Bacterial wilt -The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. 1 ed. Wallingford: CAB International, 1994b. v. 1, p. 9-24.
- HAYWARD, A. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, Hoboken, v. 27, p. 265-277, 1964.
- HE, L. Y.; KELMAN, A.; SEQUEIRA, L. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 12, p. 1357-1361, 1983.
- HIKICHI, Y.; YOSHIMOCCHI, T.; TSUJIMOTO, S.; SHINOHARA, R.; NAKAHO, K.; KANDA, A.; KIBA, A.; OHNISHI, K. Global regulation of pathogenicity mechanism

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

HORITA, M.; TSUCHIYA, K.; OOSHIRO, A. Characteristics of *Ralstonia solanacearum* biovar N2 strains in Asia. **Journal of Phytopathology**, Gottinger, v. 153, p. 209-213, 2005.

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

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

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

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

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

KERSTERS, K.; LUDWIG, W.; VANCANNEYT, M.; VOS DE, P.; GILLIS, M.; SCHLEIFER, K-H. Recent changes in the classification of *Pseudomonas*: an overview. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 19, n. 4, p. 465-477, 1996.

LANNOU, C. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 319-338, 2012.

LEACH, J. E.; CRUZ, C. M. V.; BAI, J. F.; LEUNG, H. Pathogen fitness penalty as predictor of durability of disease resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 187-224, 2001.

LEBEAU, A.; DAUNAY, M-C.; FRARY, A.; PALLOIX, A.; WANG, J-F.; DINTINGER, J.; CHIROLEU, F.; WICKER, E.; PRIOR, P. Bacterial Wilt Resistance in Tomato, Pepper, and Eggplant: Genetic Resources Respond to Diverse Strains in the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, p. 154-165, 2011.

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

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

LIU, H. L.; ZHANG, S. P.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Pyramiding, unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall degrading enzymes contribute to virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, n. 12, p. 1296-1305, 2005.

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

LOPES, C. A. **Murcha Bacteriana ou Murchadeira**-Uma inimiga do tomateiro em climas quentes. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. 8 p. (Circular Técnica, 67).

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

LOPES, C. A.; MENDONÇA, J. L. **Enxertia em tomateiro para o controle da murcha-bacteriana**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2014. 8 p. (Circular Técnica, 131).

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças - diagnose e controle**. Brasília: Embrapa - CNPH, 2001. 72 p.

LOPES, C. A.; ROSSATO, M. History and Status of Selected Hosts of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex Causing Bacterial Wilt in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 1228, 2018.

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

LUDWIG, W.; ROSELLÖ-MORA, R.; AZNAR, R.; KLUGBAUER, S.; SPRING, S.; REETZ, K.; BEIMFOHR, C.; BROCKMANN, E.; KIRCHHOF, G.; DORN, S.; BACHLEITNER, M.; KLUGBAUER, N.; SPRINGER, N.; LANE, D.; NIETUPSKY, R.; WEIZENEGGER, M.; SCHLEIFER, K-H. Comparative sequence analysis of 23S rRNA from Proteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.18, n.2, p.164-188, 1995.

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

MARIANO, R. L. R.; CABRAL, G. B.; SILVA, M. S. S. G. Levantamento das fitobacterioses do Estado de Pernambuco em 1987. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 130, 1988.

MARIANO, R. L. R.; MELO, R. A. G.; HOLANDA, V. T.; CABRAL, G. B.; SILVA, M. S. S. G. Levantamento das fitobacterioses do estado de Pernambuco no biênio 1987-1988. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 158, 1989.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; OLIVEIRA, I. S.; NASCIMENTO, A. R. Diagnose e manejo de fitobacterioses de fitobacterioses de importância para o Nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (eds.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. UFRPE, Recife: Imprensa Universitária, 2001. 368 p.

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).

NELSON, R. R. The evolution of parasite fitness. In: HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. (Eds.). **Plant disease: an advanced treatise**. How pathogens induce disease. New York: Academic Press, 1979. v. 4, p. 23-46.

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.; BÉNÉDICTE, C-G.; 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. **BioMed Central Genomics**, London, v. 10, p. 1-16, 2010.

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

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

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

SANTIAGO, T. R.; LOPES, C. A.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; MIZUBUTI, E. S. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient center of diversity of the pathogen. **Plant Pathology**, Dordrecht, v. 66, n. 3, p. 383–392, 2017.

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

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

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

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

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

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 175-79, 2000.

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

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; ZIMMER, K. R.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. BAUMVOL, I. J.; MACEDO, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal Ethnopharmacology**, v. 137, p. 327-335, 2011.

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

VAN ELSAS, J. D.; KASTELEIN, P.; VAN BEKKUM, P.; VAN DER WOLF, J. M.; DE VRIES, P. M.; VAN OVERBEEK, L. S. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. **Phytopathology**, v. 90, p. 1358-1366, 2000.

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

WICKER, E.; GRASSART, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M.; PRIOR, P. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 21, p. 6790-6801, 2007.

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

WILLIAMSON, L.; NAKAHO, K.; HUDELSON, B.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 987-991, 2002.

WU, K.; YUAN, S.; XUN, G.; SHI, W.; PAN, B.; GUAN, H.; SHEN, B.; SHEN, Q. Root exudates from two tobacco cultivars affect colonization of *Ralstonia solanacearum* and the disease index. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 141, p. 667-677, 2015.

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

YABUUCHI, E.; KOSARO, Y.; OYIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.

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

ZHENG, X.; ZHU, Y.; LIU, B.; LIN, N.; ZHENG, D. Invasive properties of *Ralstonia solanacearum* virulent and avirulent strains in tomato roots. **Microbial Pathogenesis**, Amsterdam, v. 113, p. 144-151, 2017.

Capítulo II

Adaptabilidade comparativa de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* de solanáceas no estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil

1 **Adaptabilidade comparativa de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R.***
2 ***solanacearum* de solanáceas no estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil**

3

4 **Pedro Henrique Rodrigues da Silva • Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque •**
5 **Victória Liberal Barboza de Oliveira • Leandro Victor Silva dos Santos • Marcelo**
6 **Henrique Oliveira Gonçalves • Marco Aurélio Siqueira da Gama,** Departamento de
7 Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco • **Elineide Barbosa de Souza,**
8 Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom
9 Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

10

11 **Resumo**

12 No estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil, a murcha bacteriana causada por
13 *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rpsol*) (filotipo I) e *R. solanacearum* (*Rsol*) (filotipo II)
14 dificulta o cultivo de solanáceas em municípios de todas as mesorregiões do estado,
15 apresentando emergente prevalência de *Rpsol* nos campos de produção de algumas
16 mesorregiões. Para esclarecer as condições adaptativas das duas espécies, o objetivo
17 deste estudo foi comparar isolados de *Rpsol* e *Rsol* representativos da população
18 presente no estado de Pernambuco, sob diferentes condições fisiológicas, bioquímicas,
19 ecológicas e patogênicas, a fim de determinar possíveis vantagens adaptativas dessas
20 espécies. Isolados de *Rpsol* utilizaram uma maior variedade de fontes de carbono e
21 possuíram maior espectro de resistência a substâncias inibitórias, além de terem sido
22 mais competentes a infectarem diferentes hospedeiros de solanáceas, apresentando um
23 processo infectivo em raízes e caules de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) mais
24 rápido que isolados de *Rsol*. Por outro lado, isolados de *Rsol* foram considerados mais
25 aptos a se adaptarem a uma faixa maior de temperatura, pH e salinidade, além de terem
26 mostrado maior habilidade para formação de biofilme e produção de bacteriocinas. Com
27 base nos resultados, concluímos que a população estudada de *Rpsol* possuiu maior
28 adaptabilidade patogênica e bioquímica enquanto a de *Rsol* maior adaptabilidade
29 fisiológica e ecológica, e que por apresentarem vantagens adaptativas distintas, no
30 momento não existem indícios de que uma espécie possa declinar ou extinguir a
31 população da outra no estado de Pernambuco.

32 **Palavras-chave:** ecologia de microrganismos, ecologia de populações,
33 fitobacteriologia, murcha bacteriana, Solanaceae.

34 **Introdução**

35 A murcha bacteriana causada por *Ralstonia* spp. é considerada uma das doenças
36 mais destrutivas na agricultura mundial e possui importância destacada principalmente
37 em países de clima tropical e subtropical, devido às altas temperaturas e umidade do
38 solo nessas regiões (Lopes e Rossato, 2018). O difícil controle desta doença é
39 decorrente de características inerentes às espécies, como a natureza sistêmica de
40 infecção, elevada diversidade genética e fenotípica, ampla distribuição geográfica e
41 extensa gama de hospedeiros (Elphinstone, 2005; Denny, 2006; Lebeau et al., 2011).
42 Entre os hospedeiros afetados estão plantas em mais de 50 famílias de dicotiledôneas e
43 monocotiledôneas (Prior et al., 2016), sendo a doença mais destrutiva em membros de
44 grande expressão econômica da família Solanaceae, como tomateiro (*Solanum*
45 *lycopersicum* L.), batateira (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena*
46 L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) (Elphinstone, 2005; Wicker et al., 2007),
47 podendo ocasionar perdas de até 100% da produção (Lopes e Duval, 2007).

48 A murcha bacteriana foi atribuída ao complexo de espécies *R. solanacearum* que
49 baseado em relações filogenéticas foi categorizado em um sistema hierárquico de
50 classificação em espécie, filotipo, sequevar e clone (Fegan e Prior, 2005). Os quatro
51 filotipos estabelecidos apresentavam correlação com a origem geográfica dos isolados,
52 sendo o filotipo I correspondente aos isolados originários da Ásia, o filotipo II aos da
53 América, o filotipo III da África e ilhas vizinhas e o filotipo IV da Indonésia (Fegan e
54 Prior, 2005). Recentemente esse complexo de espécies foi reclassificado por Safni et al.
55 (2014) em três genoespécies independentes: *R. pseudosolanacearum* (*Rpsol*) (Filotipos
56 I e III), *R. solanacearum* (*Rsol*) (Filotipo II) e *R. syzigii* (Filotipo IV), esta última com
57 três subespécies (subsp. *syzigii*, subsp. *celebesensis* e subsp. *indonesiensis*).

58 No Brasil a murcha bacteriana é causada por isolados de *Rpsol* (Filotipo I) e
59 *Rsol* (Filotipo II), e ocorre em solanáceas em todas as regiões do país (Santiago et al.,
60 2017). Estudos recentes de diversidade de isolados de *Ralstonia* spp. obtidos de
61 solanáceas no Nordeste do Brasil revelaram baixa variabilidade genética na população
62 de *Rpsol* e alta variabilidade na população de *Rsol*, no entanto, foi observada uma maior
63 prevalência de *Rpsol* em relação a *Rsol* nos campos de produção (Garcia et al., 2013;
64 Silva, 2014). Estudos da mesma natureza realizado com isolados das três mesorregiões
65 do semiárido de Pernambuco (Agreste, São Francisco e Mata) apontaram para uma
66 emergente prevalência de *Rpsol* na mesorregião Agreste (Albuquerque, 2017). Este fato

67 tem sido atribuído à capacidade de isolados do filotipo I competirem mais efetivamente
68 com isolados de outros filotipos, devido suas características de versatilidade química
69 (Hayward, 1994a), velocidade e amplitude de consumo de compostos orgânicos (Silva,
70 2014), maior gama de hospedeiros (Hayward, 1994b; Wicker et al., 2012), maior
71 habilidade de disseminação e grande plasticidade de virulência (Wicker et al., 2012).

72 A ascendente prevalência de *Rpsol* nessas áreas despertou preocupação a
73 respeito da predominância das espécies nas mesorregiões do estado de Pernambuco,
74 levantando o questionamento se essa espécie possui capacidade adaptativa para
75 extinguir ou declinar a população de *Rsol* nessas áreas. O Brasil é considerado o centro
76 de origem e diversidade de *Rsol* (Wicker et al., 2012; Santiago et al., 2017),
77 normalmente espera-se que organismos imigrantes possuam desvantagem competitiva
78 em comparação aos residentes, pois não foram selecionados para adaptação ao ambiente
79 local (Giraud, 2006; Gladioux et al., 2011), apesar disto, populações de *Rpsol* têm se
80 adaptado e estabelecido satisfatoriamente em novas áreas. Sabe-se que uma espécie de
81 fitopatógeno com maior adaptabilidade pode substituir outras espécies existentes do
82 patógeno por exclusão competitiva, por meio de uma superior capacidade de
83 colonização e melhor adaptação a estresses bióticos e abióticos no ambiente (Balodi et
84 al., 2017). No entanto, inexistem estudos no Brasil, especificamente no estado de
85 Pernambuco, que comparem isolados de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum*
86 visando determinar se as espécies possuem as mesmas habilidades adaptativas.

87 A adaptabilidade biológica de um fitopatógeno representa o estabelecimento de
88 um indivíduo em um ambiente por um longo período de tempo, em comparação a outros
89 indivíduos sob as mesmas condições (Nelson, 1979). O sucesso desse estabelecimento é
90 inicialmente determinado pela capacidade adaptativa do fitopatógeno a condições
91 abióticas e posteriormente aos hospedeiros. Portanto, para uma infecção bem-sucedida,
92 um fitopatógeno deve ser bem qualificado para todos os parâmetros fisiológicos
93 (Ghatak, 2017). Diante disto, nosso estudo teve por objetivo comparar isolados de *Rpsol*
94 e *Rsol* das diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco, sob diferentes condições
95 fisiológicas, bioquímicas, ecológicas e patogênicas, para obter maior esclarecimento
96 acerca das condições adaptativas dessas espécies, a fim de determinar possíveis
97 vantagens adaptativas das mesmas e de avaliar se tais vantagens poderiam favorecer o
98 estabelecimento de uma espécie em detrimento da outra.

99

100 **Material e Métodos**

101 **Isolados bacterianos, condições de cultivo e preparação de inóculo.** Dezoito
102 isolados pertencentes às espécies *Rpsol* ($n = 10$) e *Rsol* ($n = 8$) da Coleção de Cultura
103 Rosa Mariano (CCRM) do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal
104 Rural de Pernambuco foram incluídos no estudo. Todos os isolados foram obtidos de
105 solanáceas sintomáticas com murcha bacteriana, os quais se encontram identificados e
106 caracterizados (Tabela 1). A seleção dos isolados foi realizada a fim de representar os
107 filotipos e sequevares presentes no estado de Pernambuco, e contemplar a variabilidade
108 genética e patogênica existente nas duas espécies dessa população.

109 Para a maioria dos experimentos as suspensões bacterianas foram preparadas em
110 água destilada esterilizada (ADE) com isolados previamente cultivados em meio de
111 cultura Kelman (18 g ágar, 1 g caseína hidrolisada, 10 g peptona, 5 g glicose L⁻¹) a 30°C
112 por 48 h, ajustando-se a absorvância em espectrofotômetro para $A_{570} = 0,54$
113 correspondente a uma concentração de 5×10^9 UFC mL⁻¹.

114

115 **Fisiologia térmica *in vitro*.** O teste de fisiologia térmica foi realizado pela
116 performance de crescimento dos isolados sob diferentes temperaturas. Tubos de ensaio
117 foram preenchidos com 4,5 mL de caldo de cultura Kelman (meio Kelman sem ágar) e
118 0,5 mL das respectivas suspensões bacterianas, incubados por 48 h em estufa tipo
119 B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) em temperaturas que variaram de 15 a 40°C,
120 com intervalos de 5°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em
121 arranjo fatorial 18 x 6, com oito repetições, sendo cada repetição constituída por um
122 tubo de ensaio por combinação isolado x temperatura. O crescimento bacteriano foi
123 quantificado ao fim do período de incubação determinando a densidade óptica (DO₅₇₀)
124 das suspensões em espectrofotômetro modelo 500 M (Analyser, Brasil).

125

126 **Efeito do pH e da salinidade no crescimento bacteriano *in vitro*.** Os
127 experimentos foram realizados em microplacas de microtitulação de poliestireno
128 transparente de 96 poços com fundo plano (Kasvi, Brasil) e o caldo de cultura Kelman
129 foi utilizado como meio de cultura base.

130 Para avaliar o efeito do pH sobre o crescimento bacteriano, o meio de cultura foi
131 ajustado com ⁺HCl ou KOH⁻ a 1 M para uma faixa de pH variando de 2,5 – 9,0 com
132 intervalos de 0,5. Para salinidade o meio de cultura foi suplementado com diferentes

133 concentrações de NaCl: 0%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% 8% e 9% (p/v). Os
134 poços foram preenchidos com 180 µL do meio de cultura modificado e 20 µL das
135 respectivas suspensões bacterianas. O crescimento bacteriano foi quantificado após 36 h
136 de incubação (30°C), por meio da taxa de crescimento planctônico (CP), mensurada
137 pela diferença entre a densidade óptica (OD₅₇₀) inicial (t = 0 h) e final (t = 36 h). Todos
138 os experimentos foram conduzidos em um delineamento experimental inteiramente
139 casualizado em arranjo fatorial 10 x 14 (pH) e 10 x 11 (% NaCl) para *Rpsol* / 8 x 14
140 (pH) e 8 x 11 (% NaCl) para *Rsol*, com cinco repetições por combinação de isolado e
141 nível de pH ou concentração de NaCl, constituídas por um poço cada. Os experimentos
142 foram realizados em duplicata.

143

144 **Utilização de fontes de carbono e sensibilidade a substâncias inibitórias.** Os
145 18 isolados de *Ralstonia* spp. foram analisados pelo sistema Biolog GEN III (Biolog
146 Inc., EUA) em microplacas com testes fenotípicos para utilização de 71 fontes de
147 carbono e sensibilidade a 23 substâncias inibitórias, contendo testemunhas negativa e
148 positiva, de acordo com as recomendações do fabricante.

149 Os isolados foram previamente cultivados em meio sólido NYDA (dextrose 10
150 g, extrato de carne 3 g, extrato de levedura 5 g, peptona 5 g, ágar 23 g L⁻¹) a 30°C por
151 48 h. As suspensões foram preparadas em fluido de inoculação (IF-A) ajustadas a uma
152 transmitância de 92% com auxílio de turbidímetro (Biolog Inc.). Em seguida, 100 µL da
153 suspensão bacteriana foram depositados em cada um dos 96 poços da microplaca. Após
154 o período de incubação por 32 h (33°C) as reações positivas decorrentes do crescimento
155 bacteriano nos poços foram determinadas visualmente pela mudança de coloração para
156 a cor púrpura indicando a redução de cloreto de trifetil tetrazólio (TZC). A partir dos
157 dados dos perfis das 94 características bioquímicas foi construída uma matriz binária
158 para identificar as principais fontes de carbono utilizadas e o perfil de sensibilidade a
159 substâncias inibitórias pelos isolados, buscando relacioná-los às espécies *Rpsol* e *Rsol*.
160 Um dendrograma baseado no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with*
161 *Arithmetic Mean*) também foi gerado para mostrar as relações metabólicas entre os
162 isolados das duas espécies.

163

164 **Formação de biofilme.** A produção de biofilme foi avaliada em microplacas de
165 poliestireno transparente com 96 cavidades de fundo plano (Costar 3599 - Corning Inc.,
166 Amsterdam, USA), utilizando os meios de cultura Kelman e NYDA no estado líquido.

167 A avaliação da produção de biofilme foi realizada empregando o método de
168 quantificação colorimétrica com cristal violeta adaptado de Trentin et al. (2011). Cada
169 poço foi preenchido com 140 μL dos respectivos meios de cultura, 40 μL das
170 suspensões bacterianas e 20 μL de ADE. Após 36 h de incubação (30°C) o conteúdo das
171 placas foi removido e realizada uma tríplice lavagem dos poços com solução salina
172 esterilizada (0,9%) para remoção de células planctônicas. Em seguida, as células
173 bacterianas remanescentes foram fixadas pelo calor em estufa de secagem por 1 h a
174 60°C. Após esse período, a camada de biofilme formada foi corada adicionando 200 μL
175 de cristal violeta (0,5%) a cada poço durante 15 min em temperatura ambiente. As
176 placas foram novamente lavadas em água corrente e o corante aderido à camada de
177 biofilme foi posteriormente solubilizado em 200 μL de etanol (99,5%) por 15 min. A
178 densidade óptica foi mensurada em um leitor de microplacas (Synergy H1 Microplate
179 Reader, Biotek, USA) em um comprimento de onda de 570 nm (DO_{570}). Controles
180 negativos constituíram de ADE substituindo a suspensão bacteriana.

181 A habilidade de formação de biofilme pelos isolados de ambas as espécies foi
182 determinada segundo a classificação de Stepanović et al. (2000), de acordo com o
183 parâmetro: $\text{DO} \leq \text{DOc}$ = não formador de biofilme, $\text{DOc} \leq \text{DO} \leq (2 \times \text{DOc})$ = isolado
184 fraco formador, $(2 \times \text{DOc}) \leq \text{DO} \leq (4 \times \text{DOc})$ = isolado moderado formador, e $(4 \times$
185 $\text{DOc}) \leq \text{DO}$ = isolado forte formador, onde DO corresponde a densidade óptica da
186 leitura do isolado e DOc a densidade do controle negativo.

187 O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado em
188 arranjo fatorial 10 x 2 para *Rpsol* e 8 x 2 para *Rsol*, sendo os fatores isolados
189 bacterianos e meios de cultura. O experimento foi realizado em duplicata contendo
190 cinco repetições biológicas cada.

191

192 **Produção e sensibilidade a bacteriocinas interespecíficas.** A produção e a
193 avaliação da sensibilidade a bacteriocinas foi realizada pelo método de difusão simples
194 em ágar adaptado de Cuppels et al. (1978). Os isolados de *Rpsol* foram avaliados como
195 produtores de bacteriocinas contra os isolados de *Rsol*, que por sua vez foram avaliados
196 quanto à sensibilidade às bacteriocinas produzidas pelos primeiros, e vice-versa.

197 Para a produção de bacteriocinas todos os isolados foram cultivados em tubos de
198 centrifugação tipo Falcon contendo 9 mL de meio CPG líquido (1 g caseína hidrolisada,
199 10 g peptona, 10 g glicose L⁻¹) e 1 mL de suspensão bacteriana, sob agitação (100 rpm),
200 a 31°C ± 0,5°C, durante 72 h. As bactérias foram separadas por centrifugação (4500
201 rpm por 20 min) e o sobrenadante esterilizado por ultrafiltração em filtro millipore
202 0,22µm (Kasvi, Brasil). Para avaliar a sensibilidade dos isolados alvos às bacteriocinas
203 produzidas, 40 mL de uma mistura contendo a suspensão do isolado alvo
204 homogeneizada em proporção 1:600 com meio CPG sólido fundente (± 40°C) foi
205 vertida em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Após solidificação do meio, foram
206 perfurados poços de 3,5 mm de diâmetro onde foram depositados 25 µL dos
207 sobrenadantes livres de células dos isolados produtores. Controles negativos em que
208 ADE substituíram os sobrenadantes foram adicionados ao experimento. Após 48 h de
209 incubação a 30°C, zonas translúcidas com ausência de crescimento bacteriano ao redor
210 dos poços indicaram sensibilidade do isolado alvo, qualificando o isolado produtor
211 como positivo (+) para produção de bacteriocinas. As interações positivas foram
212 submetidas à análise quantitativa e tiveram seus halos de inibição medidos para avaliar
213 diferenças significativas entre elas. O experimento foi realizado em um delineamento
214 experimental inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição
215 constituída por um poço em cada placa por combinação isolado produtor x isolado alvo.
216

217 **Patogenicidade a solanáceas.** Plantas de berinjela (cv. Híbrida Ciça F1), jiló
218 (*Solanum gilo*) (cv. Tinguá Verde-Claro), pimenta (*Capsicum chinense*) (cv. BRS
219 Moema), pimentão (cv. Yolo Wonder) e tomateiro (cv. IPA-6) com 30 dias de idade
220 foram previamente semeadas em substrato orgânico vegetal Basaplant® e transplantadas
221 com 15 dias após o semeio para vasos plásticos de 500 mL contendo o mesmo
222 substrato. A inoculação foi realizada pelo método de ferimento de raízes no solo em
223 semicírculo com deposição de 15 mL de suspensão bacteriana (Felix et al. 2012). As
224 plantas foram irrigadas por subirrigação diariamente e mantidas em casa de vegetação
225 onde a temperatura variou de 24,3 a 45,3°C ± 4°C e a umidade relativa entre 36 e 82%
226 ± 9%. O experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente
227 casualizado com seis repetições por combinação isolado x hospedeiros. A avaliação foi
228 realizada durante 30 dias observando-se diariamente a ocorrência de murcha. Quando

229 pelo menos três entre as seis plantas inoculadas apresentaram sintomas, a interação foi
230 considerada positiva (+).

231

232 **Agressividade de espécies de *Ralstonia* e componentes epidemiológicos da**
233 **murcha bacteriana em tomateiro.** Todos os isolados foram inoculados em tomateiro
234 (cv. IPA-6) suscetível à murcha bacteriana e cultivado no estado de Pernambuco. O
235 preparo das plantas e inoculação foi realizado conforme descrito no item anterior.
236 Foram inoculadas 12 plantas/isolado e a avaliação foi realizada diariamente, até nove
237 dias após a inoculação, determinando-se os seguintes componentes epidemiológicos da
238 murcha bacteriana; a) período de incubação (PI); b) incidência (INC) da doença; e c)
239 severidade inicial (SEVI) e severidade final (SEVF), utilizando uma escala descritiva
240 adaptada de Nielsen e Haynes (1960) variando de 0 a 4, onde: 0 = planta sem sintomas,
241 1 = planta com 1/3 de folhas murchas, 2 = planta com 2/3 de folhas murchas, 3 = planta
242 completamente murcha e 4 = planta morta. Com os dados de severidade foi calculado o
243 índice de doença (IDO) pela fórmula: $IDO = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) \times 100 / (n^\circ$
244 $total\ de\ plantas \times grau\ máximo\ da\ escala)$, onde n é o número de plantas em cada nível
245 da escala (McKinney, 1923). A área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD)
246 também foi estimada, calculada pela expressão: $AACPD = \sum (y_i + y_{i+1}) / 2 \cdot d_{ti}$, onde y_i e
247 y_{i+1} são os valores de severidade observados em duas avaliações consecutivas e d_{ti} o
248 intervalo entre as avaliações (Shaner e Finney, 1977). As plantas foram irrigadas por
249 subirrigação diariamente e mantidas em casa de vegetação onde a temperatura variou de
250 21,3 a 43,6°C ± 4°C e a umidade relativa entre 46 e 94% ± 6%. O experimento foi
251 realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro
252 repetições de quatro plantas cada, e realizado em duplicata.

253

254 **Colonização em raízes e caules de tomateiro.** Foram utilizados quatro
255 isolados, sendo dois para cada espécie, representando um isolado altamente agressivo
256 ($Rpsol = CCRMRs95$; $Rsol = CCRMRs92$) e outro com baixa agressividade ($Rpsol =$
257 $CCRMRs218$; $Rsol = CCRMRs107$), classificados com base nos resultados dos
258 experimentos anteriores. Para avaliar a colonização em raízes e caules de tomateiro (cv.
259 IPA-6), a inoculação foi realizada no momento do transplântio pelo método da
260 pulverização do torrão de mudas com 30 dias de idade (Lopes e Boiteux, 2012),
261 uniformizando duas pulverizações em cada lado do torrão. As mudas foram previamente

262 cultivadas em substrato orgânico vegetal Basaplant[®] e transplantadas para vasos plásticos
263 de 500 mL contendo o mesmo substrato. Para colonização em raízes, a amostragem de
264 plantas foi realizada em 1, 3, 6 e 9 dias após a inoculação (DAI), retirando 100 mg de
265 tecido radicular por planta. Para colonização em caules, a amostragem de plantas foi
266 realizada quando pelo menos duas, em cada isolado, apresentaram os primeiros
267 sintomas de murcha (1 a 25% de folhas murchas), conforme descrito por Huerta et al.
268 (2015), retirando seções transversais de 100 mg de caules de tomateiro acima da região
269 do colo da planta.

270 Os tecidos vegetais foram lavados em água corrente e submetidos à
271 desinfestação superficial [álcool 50% (30 s), hipoclorito de sódio 3:1 (2 min) e tríplice
272 lavagem em ADE], em seguida foram macerados e diluídos em série em ADE. Uma
273 alíquota de 100 µL de cada diluição foi depositada em meio TZC (Kelman + 1% de
274 tetracloreto de 2, 3, 5-trifenil tetrazólio) e distribuída na superfície do meio com auxílio
275 de alça de Drigalski. As placas foram incubadas por 72 h (30°C) em estufa do tipo
276 B.O.D. As colônias viáveis foram contadas para cada amostra com base na morfologia
277 de colônias virulentas de *Ralstonia* spp. em meio TZC, determinando o tamanho da
278 população bacteriana em unidades formadoras de colônias (UFC) por g de tecido
279 vegetal. As plantas foram irrigadas por subirrigação diariamente e mantidas em casa de
280 vegetação. Durante o experimento de colonização em raízes a temperatura variou de
281 21,3 a 43,6°C ± 4°C e a umidade relativa entre 46 e 94% ± 6%, e durante o experimento
282 de colonização em caules a temperatura variou de 26,8 a 31,2°C ± 2°C e a umidade
283 relativa entre 43 e 71% ± 9%. Os experimentos foram realizados em delineamento
284 experimental inteiramente casualizado com três repetições por dia/isolado para
285 colonização em raízes, e com oito repetições por isolado para colonização em caules,
286 sendo cada repetição constituída de uma planta.

287

288 **Análises estatísticas.** Nos experimentos em que houve repetição, os dados das
289 duas replicações independentes foram agrupados após a realização da análise de
290 homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene e nenhuma heterogeneidade ser
291 detectada ($P \geq 0,05$). Nos experimentos de fisiologia térmica, salinidade e colonização
292 em raízes, os dados foram submetidos a análises de regressão não-linear. As variáveis
293 de interesse foram estimadas utilizando os modelos de regressão e os sumários
294 numéricos com auxílio do programa TableCurve[™] 2D 5.01 (Systat Software Inc.,

295 Chicago, EUA). Diferenças significativas entre duas amostras foram comparadas pelo
296 teste T. Para mais de duas amostras, quando diferenças significativas foram observadas,
297 as médias foram comparadas pelo teste de agrupamento Scott-Knott, teste da Diferença
298 Mínima Significativa (LSD) de Fisher e pelo teste de Tukey. Os testes não paramétricos
299 Wilcoxon Soma de Ranking (duas amostras) e Kruskal-Wallis (mais de duas amostras)
300 foram utilizados para os dados que não atenderam aos pressupostos da ANOVA. Todas
301 as análises estatísticas foram realizadas ao nível de 5% de probabilidade utilizando os
302 softwares Statistix 9 (Analytical Software, Tallahassee, EUA) para os testes de Levene,
303 LSD, Shapiro-Wilk, Teste T, Tukey, Wilcoxon Soma de Ranking e Kruskal-Wallis, e o
304 software AgroEstat (Barbosa e Maldonado Júnior, 2015) para o teste de agrupamento
305 Scott-Knott. Diagramas de Venn foram construídos através da ferramenta DisplayR
306 (<https://app.displayr.com>), o dendrograma gerado pelo software MVSP versão 3.22
307 (Kovach Computing Services, Anglesey, Wales) e representações gráficas realizadas
308 através do Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, EUA) e SigmaPlot versões 10 e 14
309 (Systat Software Inc., Chicago, EUA).

310

311 **Resultados**

312 **Fisiologia térmica *in vitro*.** *Rpsol* e *Rsol* cresceram nas temperaturas entre 15 e
313 40°C, no entanto, possuíram crescimento reduzido nos extremos de temperatura,
314 apresentando comportamento similar em suas curvas de performance. Os maiores
315 crescimentos foram registrados entre 25 e 35°C para as duas espécies (Figura 1). O
316 modelo de regressão polinomial de terceiro grau [$y=a+bx+cx^2+dx^3$] proporcionou bom
317 ajuste dos dados de crescimento em função da temperatura para todos os isolados das
318 duas espécies, com valores de R^2 variando entre 0,85 e 0,99 para *Rpsol* e entre 0,91 e
319 0,96 para *Rsol* (Figuras S1 e S2). Neste modelo, y representa o crescimento bacteriano
320 em determinada temperatura (x), enquanto a , b , c e d são parâmetros da regressão. Por
321 este modelo foi possível estimar o pico máximo de x em função de y , ou seja, a
322 temperatura ótima para o crescimento bacteriano, bem como o pico máximo de y em
323 função de x , sendo interpretado como o crescimento bacteriano máximo na temperatura
324 ótima, representado pelos valores de densidade óptica (DO_{570}).

325 Houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os isolados de cada espécie, tanto
326 para temperatura ótima de crescimento quanto para o crescimento bacteriano máximo
327 (Tabela 2). Entre os isolados de *Rpsol*, todos registraram temperaturas ótimas de

328 crescimento acima de 30°C. Para esta variável, a temperatura mais elevada registrada
329 foi de 32,2°C (CCRMRs218), enquanto a menor temperatura foi de 30,0°C
330 (CCRMRs95) diferindo significativamente das demais. Na temperatura ótima, o isolado
331 CCRMrs218 apresentou o maior valor de crescimento máximo, de 1,16, diferindo
332 significativamente dos demais, exceto do isolado CCRMrs66 que teve um crescimento
333 máximo de 1,13. Para os isolados de *Rsol*, as temperaturas para crescimento ótimo
334 variaram de 28,6 (CCRMrs92) a 32,1°C (CCRMrs129). Os isolados que exigiram
335 maiores temperaturas de crescimento registraram de 30,7 (CCRMrs185) a 32,1°C
336 (CCRMrs129), não diferindo significativamente entre si dentro deste intervalo. Os
337 isolados que exigiram menores temperaturas para crescimento foram CCRMrs85
338 (29,9°C), CCRMrs91 (29,8°C) e CCRMrs92 (28,6°C), não diferindo
339 significativamente entre si. Na temperatura ótima, o maior valor de crescimento
340 máximo foi do isolado CCRMrs185 (1,08), que diferiu significativamente dos demais.

341 O teste T realizado para investigar diferenças na fisiologia térmica entre as duas
342 espécies não mostrou diferenças significativas entre *Rpsol* (TO = 31,4°C; Crescimento
343 máximo = 0,91) e *Rsol* (TO = 31,0°C; Crescimento máximo = 0,76), para as
344 temperaturas ótimas de crescimento (P = 0,10), nem para o crescimento máximo nessas
345 temperaturas (P = 0,1473), respectivamente. No entanto, quanto a amplitude da faixa de
346 temperatura ótima de crescimento dos isolados, a de *Rsol* (29 – 32°C) foi ligeiramente
347 maior quando comparada a de *Rpsol* (30 – 32°C) (Tabela 3 e Figura 2A).

348

349 **Efeito do pH no crescimento bacteriano *in vitro*.** Todos os isolados foram
350 capazes de crescer numa ampla faixa de pH (4,5 – 9,0) (Tabela 4), no entanto, não
351 houve crescimento nos níveis de 2,0 a 4,0. O crescimento bacteriano variou em função
352 do pH, sendo a interação entre os isolados de cada espécie e níveis de pH significativa
353 (P < 0,0001). Os isolados de *Rpsol* apresentaram crescimentos significativamente
354 superiores na faixa de pH ótimo de 5,0 a 8,5, com predominância de crescimento em pH
355 mais elevados. Por outro lado, os isolados de *Rsol* apresentaram predominantemente
356 crescimentos significativamente superiores na faixa de pH entre 5,5 e 8,0, no entanto,
357 para alguns isolados o pH 4,5 foi o ideal para o crescimento. Considerando todos os
358 isolados desta espécie a faixa ótima de pH variou entre 4,5 e 9,0 (Tabela 4 e Figura 2B).

359

360 **Efeito da salinidade no crescimento bacteriano *in vitro*.** O nível de salinidade
361 (% NaCl) no meio de cultura influenciou significativamente no crescimento bacteriano
362 das duas espécies (Figura 3). Todos os isolados expressaram o maior crescimento na
363 ausência de NaCl e reduziram o crescimento com a elevação dos níveis de salinidade,
364 com exceção do isolado CCRMRs85 de *Rsol*, que teve maior crescimento em 0,5% de
365 salinidade, decrescendo a partir de então. Os isolados das duas espécies tiveram seu
366 crescimento interrompido acima de 3% de salinidade (Figura 3).

367 O modelo de regressão logística de dose-resposta com três parâmetros
368 [$y = a / (1 + (x/b)^c$] proporcionou excelente ajuste aos dados de crescimento bacteriano em
369 função da salinidade (% NaCl) do meio de cultura para todos os isolados das duas
370 espécies, com valores de R^2 variando entre 0,969 e 0,995 para *Rpsol* e entre 0,983 e
371 0,999 para *Rsol* (Tabela S1). Neste modelo, y representa o crescimento bacteriano em
372 determinada salinidade (x). O parâmetro a representa o valor de y antes da transição, ou
373 seja, antes de y começar a diminuir, sendo interpretado como o crescimento bacteriano
374 máximo no menor nível de salinidade. O parâmetro b representa o valor de x no centro
375 da transição, ou seja, valor de x que reduz em 50% o valor de y , interpretado como o
376 nível de salinidade em que o crescimento bacteriano máximo é reduzido pela metade.

377 Houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os isolados de cada espécie em
378 relação ao nível de salinidade necessário para reduzir pela metade o crescimento
379 bacteriano máximo (Tabela 5). Em *Rpsol* os isolados com maior tolerância ao aumento
380 de salinidade necessitaram de níveis acima de 0,9% para reduzir o crescimento máximo
381 pela metade, chegando a um máximo de tolerância de 1,16% para ter seu crescimento
382 reduzido em 50%; enquanto a maior sensibilidade foi observada para o isolado
383 CCRMRs118 que necessitou de uma concentração de apenas 0,32% de NaCl para
384 reduzir pela metade seu crescimento máximo. Entre os isolados de *Rsol* a maior
385 tolerância a salinidade foi obtida por CCRMRs85 (1,32%), enquanto a maior
386 sensibilidade ao aumento da salinidade foi registrada a partir de 0,4% pelo isolado
387 CCRMRs129. Comparando as espécies, a menor sensibilidade à elevação da salinidade
388 foi observada em *Rsol* (1,32%) enquanto a maior em *Rpsol* (0,32%) (Tabela 5 e Figura
389 2C).

390

391 **Perfil de utilização de fontes de carbono e sensibilidade a substâncias**
392 **inibitórias.** Os dados obtidos foram plotados em Diagrama de Venn e quantificados os

393 compostos diferencialmente utilizados pelas espécies de *Ralstonia* (Figura 4). Foram
394 considerados como fontes de carbono mais utilizadas, àquelas consumidas por $\geq 70\%$
395 dos isolados de cada espécie, sendo listadas 26 fontes. Quatorze fontes de carbono
396 foram comumente utilizadas pelas duas espécies: ácido bromo-succínico, ácido cítrico,
397 ácido D-galacturônico, ácido D-glicurônico, ácido quínico, ácido α -keto-glutárico,
398 ácido-L-aspártico, ácido-L-glutâmico, glucuronamida, L-ácido málico, L-histidina,
399 pectina, tween 40 e α -D-Glucose. Sete fontes de carbono foram mais utilizadas apenas
400 por isolados de *Rpsol* (ácido-L-galactonico lactona, D-frutose, D-galactose, D-trealose,
401 glicerol, piruvato de metilo e sacarose), e cinco (ácido acético, ácido propiônico, D-
402 frutose-6-PO₄, L-alanina e β -hidroxi-D,L-ácido butírico) por isolados de *Rsol* (Figura
403 4A1 e Tabela S2). Entre os dez carboidratos que foram utilizados por 100% dos
404 isolados de alguma espécie, quatro foram compartilhados (ácido bromo-succínico, ácido
405 D-galacturônico, glucuronamida e L-ácido málico) pelas duas espécies, quatro (ácido-L-
406 aspártico, ácido-L-glutâmico, L-histidina e tween 40) foram utilizados apenas por *Rpsol*
407 e dois (ácido cítrico e ácido α -Keto-glutárico) foram utilizados apenas por *Rsol* (Figura
408 4A2 e Tabela S2). Nenhuma fonte de carbono foi utilizada com exclusividade por 100%
409 dos isolados de uma única espécie (Tabela S2). Não foi possível perceber diferenças na
410 velocidade de utilização dos compostos entre as espécies estudadas.

411 Foram detectadas oito substâncias inibitórias as quais as espécies demonstraram
412 maior resistência ($\geq 70\%$ dos isolados), sete (aztreonam, lincomicina, rifamicina SV,
413 telurito de potássio, tetrazólio azul, tetrazólio violeta e vancomicina) foram
414 compartilhadas entre as duas espécies e uma (pH 6) apenas *Rpsol* demonstrou maior
415 resistência (Figura 4B1 e Tabela S2). Entre as seis substâncias inibitórias as quais 100%
416 dos isolados de cada espécie foram resistentes, cinco foram compartilhadas (aztreonam,
417 lincomicina, telurito de potássio, tetrazólio azul e tetrazólio violeta), e uma
418 (vancomicina) apenas *Rsol* apresentou resistência por todos os isolados (Figura 4B2 e
419 Tabela S2). Nenhuma espécie apresentou exclusividade na resistência contra alguma
420 substância inibitória (Tabela S2).

421 O dendrograma gerado a partir do perfil bioquímico separou os 18 isolados em
422 10 grupos ao nível de 75% de similaridade. Sete isolados formaram grupos unitários,
423 três isolados de *Rpsol* formaram um único grupo e os outros dois grupos foram
424 formados por isolados das duas espécies (Figura 5).

425

426 **Formação de biofilme.** Os meios de cultura influenciaram na habilidade de
427 formação de biofilme dos isolados de *Ralstonia* spp. (Figura 6). No meio Kelman,
428 100% dos isolados de *Rsol* e 70% dos isolados de *Rpsol* foram capazes de aderir à
429 superfície inerte e formar biofilme, no entanto, todos foram classificados como fracos
430 formadores neste meio de cultura. Em meio de cultura NYD todos os isolados foram
431 capazes de formar biofilme, contudo, em diferentes níveis: em *Rpsol* os isolados foram
432 classificados como fracos (30%), moderados (50%) e fortes formadores (20%); em
433 *Rsol*, os isolados foram classificados apenas entre moderados (75%) e fortes formadores
434 (25%).

435

436 **Produção e sensibilidade a bacteriocinas interespecíficas.** As duas espécies
437 produziram bacteriocinas interespecíficas capazes de limitar o crescimento uma da
438 outra, entretanto, variaram em relação à quantidade de isolados produtores e sensíveis
439 (Tabela 6). *Rsol* apresentou maior número de isolados produtores (62,5%) e menor
440 número de isolados sensíveis (25%), enquanto *Rpsol* demonstrou o oposto, menor
441 número de isolados produtores (10%) e maior número de isolados sensíveis (40%).

442 Entre os isolados de *Rsol* produtores de bacteriocinas destacou-se o isolado
443 CCRMRs91, que produziu inibidores de crescimento para quatro dos cinco isolados
444 sensíveis de *Rpsol*, e os isolados CCRMRs92, CCRMRs161 e CCRMRs185, que
445 limitaram o crescimento de três dos cinco isolados sensíveis de *Rpsol*, cada. O único
446 isolado produtor de bacteriocina de *Rpsol* foi o isolado CCRMRs74, que produziu
447 inibidores de crescimento para dois isolados de *Rsol* (Tabela 6).

448 O teste T revelou que não houve diferença significativa ($P = 0,08$) entre a
449 sensibilidade dos isolados alvos de *Rsol* (CCRMRs161 e CCRMRs185) em relação à
450 bacteriocina produzida pelo isolado de *Rpsol* (CCRMRs74) (Tabela 7). Entretanto, a
451 análise fatorial realizada para investigar as relações entre os isolados produtores e os
452 isolados alvos das interações positivas de *Rsol* sobre *Rpsol*, mostrou que o efeito dessa
453 interação foi significativo ($P < 0,0001$), revelando que houve variações na intensidade
454 de inibição das bacteriocinas produzidas, destacando o isolado CCRMRs91 (*Rsol*) como
455 o produtor de bacteriocina mais potente e o isolado CCRMRs74 (*Rpsol*) como o mais
456 sensível às bacteriocinas produzidas por isolados de *Rsol* (Tabela 7).

457

458 **Patogenicidade a solanáceas.** Dentre os isolados de *Rpsol*, 100% foram
459 patogênicos a tomateiro e pimenteira, 90% patogênicos à berinjela e pimentão e 40%
460 ao jiloeiro. Com relação aos isolados de *Rsol*, 100% foram patogênicos ao tomateiro e
461 berinjela, 87,5% a pimentão, 75% à pimenteira e 12,5% ao jiloeiro (Tabela 8). Quatro
462 isolados de *Rpsol* (40%) foram patogênicos a todos os hospedeiros testados contra
463 apenas um de *Rsol* (12,5%).

464

465 **Agressividade de espécies de *Ralstonia* e componentes epidemiológicos da**
466 **murcha bacteriana em tomateiro.** Todos os isolados de *Rsol* e *Rpsol* induziram
467 sintomas de murcha bacteriana em tomateiro cv. IPA-6. Analisando as relações
468 patológicas entre os isolados de cada espécie foram observadas diferenças significativas
469 entre eles para PI, INC, IDO e AACPD ($P \leq 0,05$) (Tabela 9).

470 Entre os isolados de *Rpsol*, as médias do PI variaram de 3,8 a 9,3 dias, a INC de
471 34,4 a 100%, o IDO_F de 9,4 a 100% e AACPD de 8,6 a 25,7 (Tabela 9). Entre os
472 isolados de *Rsol* o PI variou de 3,8 a 9,5 dias, a INC de 18,8 a 100%, o IDO_F de 4,7 a
473 96,1% e a AACPD de 8,4 a 24,6 (Tabela 9). Não houve diferença significativa com base
474 no IDO_I entre os isolados de cada espécie. Os testes T e Wilcoxon Soma de Ranking
475 realizados para investigar as relações patológicas entre *Rpsol* e *Rsol* não mostraram
476 diferenças significativas ($P \geq 0,05$) para as variáveis analisadas (Tabela 10).

477

478 **Colonização em raízes e caules de tomateiro.** A avaliação populacional foi
479 realizada em diferentes dias após a inoculação (DAI) dos isolados. Com exceção do
480 isolado CCRMRs107, que possui baixa agressividade, todos os outros foram detectados
481 nas raízes, porém, em tempos e tamanhos populacionais diferentes (Figura 7). No
482 primeiro DAI, apenas o isolado CCRMRs95 penetrou nas raízes com uma população
483 média de 1,9 log UFC g⁻¹ de raiz. No terceiro DAI apenas os isolados de *Rpsol* haviam
484 colonizado as raízes com tamanhos populacionais de 1,57 log UFC g⁻¹ de raiz
485 (CCRMRs218) e 6,04 log UFC g⁻¹ de raiz (CCRMRs95). No sexto DAI, o isolado
486 CCRMRs92 de *Rsol* apresentou densidade populacional de 7,82 log UFC g⁻¹ de raiz,
487 superior às populações dos dois isolados de *Rpsol*. Aos 9 DAI foi detectada apenas
488 população de CCRMRs92 nas raízes (4,88 log UFC g⁻¹ de raiz).

489 O modelo de regressão polinomial de terceiro grau [$y=a+bx+cx^2+dx^3$]
490 proporcionou excelente ajuste dos dados de crescimento em função da temperatura para

491 todos os isolados, com valores de R^2 variando entre 0,96 e 0,99. Neste modelo, y
492 representa o crescimento bacteriano em determinado DAI (x), enquanto a , b , c e d são
493 parâmetros da regressão. Por este modelo foi possível estimar o pico máximo de y em
494 função de x , sendo interpretado como a densidade populacional máxima, bem como o
495 pico máximo de x em função de y , ou seja, o DAI onde a população bacteriana atinge o
496 máximo populacional. Houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os isolados de
497 cada espécie para as duas variáveis (Tabela 11). O isolado CCRMRs95 atingiu a
498 densidade populacional máxima significativamente mais rápido que os demais isolados,
499 aos 4,9 DAI, enquanto o isolado CCRMRs92 apresentou significativamente mais tempo
500 para atingir a máxima densidade populacional, em 7,1 DAI. Em relação ao tamanho
501 populacional, o oposto foi observado, com o isolado CCRMRs92 atingindo a maior
502 população (8,48 log UFC g^{-1} de raiz). Não houve diferença significativa entre os
503 isolados mais agressivos, entretanto, atingiram densidades populacionais mais elevadas
504 que os menos agressivos.

505 As bactérias foram reisoladas de caules quando os primeiros sintomas de murcha
506 surgiram. Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) não foram observadas entre isolados de
507 igual classificação de agressividade independente da espécie, no entanto, isolados mais
508 agressivos (CCRMRs92 e CCRMRs95) diferiram significativamente dos menos
509 agressivos (CCRMRs107 e CCRMRs218). Em *Rpsol* os tamanhos populacionais
510 variaram de 3,21 (CCRMRs218) a 9,40 log UFC g^{-1} de caule (CCRMRs95), enquanto
511 em *Rsol* as populações variaram de 1,92 (CCRMRs107) a 8,91 log UFC g^{-1} de caule
512 (CCRMRs92) (Figura 8).

513

514 **Discussão**

515 Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de adaptabilidade
516 comparativa de isolados de *Rpsol* e *Rsol*, sobretudo no estado de Pernambuco, região
517 Nordeste do Brasil. A adaptabilidade dos isolados de *Rpsol* e *Rsol* foi comparada
518 mediante diferentes condições fisiológicas, ecológicas, bioquímicas e patogênicas. A
519 adaptabilidade fisiológica das espécies foi avaliada pela reprodução sob diferentes
520 condições de temperatura, pH e salinidade; a ecológica foi investigada pela habilidade
521 de formação de biofilme e produção de bacteriocinas; a bioquímica verificada através da
522 utilização de fontes de carbono e espectro de resistência a substâncias inibitórias; por
523 fim, a adaptabilidade patogênica foi determinada pela interação com hospedeiros,

524 baseada na patogenicidade a diferentes hospedeiros, capacidade reprodutiva *in planta* e
525 pelos componentes epidemiológicos da murcha bacteriana em tomateiro.

526 A temperatura não foi um fator limitante ao crescimento das duas espécies, uma
527 vez que os isolados foram capazes de crescer dentro da faixa de temperatura avaliada
528 (15 – 40°C), entretanto, maiores taxas de crescimento foram registradas entre 25 e
529 35°C, como verificado anteriormente (Mehan et al., 1994). Ainda que a temperatura
530 seja raramente um fator limitante para a maioria dos fitopatógenos tropicais e
531 subtropicais (Bedendo, 2018), continua sendo um fator ambiental importante para o
532 desenvolvimento bacteriano, influenciando na absorção de nutrientes, no crescimento,
533 na sobrevivência e determinando a velocidade das reações metabólicas ao atuar na
534 atividade enzimática (Barbosa e Torres, 2010). Wang et al. (2019) demonstraram que a
535 temperatura influenciou nos fenótipos metabólicos de *R. solanacearum* biovar 3
536 (*Rpsol*), e que a capacidade metabólica da bactéria foi superior em 35°C, além de ter se
537 tornado mais adaptável a estresses osmóticos e níveis de pH em 30 e 35°C.

538 Nossos resultados determinaram a temperatura de 31°C como a temperatura
539 ótima média para o crescimento *in vitro* das duas espécies, assim como reportado em
540 estudos anteriores (French, 1986; Singh et al., 2013; Bittner et al., 2016), confirmando a
541 proximidade ecológica entre essas espécies. A temperatura também é um fator essencial
542 quando consideramos as interações patogênicas, pois influencia diretamente o
543 desenvolvimento da doença, atuando nos processos de colonização e reprodução das
544 bactérias (Bedendo, 2018). Temperaturas acima de 30°C são amplamente relatadas por
545 proporcionarem o aumento da agressividade do patógeno e da suscetibilidade de vários
546 hospedeiros à murcha bacteriana, caracterizando uma condição ideal para o
547 desenvolvimento da doença (Gallegly e Walker, 1949; Hayward, 1991; Singh et al.,
548 2013; Bittner et al., 2016; Wang et al., 2017). A condição de altas temperaturas é
549 característica do Nordeste do Brasil (Alvares et al., 2014), condizente com as
550 temperaturas ótimas de crescimento encontradas para os isolados utilizados no presente
551 estudo, confirmando que a adaptabilidade de um indivíduo pode ser influenciada pelo
552 ambiente no qual habita (Zhan e McDonald, 2013).

553 A distribuição geográfica de *Rpsol* e *Rsol* no Brasil também é refletida pela faixa
554 de temperatura ótima de crescimento encontrada para as espécies. Enquanto *Rsol* está
555 distribuída por todas as regiões do país, *Rpsol* predomina em regiões com temperaturas
556 elevadas, especialmente Norte e Nordeste (Lopes e Boiteux, 2016; Santiago et al.,

2017). Isso pode explicar o fato de todos os isolados de *Rpsol* possuírem temperaturas ótimas para crescimento acima de 30°C, enquanto *Rsol* se adapta a uma faixa de temperatura mais ampla, com alguns isolados necessitando de temperaturas abaixo de 30°C para crescimento ótimo. A adaptação a altas temperaturas apresentadas por isolados de *Rpsol* pode representar um mecanismo de compensação, onde se sacrifica a adaptabilidade a uma maior faixa de temperatura ótima de crescimento em troca de um aumento na adaptação a condições abióticas adversas, adquiridas sob condições de temperaturas mais elevadas como visto por Wang et al. (2019). Entretanto, a diferença na amplitude da faixa de temperatura ótima estabelece uma pequena vantagem de isolados de *Rsol* em relação a *Rpsol* na capacidade de adaptação a diferentes temperaturas.

O nível de pH do ambiente é um dos fatores que determinam a capacidade de um patógeno colonizar, invadir e matar o hospedeiro com sucesso (Alkan et al., 2013). Todos os isolados foram capazes de crescer numa faixa de pH ampla entre 4,5 e 9,0, apresentando comportamento predominantemente neutrófilo. Nenhum crescimento foi observado entre a faixa de pH 2,0 – 4,0, pois, meios muito ácidos exercem efeito antimicrobiano, desnaturando enzimas presentes na superfície celular e diminuindo o pH citoplasmático, como consequência há uma menor taxa de crescimento, aumento da fase lag e redução na atividade dos sistemas de transporte de íons (Beales, 2004). Os isolados de *Rpsol* apresentaram maior adaptação a condições entre a neutralidade (pH 7,0) e a alcalinidade (pH 8,5), resultado similar ao obtido por Wang et al. (2019) ao avaliarem o crescimento de *R. solanacearum* biovar 3 (*Rpsol*) sob diferentes condições de pH, onde observaram maiores taxas de crescimento entre pH 5,0 – 8,0. Por outro lado, Li et al. (2017) relataram que condições ácidas entre 4,5 e 5,5 favoreceram o crescimento desta bactéria. Em nossos resultados foram os isolados de *Rsol* que apresentaram maior adaptação a níveis de pH entre a acidez (pH 4,5) e a neutralidade (pH 7,0), similar aos resultados obtidos por He et al. (2014). A faixa de pH para crescimento dos isolados de *Rsol* e *Rpsol* foi compatível com o pH de solos com cultivo de solanáceas que fica entre 5,0 a 7,5. Por sua vez, a faixa de pH mais ácida interpretada como ótima para crescimento de *Rsol* foi compatível com o pH de solos sob diferentes usos agrícolas do semiárido de Pernambuco (Corrêa et al., 2009), região a qual todos os isolados dessa espécie pertencem, reforçando uma vez mais a influência do ambiente de origem sobre a adaptabilidade dos organismos.

590 A acidez do solo pode afetar severamente a sobrevivência, penetração,
591 reprodução e disseminação de fitopatógenos veiculados pelo solo, além de determinar a
592 ocorrência e a intensidade de doenças (Bedendo, 2018). A importância da acidificação
593 do solo para a murcha bacteriana tem sido relatada em diversos estudos (Ramesh e
594 Bandyopadhyay, 1993; Hacısalihoglu et al., 2009; Wang et al., 2017), como
595 demonstrado por Li et al. (2017), que observaram que os campos do sul da China com
596 ocorrência da doença possuem um pH médio bem menor que os campos saudáveis, em
597 torno de 5,5. Além dessas observações, os autores também determinaram através de
598 experimentos em vasos, que condições ácidas de 4,5 a 5,5, aumentam a velocidade de
599 desenvolvimento e agressividade da doença. Em solos representativos do estado de
600 Pernambuco, Felix et al. (2012) observaram que solos condutivos para maior
601 sobrevivência de *Rpsol* esteve correlacionado a valores de pH entre 5,2 e 6,1. Portanto,
602 de acordo com os nossos resultados, a superior adaptabilidade de isolados de *Rsol* a
603 condições de acidez em detrimento dos isolados de *Rpsol*, os tornam um risco maior
604 para epidemias em campos com solos mais ácidos.

605 A similaridade fisiológica existente entre *Rpsol* e *Rsol* em relação ao efeito da
606 salinidade no crescimento bacteriano ficou evidente. A redução do crescimento
607 aumentou gradativamente com a elevação dos níveis de salinidade, com concentrações
608 acima de 3% de NaCl letais para todos os isolados das duas espécies nas condições
609 avaliadas (30°C), caracterizando-as como halófilas facultativas. A inibição total do
610 crescimento acima de 3% de salinidade é explicada pelo aumento da pressão osmótica
611 no meio, resultante da adição de sais na solução, tornando o ambiente hipertônico,
612 fazendo com que a célula perca água através da membrana plasmática para o meio
613 extracelular (Tortora et al., 2017). Esse resultado divergiu do encontrado por Wang et
614 al. (2019), em que o isolado avaliado por eles não apresentou tolerância à nenhum nível
615 de salinidade quando cultivados em 30°C, enquanto a 35°C a tolerância atingiu um
616 nível de até 7% de NaCl.

617 O grau de sensibilidade à salinidade foi comparado através da concentração de
618 NaCl necessária para reduzir 50% do crescimento bacteriano máximo, estimado através
619 de uma análise de regressão logística de dose resposta. De modo geral, os isolados de
620 *Rpsol* mostraram-se mais sensíveis à salinidade, registrando a menor concentração de
621 NaCl necessária para reduzir metade de seu crescimento, enquanto a maior
622 concentração necessária para reduzir 50% do crescimento máximo foi registrada por um

623 isolado de *Rsol*. Essa menor sensibilidade por parte dos isolados de *Rsol* pode constituir
624 um importante fator de competitividade em relação a *Rpsol* em solos salinizados, uma
625 vez que, na região Nordeste do Brasil, aproximadamente 25% das áreas irrigadas
626 encontram-se salinizadas (Gheyi, 2000). Especialmente no semiárido do Nordeste
627 brasileiro, região onde a maior parte dos isolados utilizados nesse estudo foram
628 coletados, aproximadamente 30% dos perímetros irrigados encontram-se com
629 problemas de solos afetados por sais (Lopes et al., 2008), devido ao avanço da irrigação
630 e ao uso de águas de baixa qualidade (Ribeiro, 2010).

631 Assim como nos resultados encontrados por Silva (2014) ao caracterizar
632 isolados de *Ralstonia* spp. das regiões Norte e Nordeste do Brasil, nós detectamos uma
633 alta diversidade bioquímica entre os isolados de cada espécie de *Ralstonia* na utilização
634 das 71 fontes de carbono e na sensibilidade às 23 substâncias inibitórias das microplacas
635 Biolog Gen III[®]. Além disto, assim como no trabalho citado, foi possível determinar a
636 maior habilidade para utilização de fontes de carbono e de resistência a substâncias
637 inibitórias por *Rpsol*, no entanto, nos nossos ensaios nenhuma diferença na velocidade
638 de utilização desses compostos foi observada entre espécies de *Ralstonia*. A habilidade
639 de *Rpsol* para utilizar uma ampla variedade de compostos orgânicos como fonte de
640 energia já havia sido relatada anteriormente (Silva, 2014; Wang et al., 2019), essa maior
641 versatilidade bioquímica encontrada nos isolados de *Rpsol* indica maior adaptabilidade
642 bioquímica comparada a *Rsol* e representa uma vantagem para o estabelecimento e
643 sobrevivência dessa espécie em ambientes mais diversos.

644 Os biofilmes bacterianos constituem o estilo de vida predominante das bactérias
645 na maioria dos ecossistemas naturais e patogênicos (Costerton, 1987), sendo
646 considerados um dos mais bem-sucedidos modos de vida na Terra (Flemming et al.
647 2016). Isolados das duas espécies variaram quanto a habilidade em formar biofilmes,
648 apresentando diferentes graus para essa característica, entre fracos, moderados e fortes
649 formadores. Variação intraespecífica é comumente observada em trabalhos dessa
650 natureza com diversas fitobactérias incluindo *Ralstonia* spp. (Rossato, 2016; Malafaia et
651 al., 2018). Essa variação ocorre porque a formação de biofilme é uma característica
652 muitas vezes isolado-específica, pois depende de fatores inerentes ao isolado envolvido,
653 como a produção de indutores de biofilme que pode variar entre isolados (Kumar et al.,
654 2015). Além disto, a formação de biofilme é fortemente influenciada por fatores
655 ambientais (Martínez e Vadyvaloo 2014), dentre eles, a disponibilidade de nutrientes

656 (Petrova e Sauer, 2012; Sena-Vélez et al. 2015; Ghosh, Barman e Mandal, 2019), que
657 explica a diferença na habilidade de formação de biofilme de um mesmo isolado entre
658 os meios de cultura avaliados, semelhante ao observado por Malafaia et al. (2018) ao
659 testarem os mesmos meios de cultura deste experimento com diferentes isolados de
660 *Ralstonia* spp..

661 De modo geral, *Rsol* apresentou maior habilidade na formação de biofilmes, haja
662 vista a capacidade de formá-los em todas as condições avaliadas, contrário ao observado
663 em *Rpsol* que no meio Kelman alguns isolados não aderiram à superfície e não
664 formaram biofilme. Ademais, na melhor condição para formação de biofilme (meio
665 NYD), os isolados de *Rsol* foram classificados entre moderados e fortes formadores,
666 diferente de *Rpsol* onde 30% dos isolados foram fracos formadores. A maior habilidade
667 para formação de biofilme incrementa a adaptabilidade ecológica da bactéria devido às
668 propriedades inerentes a esse modo de vida, entre elas destacam-se a maior tolerância a
669 condições adversas, incluindo resistência à dessecação e altas concentrações de agentes
670 antimicrobianos, possibilidade de transferência horizontal de genes e execução de
671 determinados processos que necessitam de alta densidade populacional (Darnhorn e
672 Fuqua, 2007; Lebeaux et al., 2013).

673 Em bactérias fitopatogênicas os biofilmes podem atuar como um fator de
674 virulência em estágios iniciais de colonização e infecção (Flemming e Wingender,
675 2010; Guttenplan e Kearns, 2013), todavia, pelos resultados aqui obtidos, a formação de
676 biofilme não pareceu estar associada a altos níveis de agressividade nem a amplo perfil
677 de virulência, tal como observado por Rossato (2016). Desse modo, a formação de
678 biofilme é uma vantagem do ponto de vista de adaptabilidade ecológica, especialmente
679 a condições abióticas adversas, não apresentando relação com a adaptabilidade
680 patogênica das espécies avaliadas.

681 A antibiose é uma estratégia conhecidamente utilizada por organismos em
682 competição (Bardgett e van der Putten, 2014). Quando a competição ocorre entre
683 isolados de uma mesma espécie ou de espécies relacionadas, inclui a produção de
684 compostos antimicrobianos coespecíficos, as bacteriocinas (Holtsmark et al., 2008).
685 Diversos estudos já descreveram a produção de bacteriocinas por *Ralstonia* spp.
686 (Cuppels et al., 1978; Chen e Echandi, 1984; Arwiyanto et al., 1993; Huerta et al.,
687 2015), e especialmente pelo nicho ecológico ocupado por essas espécies ser um
688 ambiente limitado em nutrientes, no qual indivíduos relacionados irão competir

689 diretamente por recursos nutricionais, a produção de bacteriocinas é uma estratégia
690 competitiva eficaz (Huerta et al., 2015).

691 Em nossos experimentos, isolados de *Rsol* apresentaram capacidade superior
692 quanto à produção e sensibilidade a bacteriocinas, com maior número de isolados
693 produtores e menor número de isolados sensíveis contrariamente a *Rpsol*. Esse é um
694 atributo de grande valor competitivo, uma vez que Huerta et al. (2015) já evidenciaram
695 por meio de estudos de coinoculação *in vitro* e *in planta*, que isolados de *Ralstonia* spp.
696 produtores de bacteriocinas têm maior aptidão competitiva em caules de tomateiro que
697 isolados não produtores. Isso sugere que na população estudada, isolados de *Rsol*
698 podem ter vantagem competitiva sobre os de *Rpsol*. Um fato curioso em nosso estudo é
699 que todos os isolados sensíveis de *Rpsol* e *Rsol* pertencem às mesmas sequevares, I-18 e
700 IIA-50, respectivamente, podendo indicar que a baixa variabilidade genética de *Rpsol*
701 existente no Brasil (Santiago et al., 2017) torna a população mais sensível às
702 bacteriocinas produzidas por isolados de *Rsol*, que por sua vez foi mais resistente
703 devido a maior variabilidade genética da população. Outra importante observação, é que
704 todos os isolados da sequevar IIA-58 de *Rsol* foram produtores de bacteriocinas,
705 apresentando o maior espectro de ação, atingindo o maior número de isolados de *Rpsol*
706 e causando os maiores valores de inibição, sendo esta sequevar até o momento só
707 detectada na região semiárida de Pernambuco, assim como a sequevar I-17 de *Rpsol*
708 (Albuquerque, 2017) que não apresentou sensibilidade a essas bacteriocinas.

709 A adaptabilidade patogênica de um fitopatógeno inclui um complexo de
710 características como capacidade de infecção, agressividade e velocidade de colonização
711 dos tecidos do hospedeiro (Antonovics e Alexander, 1989; Leach et al., 2001). Ambas
712 as espécies foram capazes de causar doença em todos os hospedeiros testados,
713 demonstrando baixa diversidade patogênica, com a maioria dos isolados causando
714 doenças em pelo menos três hospedeiros, caracterizando-os como pertencentes ao grupo
715 de isolados de ampla gama de hospedeiros (Celier e Prior, 2010). Apesar disto, um
716 maior número de isolados de *Rpsol* foram capazes de causar doenças nesses
717 hospedeiros, especialmente ao jiloeiro que é considerada uma solanácea rústica,
718 apresentando maior resistência a maioria dos isolados. Assim como nos resultados de
719 Silva (2014), os isolados provenientes de jiloeiro foram patogênicos aos quatro
720 hospedeiros, evidenciando o que já havia sido enunciado no trabalho mencionado, que
721 isolados de jiloeiro são emergentes, pois para infectá-lo passaram por um período de

722 adaptação na virulência. Atualmente descreve-se *Rpsol* como a espécie que afeta o
723 maior número de hospedeiros e que possui grande plasticidade de virulência (Wicker et
724 al., 2012).

725 As espécies não diferiram significativamente entre os componentes
726 epidemiológicos da murcha bacteriana em tomateiro, no entanto, podemos destacar que
727 *Rpsol* obteve os menores valores de período de incubação e incidência, duas
728 importantes variáveis para a murcha bacteriana. Todavia, os resultados demonstraram
729 que a agressividade é uma característica inerente ao isolado, portanto, a reprodução *in*
730 *planta* de isolados classificados como altamente e pouco agressivos foi analisada por
731 meio da densidade populacional durante a colonização em raízes e caules de tomateiro.

732 Entre as propriedades invasivas dos isolados, detectamos que a velocidade de
733 penetração esteve relacionada à espécie e não ao nível de agressividade, uma vez que
734 ambos os isolados de *Rpsol* invadiram os tecidos do hospedeiro mais rápido e
735 necessitaram de menos tempo que o isolado agressivo de *Rsol* para colonizarem e
736 atingirem a população máxima nas raízes. Nosso resultado corrobora com Zheng et al.
737 (2017), que não encontraram diferença na velocidade de invasão dos tecidos entre
738 isolados virulento e avirulento, entretanto, diferiram na velocidade de colonização, com
739 o isolado virulento atingindo o pico populacional mais rápido. Entretanto, é importante
740 salientar que esta observação não se aplicou à densidade populacional máxima dos
741 isolados nas raízes, apenas à velocidade de penetração e colonização. O resultado obtido
742 pode explicar o menor período de incubação atribuído a *Rpsol*. Além do mais, não
743 verificamos colonização por parte do isolado CCRMRs107 de *Rsol* durante o período
744 avaliado, caracterizando pouca aptidão para invadir e colonizar o hospedeiro, por isto
745 atribuímos esse motivo a sua baixa agressividade.

746 Quaisquer diferenças de crescimento entre isolados na planta podem resultar de
747 interações competitivas entre eles, ou de diferenças inatas na capacidade de colonizar
748 rizosferas e caules de tomate (Huerta et al., 2015). Isso explica o fato da colonização
749 dos isolados ter se relacionado ao nível de agressividade deles e não às espécies as quais
750 pertencem, uma vez que isolados altamente agressivos atingiram populações
751 significativamente superiores aos isolados menos agressivos. Independentemente do
752 nível de agressividade, os dois isolados de *Rpsol* atingiram populações maiores, ainda
753 que não tenham apresentado diferença significativa dos isolados de *Rsol* com nível de
754 agressividade correspondente. Isso pode ser justificado devido à penetração desses

755 isolados no hospedeiro ocorrer mais rapidamente, como discutido anteriormente, o que
756 proporcionou a esses isolados atingirem densidades populacionais máximas mais cedo
757 durante o processo infeccioso quando comparado aos isolados de *Rsol*.

758 Podemos deduzir que a adaptabilidade de um organismo não é absoluta, se trata
759 de uma característica complexa regulada por diversos fatores. No entanto, entender os
760 fatores ambientais que envolvem o indivíduo é importante para fazer previsões da
761 tolerância ecológica acerca do indivíduo estudado (Balodi et al., 2017). Com base em
762 nossos resultados, nós atribuímos a emergente prevalência de *Rpsol* na mesorregião
763 Agreste do semiárido de Pernambuco principalmente a seus atributos patogênicos, como
764 a habilidade de infectar diferentes hospedeiros e maior velocidade de penetração e
765 colonização, além de utilizar uma maior quantidade de compostos orgânicos. No
766 entanto, os isolados de *Rsol* demonstraram maior plasticidade adaptativa,
767 provavelmente devido a maior variabilidade genética existente nessa população
768 (Albuquerque, 2017; Santiago et al., 2017), exibindo leve superioridade quanto às
769 condições fisiológicas, indicando maior adaptabilidade a diferentes condições
770 ambientais de temperatura, pH e salinidade, além de maior adaptabilidade ecológica
771 pela produção de biofilme e bacteriocinas amplamente efetivas contra *Rpsol*, que pode
772 oferecer vantagens competitivas. Os isolados de *Rsol* são nativos do Brasil (Wicker et
773 al., 2012) o que justifica sua prevalência nas demais mesorregiões do semiárido de
774 Pernambuco (São Francisco e Sertão) (Albuquerque, 2017).

775 Em conclusão, podemos inferir que na população estudada *Rpsol* possuiu maior
776 adaptabilidade patogênica e bioquímica enquanto *Rsol* maior adaptabilidade fisiológica
777 e ecológica. Portanto, devido às diferentes vantagens adaptativas apresentadas pelas
778 duas espécies, não existem indícios para concluir que, neste momento, uma delas possui
779 capacidade de extinguir ou declinar a população da outra no estado de Pernambuco.

780

781 **Agradecimentos**

782 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela
783 concessão da bolsa de Mestrado a Pedro H. R. Silva e a Fundação para o Apoio à
784 Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de
785 Fixação de Pesquisadores à Greecy M. R. Albuquerque (Proc. BFP 0158-5.01 / 16).

786

787

788 **Referências Bibliográficas**

- 789 Albuquerque GMR (2014) Diversidade de *Ralstonia* spp. em Pernambuco, resistência
790 de tomateiros silvestres à murcha bacteriana e expressão gênica na quebra de
791 resistência. Tese, Universidade Federal Rural de Pernambuco
- 792 Alkan N, Espeso EA, Prusky D (2013) Virulence regulation of phytopathogenic fungi
793 by pH. *Antioxid. Redox Signal* 19:1012-1025
- 794 Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G (2014) Köppen's
795 climate classification map for Brazil. *Meteorol Z* 22:711-728
- 796 Antonovics J, Alexander HM (1989) The concept of fitness in plant fungal pathogen
797 systems. In: Leonard KJ, Fry WE (eds) *Plant disease epidemiology*, 2nd edn.
798 McGraw-Hill, New York, pp 185-214
- 799 Arwiyanto T, Goto M, Takikawa Y (1993) Characteristics of bacteriocins produced by
800 *Pseudomonas solanacearum*. *Ann Phytopath Soc Jpn* 59:114-122
- 801 Balodi R, Ghatak LV, Bisht S, Shukla N (2017) Reproductive fitness of fungal
802 Phytopathogens: deriving co-evolution of host-pathogen systems. In: Ghatak A,
803 Ansar M (eds) *The phytopathogen: evolution and adaptation*. Apple Academic Press,
804 Waretown, pp 41-64
- 805 Barbosa HR, Torres BB (2010) Nutrição e metabolismo bacterianos. In: Trabulsi LR et
806 al. (eds) *Microbiologia*, 3rd edn. Atheneu, São Paulo, pp 25-54
- 807 Barbosa JC, Maldonado Júnior W (2015) Software AgroEstat: Sistema de análises
808 estatísticas de ensaios agrônômicos. FCAV/UNESP, Jaboticabal
- 809 Bardgett RD, van der Putten WH (2014) Belowground biodiversity and ecosystem
810 functioning. *Nature* 515:505-511
- 811 Beales N, Ogburn E, Betts GD (2001) Extending microbial lag time: the potential to
812 increase product shelf life. Gloucestershire, U.K.: Campden & Chorleywood Food
813 Research Association. R&D Report nr 136
- 814 Bedendo IP, Amorim L, Mattos-Jr D (2018) Ambiente e doença. In: Amorim L,
815 Rezende JAM, Bergamin Filho A (eds) *Manual de Fitopatologia*, 5th edn.
816 Agronômica Ceres, Ouro Fino, pp 93-106
- 817 Bittner RJ, Arellano C, Mila AL (2016) Effect of temperature and resistance of tobacco
818 cultivars to the progression of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*.
819 *Plant Soil* 408:299-310
- 820 Celier G, Prior P (2010) Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum*
821 strains pathogenic to potato. *Phytopathology* 100:1250-1261
- 822 Chen WY, Echandi E (1984) Effects of avirulent bacteriocin producing strains of
823 *Pseudomonas solanacearum* on the control of bacterial wilt of tobacco. *Plant Pathol*
824 33:245-253
- 825 Corrêa RM, Freire MBGS, Ferreira RLC, Freire FJ, Pessoa LGM, Miranda MA, Melo
826 DVM (2009) Atributos químicos de solos sob diferentes usos em perímetro irrigado
827 no semiárido de Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 33(2):305-314

- 828 Costerton JW et al (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*
829 41(1):435–464. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>
- 830 Cuppels DA, Hanson RS, Kelman A (1978) Isolation and characterization of a
831 bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*. *J Gen Microbiol* 109:295-303
- 832 Danhorn T, Fuqua C (2007) Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu Rev*
833 *Microbiol* 61(1):401-422
- 834 Denny TP (2006) Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Gnanamanickam SS (ed)
835 *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht, pp 573-644
- 836 Elphinstone JG (2005) The current bacterial wilt situation: a global overview, In: Allen
837 C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia*
838 *solanacearum* Species Complex, The American Phytopathological Society, St. Paul,
839 pp 9-28
- 840 Fegan M, Prior P (2005) How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species
841 complex". In: Allen C, Hayward AC, Prior P (eds) *Bacterial Wilt Disease and the*
842 *Ralstonia solanacearum* Species Complex, APS Press, St. Paul, pp 449-461
- 843 Felix KCS, Souza EB, Michereff SJ, Mariano RLR (2012) Survival of *Ralstonia*
844 *solanacearum* in infected tissues of *Capsicum annuum* and in soils of the state of
845 Pernambuco, Brazil. *Phytoparasitica* 40:53-62
- 846 Flemming HC, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8(9):623-
847 633
- 848 Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016)
849 *Biofilms: an emergent form of bacterial life*. *Nat Rev Microbiol* 14(9):563-575
- 850 French ER (1986) Interaction between isolates of *Pseudomonas solanacearum* its hosts
851 and the environment. In: Persley GI (ed) *Bacterial wilt disease in Asia and the South*
852 *Pacific*. Proceedings of an International workshop held at PCARD, Los Banos, pp 99-
853 104
- 854 Gallegly Jr ME, Walker JC (1949) Relation of environmental factors to bacterial wilt of
855 tomato. *Phytopathology* 39(11):936-946
- 856 Garcia AL, Lima WG, Souza EB, Michereff SJ, Mariano RLR (2013) Characterization
857 of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt bell pepper in the state
858 Pernambuco, Brasil. *J of Plant Pathol* 95:237-245
- 859 Ghatak LV (2017) Evolution and adaptation in phytopathosystems. In: Ghatak A, Ansar
860 M (eds) *The phytopathogen: evolution and adaptation*. Apple Academic Press,
861 Waretown, pp 4-20
- 862 Gheyi HR (2000) Problemas de salinidade na agricultura irrigada. In: Oliveira TS, Assis
863 Jr. RN, Romero RE, Silva JRC (eds) *Agricultura, sustentabilidade e o semiárido*, 1st
864 edn. Folha de Viçosa/SBCS, Viçosa pp 329-346
- 865 Ghosh R, Barman S, Mandal NC (2019) Phosphate deficiency induced biofilm
866 formation of *Burkholderia* on insoluble phosphate granules plays a pivotal role for
867 maximum release of soluble phosphate. *Scientific Reports* 9(1):5477

- 868 Giraud T (2006) Selection against migrant pathogens: the immigrant inviability barrier
869 in pathogens. *Heredity* 97:316-18
- 870 Gladieux P, Guerin F, Giraud T, Caffier V, Lemaire C, et al (2011) Emergence of novel
871 fungal pathogens by ecological speciation: importance of the reduced viability of
872 immigrants. *Mol Ecol* 20:4521-32
- 873 Grey BE, Steck TR (2001) The viable but nonculturable state of *Ralstonia*
874 *solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Appl*
875 *Environ Microbiol* 67:3866-3872
- 876 Guttenplan SB, Kearns DB (2013) Regulation of flagellar motility during biofilm
877 formation. *FEMS Microbiol Rev* 37(6):849-871
- 878 Hacisalihoglu G, Momol MT, Wen A, Olson S (2009) Effect of pH on bacterial wilt
879 incidence and plant growth in hydroponic tomato. *Int Symp Tomato Dis* 808(1):301-
880 305
- 881 Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by
882 *Pseudomonas solanacearum*. *Ann Rev Phytopathol* 29:65-87
- 883 Hayward AC (1994a) Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and
884 related bacteria. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) *Bacterial Wilt: The disease and*
885 *its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, CAB International, Wallingford pp
886 123-135
- 887 Hayward AC (1994b) The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward AC,
888 Hartman GL (eds) *Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas*
889 *solanacearum*, CAB International, Wallingford pp 9-24
- 890 He K, Yang SY, Li H, Wang H, Li ZL (2014) Effects of calcium carbonate on the
891 survival of *Ralstonia solanacearum* in soil and control of tobacco bacterial wilt. *Eur*
892 *J Plant Pathol* 140(4):665-675
- 893 Holtsmark I, Eijsink VGH, Brurberg MB (2008) Bacteriocins from plant pathogenic
894 bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 280(1):1-7
- 895 Huerta AI, Milling A, Allen C (2015) Tropical Strains of *Ralstonia solanacearum*
896 Outcompete Race 3 Biovar 2 Strains at Lowland Tropical Temperatures. *Applied and*
897 *Environmental Microbiology* 81(10):3542-3551
- 898 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2020) SIDRA: Sistema IBGE de
899 recuperação automática. Online: <https://sidra.ibge.gov.br/territorio#/N8>. Acesso em:
900 27 jan. 2020
- 901 Kumar JS, Umesha S, Prasad KS, Niranjana P (2015) Detection of Quorum Sensing
902 Molecules and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. *Current Microbiology*.
903 doi:10.1007/s00284-015-0953-0
- 904 Leach JE, Cruz CMV, Bai JF, Leung H (2001) Pathogen fitness penalty as a predictor
905 of durability of disease resistance genes. *Annu Rev Phytopathol* 39:187-224
- 906 Lebeau A, Daunay MC, Frarry A, Palloix A, Wang JF, Dintinger J, Chiroleu F, Wicker
907 E, Prior P, 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic

- 908 resourcers respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex.
909 Phytopathology 101:154-165
- 910 Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C (2013) From *in vitro* to *in vivo* Models
911 of Bacterial Biofilm-Related Infections. Pathog 2(2):288-356
- 912 Li S, Xu C, Wang J, Guo B, Yang L, Chen J et al. (2017) Cinnamic, myristic and
913 fumaric acids in tobacco root exudates induce the infection of plants by *Ralstonia*
914 *solanacearum*. Plant. Soil. 412, 1-15
- 915 Lopes CA, Boiteux LS (2012) Melhoramento para resistência a doenças bacterianas. In:
916 Fritsche-Neto R, Borém A (eds) Melhoramento de Plantas para Condições de
917 Estresses Bióticos, Suprema, Visconde do Rio Branco, pp 61-88
- 918 Lopes CA, Boiteux LS (2016) Melhoramento genético visando resistência à murcha
919 bacteriana. In: Gama MAS, Nicoli A, Guimarães LMP, Lopes UP, Michereff SJ
920 (eds) Estado da Arte em Fitobacterioses Tropicais, EDUFRPE, Recife, pp 257-274
- 921 Lopes CA, Duval AMQ (2007) Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças.
922 In: Zambolim L, Lopes CA, Picanço MC, Costa H (eds) Manejo Integrado de
923 Doenças e Pragas. 1st edn. UFC, Viçosa, pp 115-162
- 924 Lopes CA, Rossato M (2018) History and Status of Selected Hosts of the *Ralstonia*
925 *solanacearum* Species Complex Causing Bacterial Wilt in Brazil. Front Microbiol
926 9:1228
- 927 Lopes JFB, Andrade E, Chaves LCG (2008) Impacto da irrigação sobre os solos de
928 perímetros irrigados na bacia do Acaraú, Ceará, Brasil. Engenharia Agrícola, 28:34-
929 43
- 930 Malafaia CB, Barros MP, Macedo AJ, Guerra ML, Souza EB, Correia MTS, Silva MV
931 (2018) Biofilm Formation by Phytopathogenic Bacteria *Acidovorax citrulli* and
932 *Ralstonia solanacearum*. Journal of Environmental Analysis and Progress 3(4):347-
933 355
- 934 Martinez LC, Vadyvaloo V (2014) Mechanisms of post-transcriptional gene regulation
935 in bacterial biofilms. Front Cell Infect Microbiol 4:38
- 936 McKinney HH (1923) Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat
937 seedlings by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research 26:195-
938 217
- 939 Mehan VK, Liao BS, Tan YJ, Robinson-Smith A, McDonald D, Hayward AC (1994)
940 Bacterial wilt of groundnut. Internacional Crops Research Institute for the Semi-Arid
941 Tropics, 25 p. (ICRISAT Information Bulletin, 35)
- 942 Morais RF (2018) Estrutura genética de *Ralstonia pseudosolanacearum* no estado de
943 Pernambuco. Dissertação, Universidade Federal Rural de Pernambuco
- 944 Nelson RR (1979) The evolution of parasitic fitness. In: Horsfall JG, Cowling EB (eds)
945 Plant disease: an advanced treatise: How pathogens induce disease. Academic Press,
946 New York, pp 23-46
- 947 Nielsen LW, Haynes FL (1960) Resistance in *Solanum tuberosum* to *Pseudomonas*
948 *solanacearum*. Am Potato J 37:260-267

- 949 Petrova OE, Sauer K (2012) Sticky situations: key components that control bacterial
950 surface attachment. *J Bacteriol* 194(10):2413-2425
- 951 Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B, Allen C, 2016. Genomic and
952 proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia*
953 *solanacearum* into three species. *BMC Genomics* 17:90-101
- 954 Ramesh CR, Bandyopadhyay AK (1993) Bacterial wilt potential of soils of Andaman
955 and Nicobar Islands. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) *Bacterial wilt*, ACIAR
956 Proceedings, Canberra, pp 355-361
- 957 Ribeiro MR (2010) Origem e classificação dos solos afetados por sais. In: Gheyi HR
958 Dias NS, Lacerda CF (eds) *Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e*
959 *aplicados*, INCTSal, Fortaleza, pp 11-19
- 960 Rossato M (2016) Espécies de *Ralstonia* no Brasil: Caracterização fenotípica,
961 molecular, novas fontes de resistência em tomateiro e patogenicidade em cafeeiro.
962 Tese, Universidade de Brasília
- 963 Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L, Kappler U (2014) Polyphasic
964 taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to
965 emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and
966 reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R.*
967 *solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp.
968 nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*
969 subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia*
970 *pseudosolanacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:3087-3103
- 971 Santiago TR, Lopes CA, Caetano-Anollés G, Mizubuti ES (2017) Phylotype and
972 sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient center of
973 diversity of the pathogen. *Plant Pathol* 66:383-392
- 974 Sena-Vélez M, Redondo C, Gell I, Ferragud E, Johnson E, Graham JH, Cubero J (2015)
975 Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host
976 range. *Plant Pathol* 64:767-775
- 977 Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of
978 slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* 70:1183-1186
- 979 Silva JR (2014) Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões Norte e
980 Nordeste do Brasil. Dissertação, Universidade Federal Rural de Pernambuco
- 981 Singh D, Yadav DK, Sinha S, Choudhary G (2014) Effect of temperature, cultivars,
982 injury of root and inoculum load of *Ralstonia solanacearum* to cause bacterial wilt
983 of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(13):1574-1583
- 984 Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M (2000) A modified
985 microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J*
986 *Microbiol Methods* 40(2):175-179
- 987 Tortora GJ et al (2017) Crescimento microbiano. In: Tortora GJ et al. (eds)
988 *Microbiologia*, 12th edn. Artmed, Porto Alegre, pp 149-175
- 989 Trentin DS, Giordani RB, Zimmer KR, Silva AG, Silva MV, Correia MT, Baumvol IJ,
990 Macedo AJ (2011) Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region

- 991 (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles.
992 Journal Ethnopharmacology 137:327-335
- 993 Wang HC, Guo H, Cai L, Cai LT, Guo YS, Ding W (2019) Effect of temperature on
994 phenotype characterization of *Ralstonia solanacearum* from tobacco. Can. J. Plant
995 Pathol. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1654547>
- 996 Wang HC, Yu J, Cai LT, Lu N (2017) Effect of temperature, relative humidity,
997 inoculum amount and pH on pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* on tobacco.
998 Chin Tob Sci 38(5):8-12
- 999 Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M, Prior P
1000 (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies)
1001 exhibiting a new pathogenic potential. Applied and Environmental Microbiology
1002 73(21):6790-6801
- 1003 Wicker E, Lefeuvre P, Cambiaire JC, Lemaire C, Poussier S, Prior P (2012) Contrasting
1004 recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia*
1005 *solanacearum* inferred from MLSA. ISME J. 6:961-74
- 1006 Zhan J, McDonald BA (2013) Experimental measures of pathogen competition and
1007 relative fitness. Annu Rev Phytopathol 51:131-153
- 1008 Zheng X, Zhu Y, Liu B, Lin N, Zheng D (2017) Invasive properties of *Ralstonia*
1009 *solanacearum* virulent and avirulent strains in tomato roots. Microbial Pathogenesis
1010 113:144-151

Tabela 1 Isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* do Estado de Pernambuco, Brasil, incluídos neste estudo

Isolado ^a	Espécie	Mesorregião ^b	Município	Hospedeiro	Biovar ^c	Sequevar ^d	Haplótipo ^e
CCRMRs76	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Mata	Chã Grande	Jiló	3	I-17	ND
CCRMRs83	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Metropolitana	Recife	Berinjleira	3	I-17	ND
CCRMRs128	<i>R. pseudosolanacearum</i>	São Francisco	Belém de São Francisco	Tomateiro	3	I-17	30
CCRMRs28	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Mata	Chã Grande	Pimentão	3	I-18	37
CCRMRs46	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Sairé	Pimentão	3	I-18	23
CCRMRs218	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Berinjleira	3	I-18	23
CCRMRs95	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	3	I-18	23
CCRMRs66	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Mata	Chã Grande	Berinjleira	3	I-18	25
CCRMRs118	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Agreste	Gravatá	Tomateiro	3	I-18	25
CCRMRs74	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Mata	Chã Grande	Jiló	3	I-18	18
CCRMRs129	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Belém de São Francisco	Tomateiro	1	IIA-50	4
CCRMRs161	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	IIA-50	5
CCRMRs185	<i>R. solanacearum</i>	São Francisco	Petrolina	Tomateiro	1	IIA-50	1
CCRMRs91	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	1	IIA-58	22
CCRMRs92	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	1	IIA-58	9
CCRMRs107	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Camocim de São Félix	Tomateiro	1	IIA-58	4
CCRMRs85	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Caruaru	Tomateiro	1	IIA-59	1
CCRMRs223	<i>R. solanacearum</i>	Agreste	Bezerros	Tomateiro	1	IIA-59	1

^a Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM) do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE (Pernambuco, Brasil).

^b Classificação segundo IBGE (2020).

^c Biovar dos isolados identificado pelo perfil bioquímico de açúcares e álcoois utilizados pelos isolados (Albuquerque, 2017).

^d Sequevars determinadas pelo relacionamento filogenético de sequências parciais do gene *egl* dos isolados de *Ralstonia* spp. de Pernambuco, Região Nordeste, Brasil. ND – não determinado (Silva, 2014; Albuquerque, 2017).

^e Haplótipos de *Ralstonia* spp. determinados por BOX-PCR para cada espécie (Morais, 2018).

Tabela 2 Temperatura ótima de crescimento *in vitro* de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum*

Espécies	Isolado	Temperatura ótima (°C)^u	Crescimento máximo (DO_{570nm})^u
<i>R. pseudosolanacearum</i>	CCRMRs218	32,2 a ^v	1,16 a ^v
	CCRMRs83	32,0 ab	0,83 cde
	CCRMRs46	31,8 ab	0,69 e
	CCRMRs74	31,7 ab	0,98 bc
	CCRMRs118	31,7 ab	0,73 e
	CCRMRs76	31,5 ab	0,95 c
	CCRMRs128	31,2 ab	0,98 bc
	CCRMRs66	31,0 ab	1,13 ab
	CCRMRs28	30,8 b	0,92 cd
	CCRMRs95	30,0 c	0,77 de
CV (%)		2,60	10,34
<i>R. solanacearum</i>	CCRMRs129	32,1 a ^v	0,98 b ^v
	CCRMRs223	31,6 a	0,78 c
	CCRMRs161	31,4 a	0,67 d
	CCRMRs107	31,0 ab	0,97 b
	CCRMRs185	30,7 ab	1,08 a
	CCRMRs85	29,9 bc	0,51 e
	CCRMRs91	29,8 bc	0,63 d
	CCRMRs92	28,6 c	0,46 e
CV (%)		3,03	6,54

^u Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão polinomial de terceiro grau: $y=a+bx+cx^2+dx^3$. Para parâmetros da regressão e coeficientes de determinação (R^2) consultar Figuras S1 e S2.

^v Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P = 0,05$).

Tabela 3 Comparação de temperaturas ótimas e faixa de temperaturas ótimas para crescimento *in vitro* de *Ralstonia* spp.

Espécie	Temperatura ótima (°C)^t	Crescimento máximo (DO_{570nm})^t	Faixa ótima de crescimento (°C)
<i>R. pseudosolanacearum</i>	31,4 a ^u	0,91 a	30-32
<i>R. solanacearum</i>	31,0 a	0,76 a	29-32

^t Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão polinomial de terceiro grau. *R. pseudosolanacearum*: $y=2,272303274-0,37929214x+0,019995454x^2-0,00029610x^3$, $R^2=0,9261$; *R. solanacearum*: $y=1,026475818-0,19544522x+0,011768085x^2-0,00018535x^3$, $R^2=0,9524$.

^u Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste T para amostras independentes ($P = 0,05$).

Tabela 4 Efeito do nível de pH no crescimento *in vitro* de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rpsol*) e *R. solanacearum* (*Rsol*)

Isolado	pH / Densidade óptica (DO _{570nm})									
	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
Rpsol										
CCRMRs28	0,29 cE	1,07 bA	1,06 dA	0,93 eB	0,92 eB	0,83 gC	0,78 fD	0,87 fC	0,83 cC	0,71 cD
CCRMRs46	0,45 bF	0,71 eE	0,82 fD	0,93 eC	0,99 eC	0,98 fC	1,07 dB	1,18 dA	1,07 bB	0,97 bC
CCRMRs66	0,24 cE	0,81 dD	0,95 eC	1,23 cB	1,41 bA	1,34 cA	1,30 cB	1,43 bA	1,41 aA	1,25 aB
CCRMRs74	0,57 aE	1,41 aA	1,36 bB	1,45 bA	1,43 bA	1,39 cA	1,33 cB	1,26 cC	0,88 cD	0,56 dE
CCRMRs76	0,21 cG	0,80 dF	1,23 cC	1,14 dD	1,30 cB	1,30 dB	1,31 cB	1,43 bA	1,43 aA	1,03 bE
CCRMRs83	0,31 cD	0,94 cB	0,92 eB	0,96 eB	0,84 fC	0,83 gC	1,00 eA	1,06 eA	1,08 bA	0,94 bB
CCRMRs95	0,48 bF	1,00 bB	1,22 cA	1,22 cA	1,17 dA	1,23 dA	1,00 eB	0,91 fC	0,84 cD	0,73 cE
CCRMRs118	0,25 cE	1,11 bB	1,27 cA	1,25 cA	1,25 cA	1,14 eB	1,13 dB	1,05 eB	0,84 cC	0,48 eD
CCRMRs128	0,20 cH	0,88 cF	1,07 dE	1,31 cD	1,58 aB	1,72 aA	1,69 aA	1,68 aA	1,47 aC	0,79 cG
CCRMRs218	0,24 cF	1,05 bD	1,48 aB	1,61 aA	1,52 aB	1,52 bB	1,51 bB	1,39 bC	1,43 aC	0,71 cE
CV (%) = 12,05										
Rsol										
CCRMRs85	0,49 dA	0,56 fA	0,36 eB	0,40 eB	0,43 eB	0,41 fB	0,43 fB	0,43 gB	0,42 gB	0,49 dA
CCRMRs91	1,02 cD	1,21 cC	1,18 cC	1,29 bB	1,18 cC	1,40 bA	1,01 dD	0,99 eD	0,85 eE	0,85 bE
CCRMRs92	1,33 aA	1,04 dB	1,08 dB	0,87 dC	1,00 dB	0,83 eC	0,79 eC	0,63 fD	0,54 fE	0,46 dF
CCRMRs107	1,16 bC	1,32 bB	1,40 bA	1,28 bB	1,34 bA	1,28 cB	1,28 bB	1,19 cC	1,18 bC	0,93 bD
CCRMRs129	0,24 eG	0,70 eE	1,16 cD	1,16 cD	1,28 bC	1,16 dD	1,22 cC	1,50 aA	1,34 aB	0,59 cF
CCRMRs161	1,08 cD	1,36 bA	1,33 bA	1,28 bB	1,32 bA	1,17 dC	1,28 bB	1,23 cB	1,10 cD	1,16 aC
CCRMRs185	1,21 bE	1,64 aB	1,64 aB	1,72 aA	1,54 aC	1,52 aC	1,51 aC	1,39 bD	1,19 bE	1,13 aE
CCRMRs223	1,22 bA	1,14 cB	1,21 cA	1,23 bA	1,17 cB	1,22 cA	1,18 cB	1,12 dB	0,99 dC	0,92 bC
CV (%) = 11,65										

^y Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ($P = 0,05$).

Tabela 5 Efeito da salinidade no crescimento *in vitro* de isolados de *Ralstonia* spp.

Espécie	Isolado	SAL₅₀ (%)^u	Crescimento máximo (DO_{570nm})^v
<i>R. pseudosolanacearum</i>	CCRMRs83	1,16 a ^w	0,83 e ^x
	CCRMRs46	1,04 a	0,92 de
	CCRMRs95	0,92 a	1,03 cd
	CCRMRs28	0,60 b	0,85 e
	CCRMRs66	0,52 bc	1,22 b
	CCRMRs76	0,46 bcd	1,20 b
	CCRMRs218	0,45 bcd	1,51 a
	CCRMRs128	0,42 cd	1,47 a
	CCRMRs74	0,38 cd	1,21 b
	CCRMRs118	0,32 d	1,14 bc
CV (%)		10,36	9,29
<i>R. solanacearum</i>	CCRMRs85	1,32 a ^y	0,49 f ^z
	CCRMRs107	0,85 b	1,38 b
	CCRMRs92	0,85 b	0,85 e
	CCRMRs161	0,68 c	1,20 cd
	CCRMRs223	0,52 d	1,24 cd
	CCRMRs185	0,48 de	1,57 a
	CCRMRs91	0,41 e	1,25 c
	CCRMRs129	0,40 e	1,10 d
CV (%)		6,73	5,82

^u SAL₅₀: Nível de salinidade em que o crescimento bacteriano máximo é reduzido pela metade.

^{u,v} Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão logística de dose-resposta com três parâmetros: $y = a / (1 + (x/b)^c)$. Para parâmetros da regressão e coeficientes de determinação (R^2) consultar Tabela S1.

^{w,x,y,z} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P = 0,05$).

^{w,y} Dados transformados $\text{Arcsen}(\sqrt{(x/100)})$.

^z Dados transformados $\text{Log}(x+1)$.

Tabela 6 Interações entre isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* quanto à produção e sensibilidade a bacteriocinas

Isolado produtor (<i>Rpsol</i>)	Isolado alvo (<i>Rsol</i>)								Isolado produtor (<i>Rsol</i>)	Isolado alvo (<i>Rpsol</i>)								
	CCRMRs85	CCRMRs91	CCRMRs92	CCRMRs107	CCRMRs129	CCRMRs161	CCRMRs185	CCRMRs223		CCRMRs28	CCRMRs46	CCRMRs66	CCRMRs74	CCRMRs76	CCRMRs83	CCRMRs95	CCRMRs118	CCRMRs128
CCRMRs28	^y	-	-	-	-	-	-	-	CCRMRs85	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCRMRs46	-	-	-	-	-	-	-	-	CCRMRs91	-	+	-	+	-	+	+	-	-
CCRMRs66	-	-	-	-	-	-	-	-	CCRMRs92	-	+	-	+	-	+	-	-	-
CCRMRs74	-	-	-	-	-	+	+	-	CCRMRs107	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CCRMRs76	-	-	-	-	-	-	-	-	CCRMRs129	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCRMRs83	-	-	-	-	-	-	-	-	CCRMRs161	-	+	-	+	-	+	-	-	-
CCRMRs95	-	-	-	-	-	-	-	-	CCRMRs185	-	+	-	+	-	+	-	-	-
CCRMRs118	-	-	-	-	-	-	-	-	CCRMRs223	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCRMRs128	-	-	-	-	-	-	-	-										
CCRMRs218	-	-	-	-	-	-	-	-										

^y(+) Reação positiva, (-) reação negativa.

Tabela 7 Inibição de crescimento por bacteriocinas produzidas por isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rpsol*) e *R. solanacearum* (*Rsol*)

Zonas de inibição (mm)				
Isolado produtor (<i>Rpsol</i>)	Isolado alvo (<i>Rsol</i>)			
	CCRMRs161	CCRMRs185		
CCRMRs74	5,3 a ^u	5,8 a		
Isolado produtor (<i>Rsol</i>)	Isolado alvo (<i>Rpsol</i>)			
	CCRMRs46	CCRMRs74	CCRMRs95	CCRMRs118
CCRMRs91	7,8 aB ^y	8,5 aA	5,9 bC	5,3 aD
CCRMRs92	6,2 bB	8,0 aA	6,6 aB	0,0 bC
CCRMRs107	0,0 dB	5,6 cA	0,0 eB	0,0 bB
CCRMRs161	6,4 bA	6,6 bA	5,2 cB	0,0 bC
CCRMRs185	5,6 cA	4,6 dB	4,4 dB	0,0 bC
CV (%) = 8,73				

^u Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste T para amostras independentes ($P = 0,05$).

^y Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de LSD de Fisher ($P = 0,05$).

Tabela 8 Reações patogênicas de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rpsol*) e *R. solanacearum* (*Rsol*) a diferentes solanáceas

Isolado	Hospedeiro de origem	Patogenicidade				
		Berinjela	Jiló	Pimenta	Pimentão	Tomate
<i>Rpsol</i>						
CCRMRs28	Pimentão	+ ^z	-	+	+	+
CCRMRs46	Pimentão	+	-	+	+	+
CCRMRs66	Berinjela	+	+	+	+	+
CCRMRs74	Jiloeiro	+	+	+	+	+
CCRMRs76	Jiloeiro	+	+	+	+	+
CCRMRs83	Berinjela	+	+	+	+	+
CCRMRs95	Tomateiro	+	-	+	+	+
CCRMRs118	Tomateiro	+	-	+	-	+
CCRMRs128	Tomateiro	+	-	+	+	+
CCRMRs218	Berinjela	-	-	+	+	+
<i>Rsol</i>						
CCRMRs85	Tomateiro	+	-	+	+	+
CCRMRs91	Tomateiro	+	-	+	+	+
CCRMRs92	Tomateiro	+	-	-	-	+
CCRMRs107	Tomateiro	+	-	+	+	+
CCRMRs129	Tomateiro	+	-	-	+	+
CCRMRs161	Tomateiro	+	-	+	+	+
CCRMRs185	Tomateiro	+	-	+	+	+
CCRMRs223	Tomateiro	+	+	+	+	+

^z + = Reação positiva, pelo menos três plantas apresentando sintomas de murcha no total de seis plantas.

Tabela 9 Componentes epidemiológicos da murcha bacteriana em tomateiro cv. IPA-6 inoculados com isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rpsol*) e *R. solanacearum* (*Rsol*)

Isolado	Componentes epidemiológicos ^u			
	PI (dias)	INC (%)	IDO _F (%)	AACPD
Rpsol				
CCRMrs95	3,8 a ^v	100,0 a ^v	100,0 a ^x	25,7 a ^v
CCRMrs76	4,3 ab	100,0 a	82,8 cd	20,7 b
CCRMrs66	4,7 bc	100,0 a	90,6 bc	20,6 b
CCRMrs83	4,7 bc	100,0 a	90,6 b	20,5 b
CCRMrs28	5,0 cd	100,0 a	67,2 de	17,8 c
CCRMrs46	5,0 cd	100,0 a	65,6 ef	17,4 c
CCRMrs128	5,5 de	100,0 a	50,0 f	13,7 d
CCRMrs118	6,0 e	84,4 ab	55,5 ef	15,3 d
CCRMrs74	7,8 f	90,6 ab	31,3 g	10,1 e
CCRMrs218	9,3 g	34,4 b	9,4 h	8,6 e
CV (%)	11,0	-	18,4	12,0
Rsol				
CCRMrs91	3,9 a ^v	100,0 a ^v	96,1 a ^v	24,6 a ^v
CCRMrs92	4,3 ab	100,0 a	95,3 a	22,7 b
CCRMrs161	4,5 bc	100,0 a	93,0 a	22,0 b
CCRMrs223	4,6 bc	100,0 a	93,8 a	21,3 b
CCRMrs185	4,9 c	100,0 a	68,8 b	17,6 c
CCRMrs85	6,4 d	96,9 a	59,4 c	13,6 d
CCRMrs129	8,6 e	46,9 b	16,4 d	9,7 e
CCRMrs107	9,5 f	18,8 c	4,7 e	8,4 e
CV (%)	9,6	14,7	10,9	9,1

^u PI = Período de incubação; INC = incidência da doença; IDO_F = Índice final de doença (McKinney, 1923), calculado a partir da severidade da doença nove dias após a inoculação, baseada em escala descritiva de 1 a 4 adaptada de Nielsen & Haynes (1960); AACPD = área abaixo da curva do progresso da doença (Shaner e Finney, 1977).

^{v,x} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ($P = 0,05$).

^y Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($P = 0,05$).

^x Dados transformados $\text{Arcsen}(\sqrt{(x/100)})$.

Tabela 10 Comparação de componentes epidemiológicos da murcha bacteriana causada por *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* em tomateiro (cv. IPA-6)

Espécies	Componentes epidemiológicos ^t				
	PI (horas)	INC (%)	IDO _I (%)	IDO _F (%)	AACPD
<i>R. pseudosolanacearum</i>	5,6 a ^u	90,9 a ^v	1,9 a ^x	64,3 a ^y	17,0 a ^z
<i>R. solanacearum</i>	5,8 a	82,8 a	2,0 a	65,9 a	17,5 a

^t PI = Período de incubação; INC = incidência da doença; IDO_I e IDO_F = Índice inicial e índice final de doença (McKinney, 1923), calculados a partir da severidade da doença com três e nove dias após a inoculação, respectivamente, baseada em escala descritiva de 1 a 4 adaptada de Nielsen & Haynes (1960); AACPD = área abaixo da curva do progresso da doença (Shaner e Finney, 1977).

^u Dados transformados Log(x+1).

^{u,y,z} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste T para amostras independentes ($P = 0,05$).

^{v,x} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon Soma de Ranking ($P = 0,05$).

^y Dados transformados Arcsen($\sqrt{(x/100)}$).

Tabela 11 Comparação da densidade populacional máxima de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rpsol*) e *R. solanacearum* (*Rsol*) em raízes de mudas de tomateiro cv. IPA-6

Isolado	Agressividade	População máxima (log UFC g ⁻¹ raiz) ^y	DAI _{Pmax} ^y
CCRMRs92	Alta	8,48 a ^z	7,1 c
CCRMRs95	Alta	7,03 ab	4,9 a
CCRMRs218	Baixa	3,85 b	6,2 b
C.V (%)		30,44	7,98

^y Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão polinomial de terceiro grau: $y = a + bx + cx^2 + dx^3$, onde y = população (log UFC g⁻¹ raiz); a , b , c e d são parâmetros da regressão; x = dias após a inoculação (DAI) (CCRMRs92: $y = 0,528519078 - 2,73330422x + 1,231569227x^2 - 0,09703522x^3$, $R^2 = 0,9590$; CCRMRs95: $y = -0,17152374 + 2,593721766x - 0,16131420x^2 - 0,01389158x^3$, $R^2 = 0,9943$; CCRMRs218: $y = -0,00599217 - 0,36020725x + 0,420614289x^2 - 0,04228073x^3$, $R^2 = 0,9999$). DAI_{Pmax} = Dias após a inoculação para alcançar a população máxima.

^z Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de LSD de Fisher ($P = 0,05$).

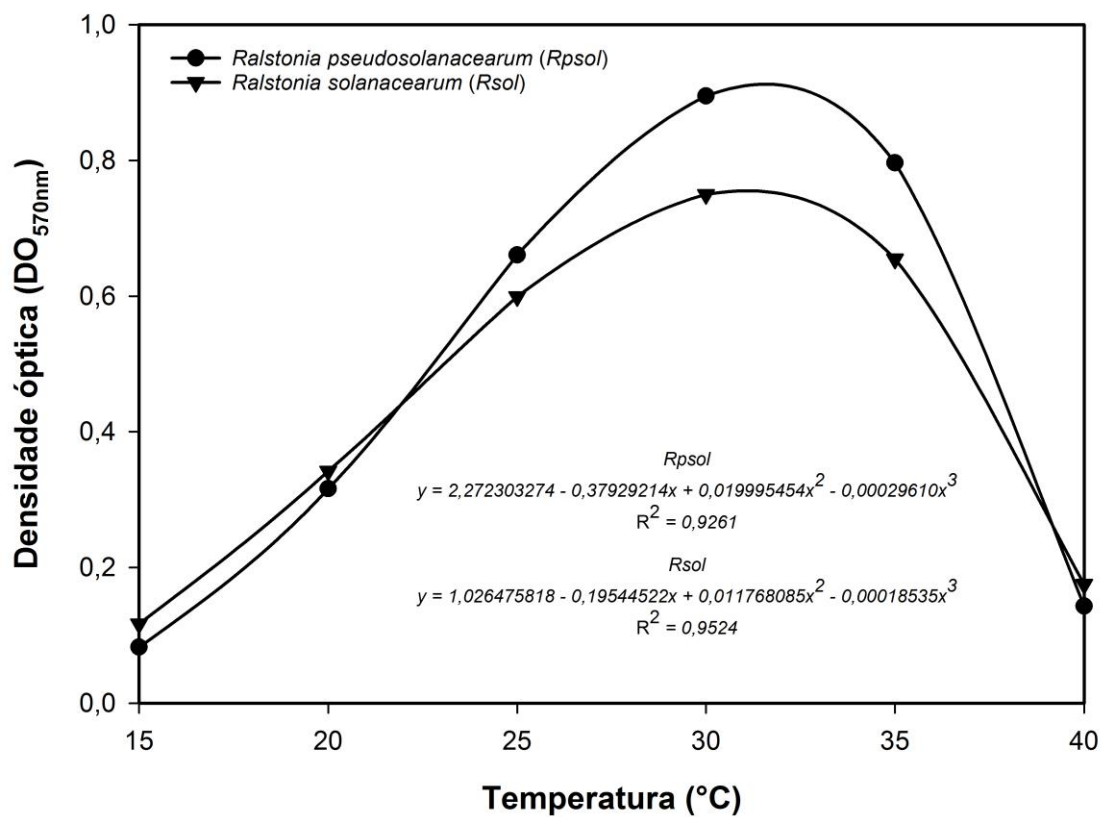


Figura 1 Curva de performance de espécies de *Ralstonia* associadas à murcha bacteriana.

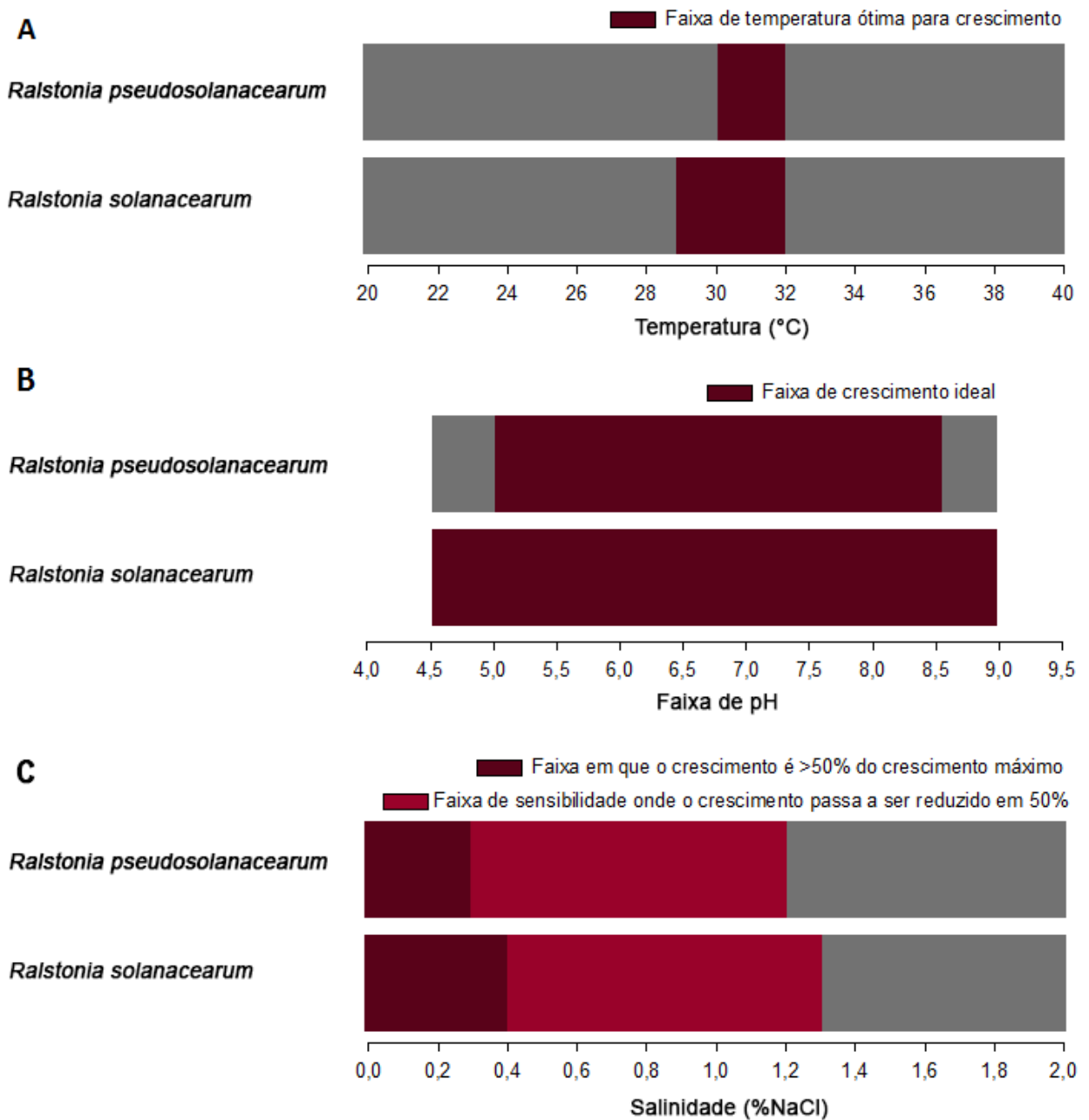


Figura 2 Comparação de condições fisiológicas ideais de temperatura (A), pH (B) e salinidade (C) para *Ralstonia* spp. causadoras de murcha bacteriana em solanáceas.

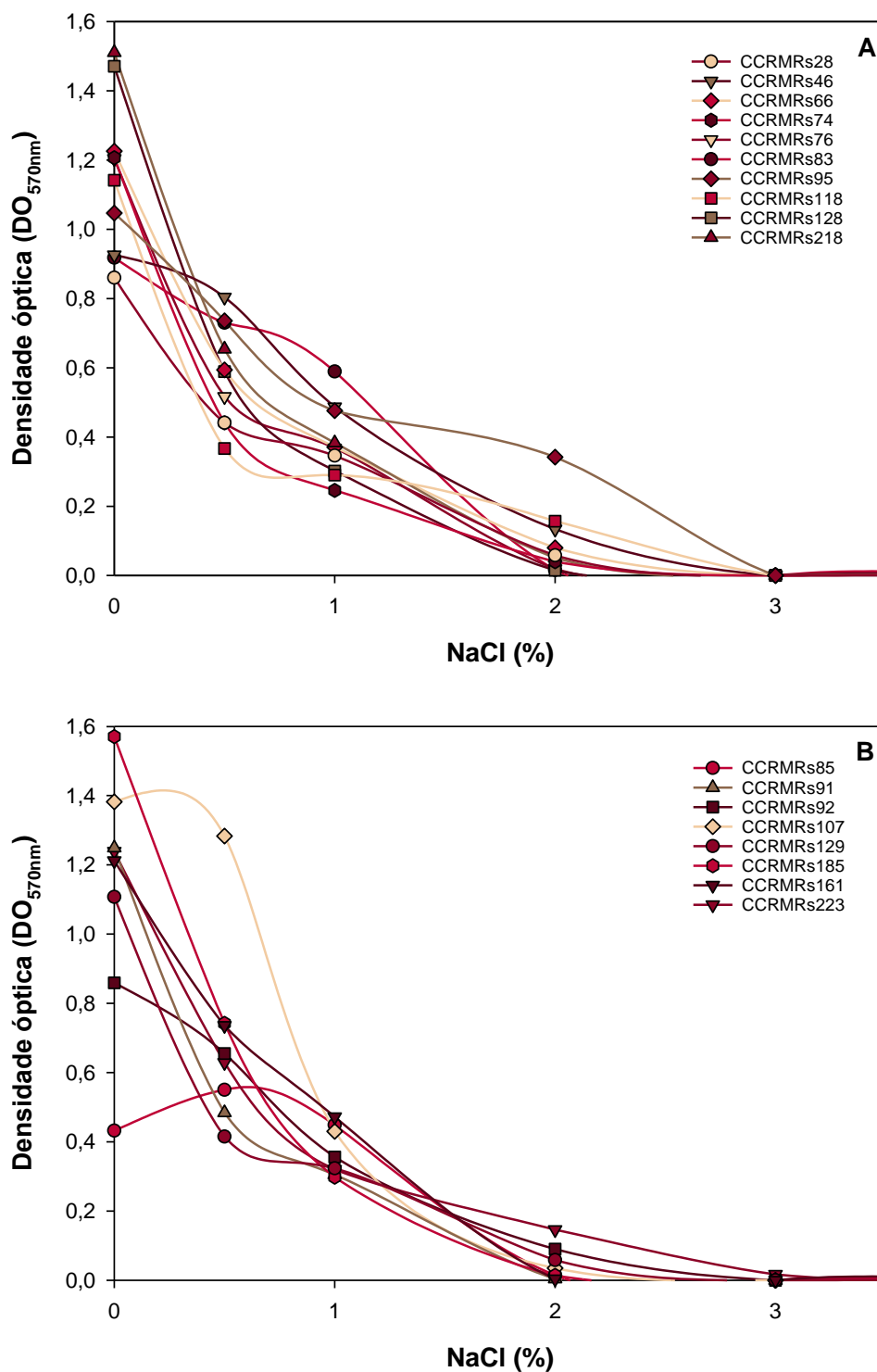


Figura 3 Efeito da salinidade no crescimento de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (A) e *R. solanacearum* (B) *in vitro*.

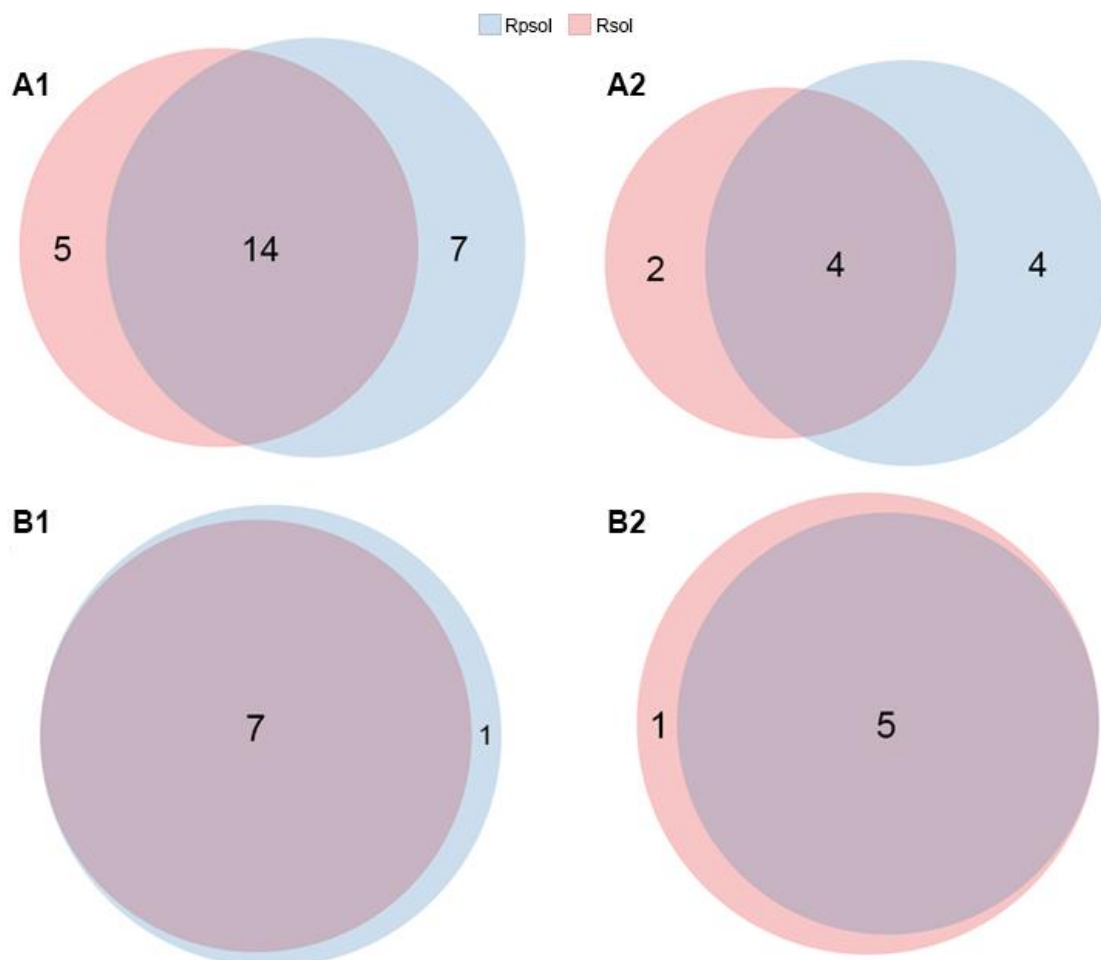


Figura 4 Diagramas de Venn que descrevem o consumo de fontes de carbono (**A**) e resistência a substâncias inibitórias (**B**) compartilhadas ou exclusivas para dez isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rpsol*) e oito isolados de *R. solanacearum* (*Rsol*). (1) Reações positivas representam $\geq 70\%$ dos isolados; (2) Reações positivas representam 100% dos isolados.

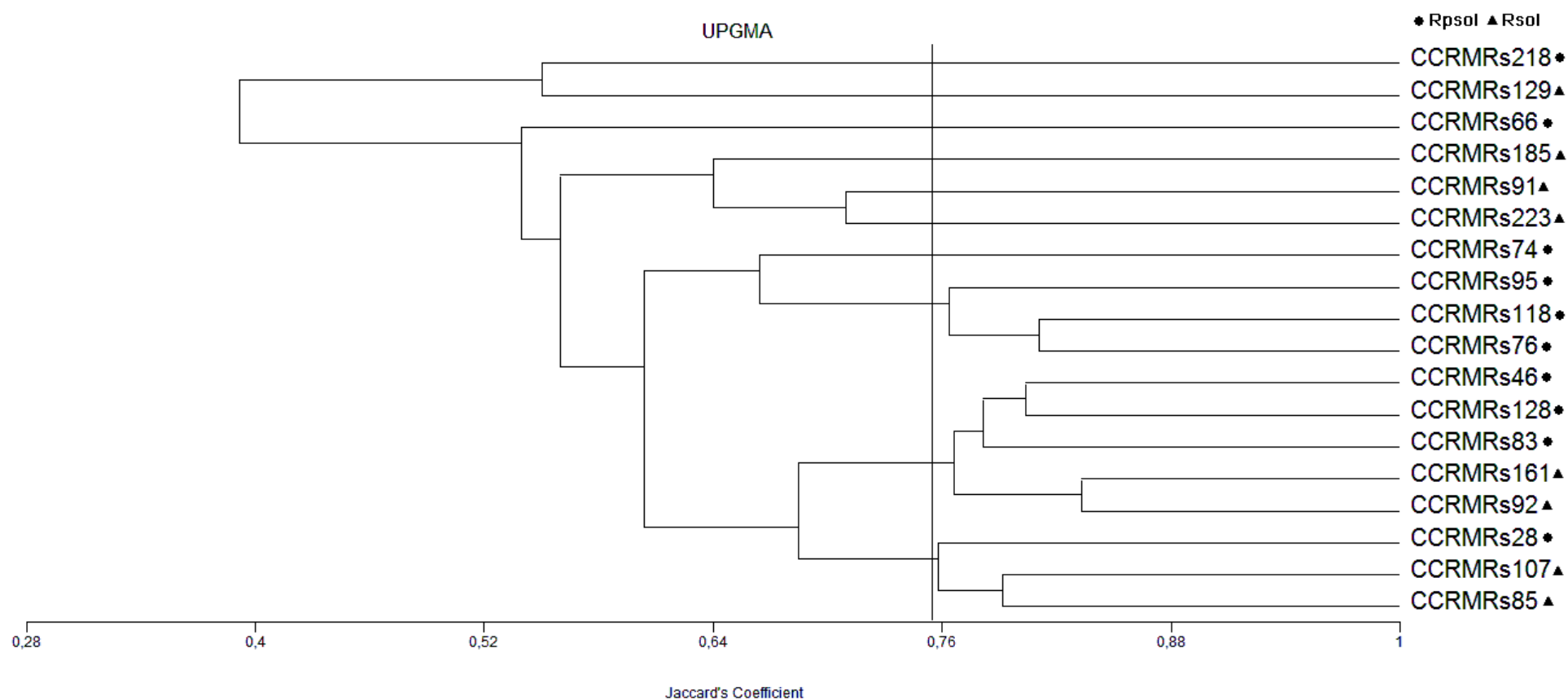
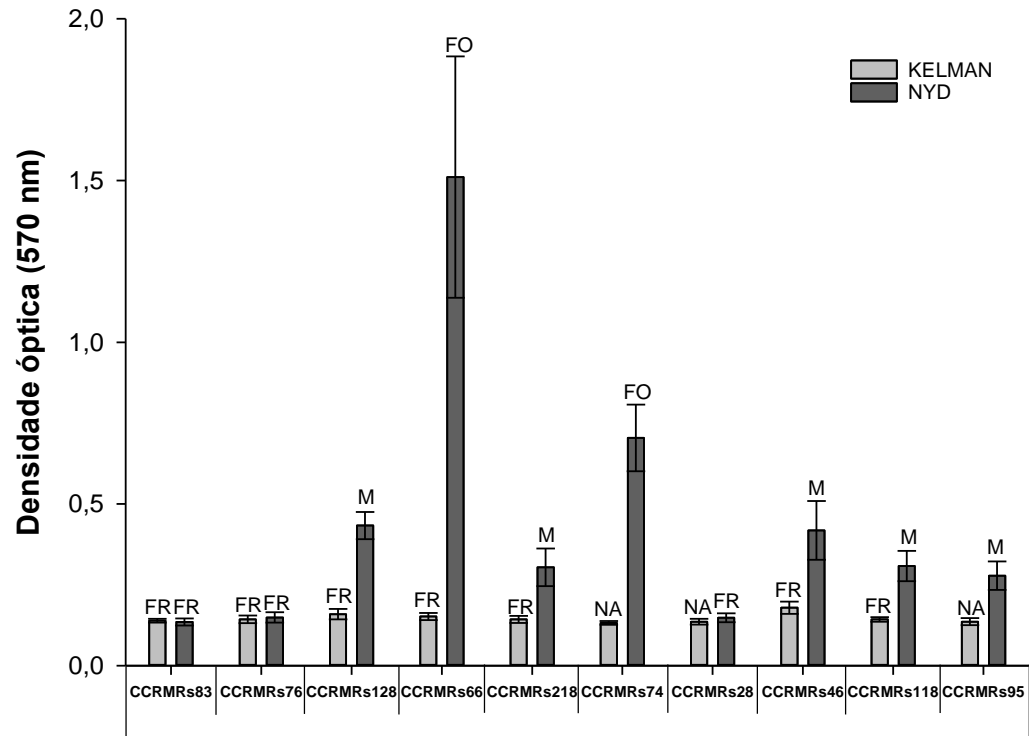


Figura 5 Perfil bioquímico de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rpsol*) e *R. solanacearum* (*Rsol*) utilizando o sistema Biolog GENIII. Dendrograma construído pelo método UPGMA utilizando o software MVSP (3.22.).

A



B

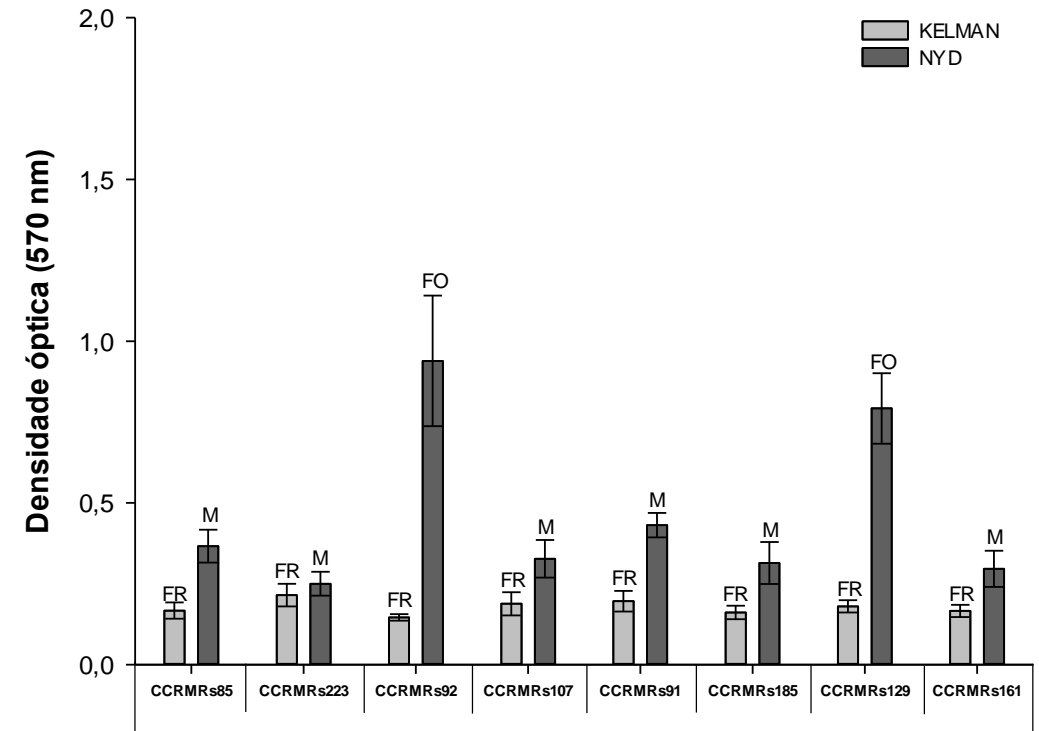


Figura 6 Formação de biofilme por diferentes isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (A) e *R. solanacearum* (B) em microplacas de poliestireno. Meios de cultura: NYD (dextrose-yeast extract) e Kelman. Barras indicam valores da média de dez repetições obtidas de dois experimentos independentes, barras de erro representam o desvio padrão. NA, não aderente; FR, fraco formador; M, moderado formador; FO, forte formador (Stepanović et al., 2000).

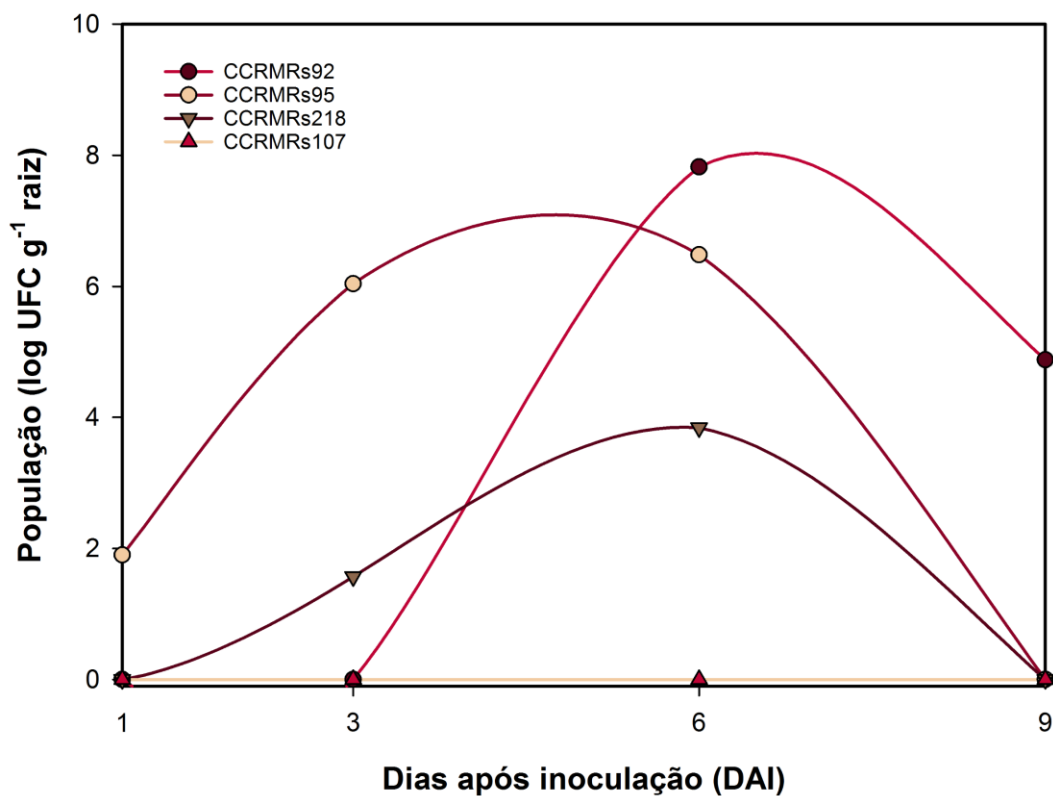


Figura 7 Populações bacterianas de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (CCRMRs95 e CCRMRs218) e *R. solanacearum* (CCRMRs92 e CCRMRs107) com diferentes níveis de agressividade, quantificadas em raízes de mudas de tomateiro cv. IPA-6, em diferentes dias após a inoculação (DAI).

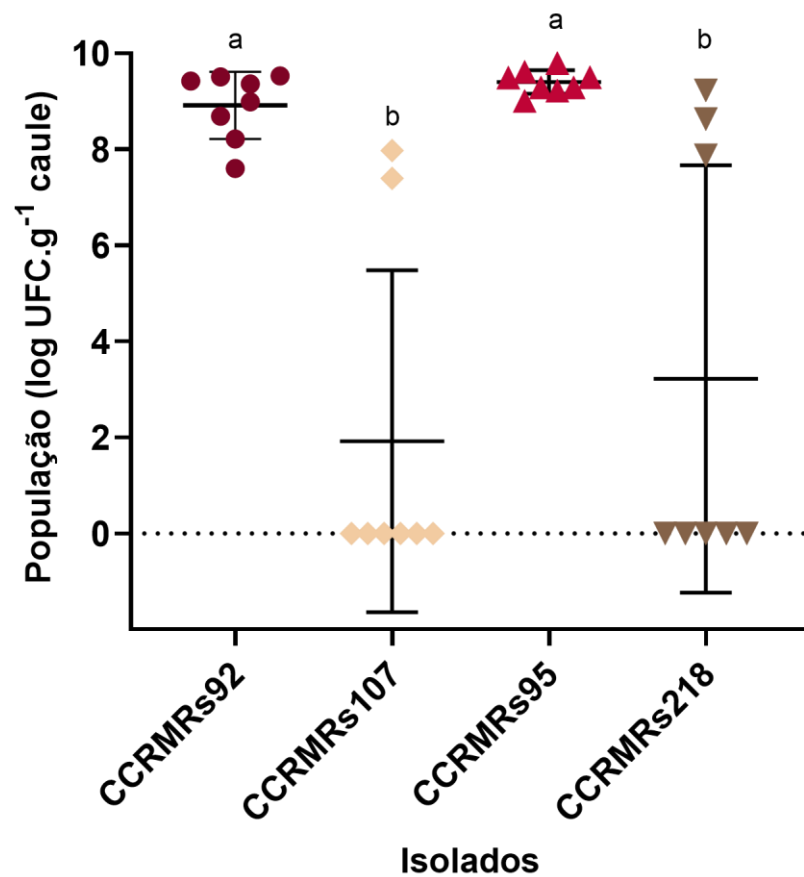


Figura 8 Densidade populacional em caule de tomateiro IPA-6 de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (CCRMRs95 e CCRMRs218) e *R. solanacearum* (CCRMRs92 e CCRMRs107) com diferentes níveis de agressividade, durante o surgimento dos primeiros sintomas de murcha. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ($P = 0,05$).

MATERIAL SUPPLEMENTAR

Tabela S1 Parâmetros da análise de regressão logística de dose-resposta de sais no crescimento de *Ralstonia pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* com três parâmetros

Isolado	Parâmetro ^u			R ²
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	
CCRMRs28	0,850925098	0,597981181	1,740237996	0,9776
CCRMRs46	0,915981034	1,035877104	2,924931159	0,9981
CCRMRs66	1,220726345	0,518691298	1,766621954	0,9915
CCRMRs74	1,206001150	0,376259498	1,710176526	0,9956
CCRMRs76	1,199363363	0,464046518	1,716557242	0,9834
CCRMRs83	0,829438183	1,159051563	5,805641732	0,9866
CCRMRs85	0,491041142	1,317223103	8,500651655	0,9860
CCRMRs91	1,246452965	0,407808665	1,746124796	0,9894
CCRMRs92	0,851768066	0,846298875	2,507331340	0,9979
CCRMRs95	1,028127593	0,916119239	1,864071508	0,9695
CCRMRs107	1,384559042	0,846801241	4,753153235	0,9999
CCRMRs118	1,139188024	0,316802631	1,279123444	0,9839
CCRMRs128	1,468680158	0,417147065	1,894594551	0,9952
CCRMRs129	1,103714432	0,398005880	1,519154426	0,9845
CCRMRs161	1,196113964	0,681528128	2,177230969	0,9832
CCRMRs185	1,569515357	0,482684056	2,235416054	0,9979
CCRMRs218	1,507357127	0,452579029	1,785118479	0,9931
CCRMRs223	1,236299801	0,523165075	1,751207581	0,9965

^u Modelo de regressão logística de dose-resposta com três parâmetros: $y = a / (1 + (x/b)^c)$, em que y = crescimento bacteriano (DO₅₇₀); a , b e c são parâmetros da regressão; x = salinidade. R^2 = coeficiente de determinação.

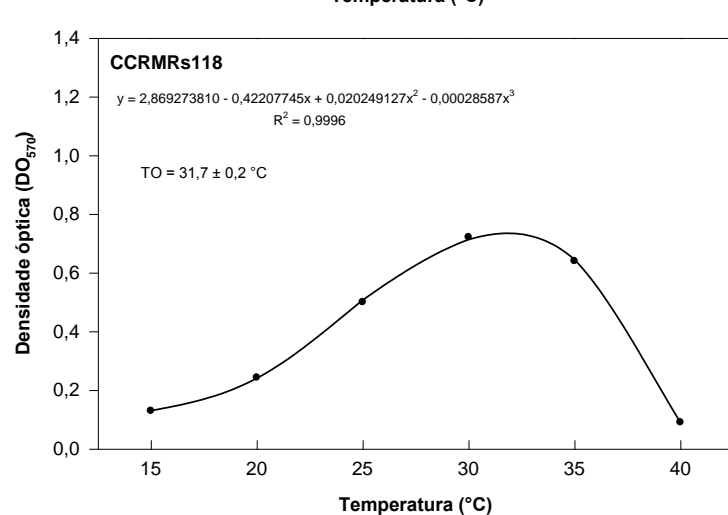
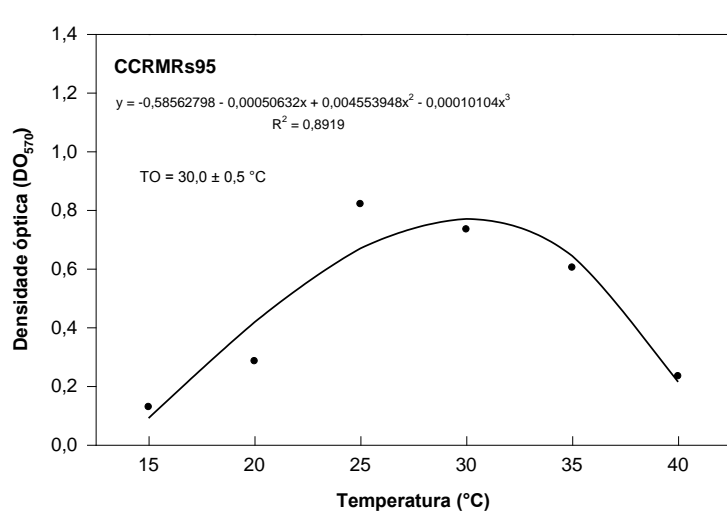
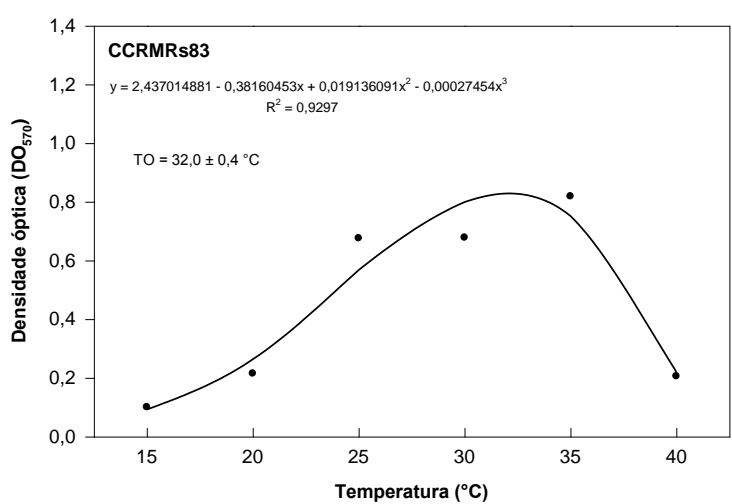
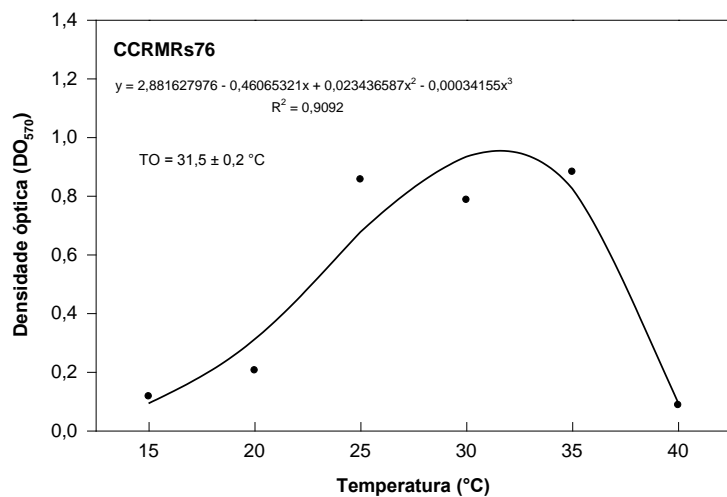
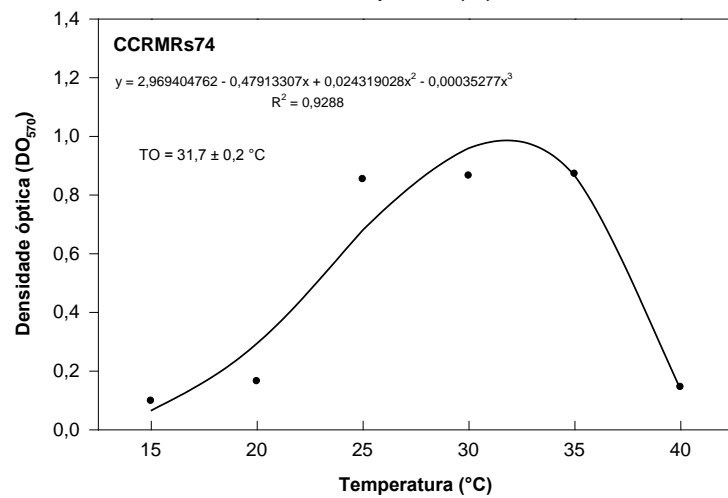
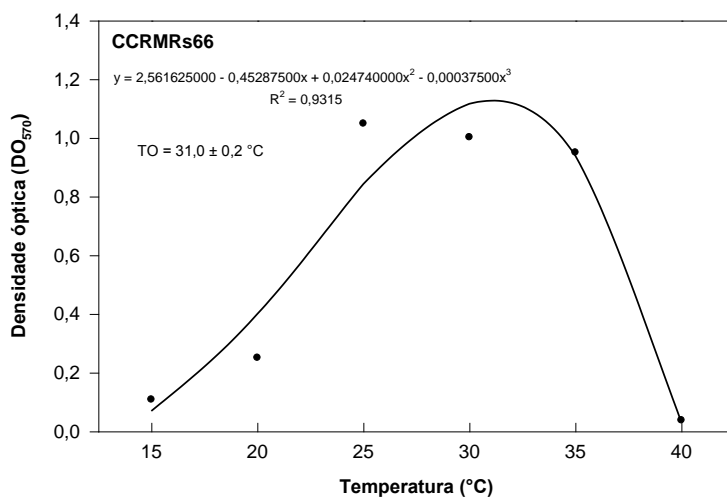
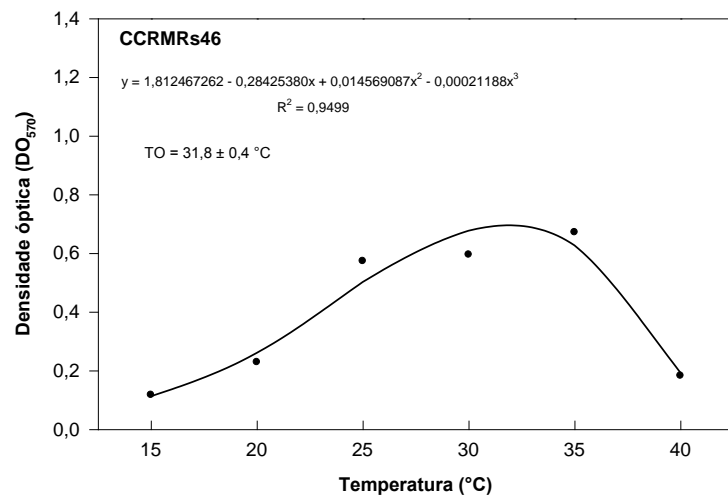
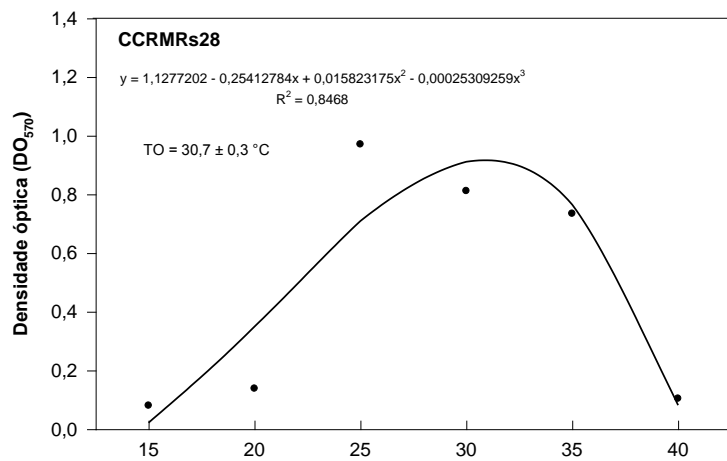
Tabela S2 Perfil de utilização de carboidratos e sensibilidade a substâncias inibitórias de isolados de *Ralstonia* spp. obtidos de solanáceas

Biolog GEN III	<i>R. solanacearum</i>								Reações positivas (%)	<i>R. pseudosolanacearum</i>								Reações positivas (%)		
	CCRMrs85	CCRMrs91	CCRMrs92	CCRMrs107	CCRMrs129	CCRMrs161	CCRMrs185	CCRMrs223		CCRMrs28	CCRMrs46	CCRMrs66	CCRMrs74	CCRMrs76	CCRMrs83	CCRMrs95	CCRMrs118		CCRMrs128	CCRMrs218
Fontes de Carbono																				
3-Metil Glicose	-y	-	+	-	-	+	+	-	37,5	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	30
Ácido acético	+	+	+	+	-	+	+	+	87,5	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	40
Ácido acetoacético	-	+	-	+	-	-	+	+	50	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Ácido bromo-succínico	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Ácido cítrico	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	90
Ácido D-Galacturônico	+	+	+	+	+	+	+	-	87,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	90
Ácido D-glicurônico	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Ácido D-glucônico	+	-	+	+	-	+	+	-	62,5	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	60
Ácido D-Láctico éster metílico	-	-	+	+	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	10
Ácido D-sacárico	+	-	+	+	-	+	+	-	62,5	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	30
Ácido fórmico	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Ácido L-piroglutâmico	+	-	+	+	-	+	-	-	50	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	50
Ácido múico	+	-	+	+	-	+	+	-	62,5	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	30
Ácido propiônico	+	+	+	+	-	+	+	+	87,5	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	40
Ácido quínico	+	+	+	+	-	+	-	+	75	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	80
Ácido α -Keto-butírico	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Ácido α -Keto-glutárico	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	70
Ácido γ -Amino-Butírico	+	-	-	+	-	-	-	-	25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Ácido-L-aspártico	+	+	+	+	-	+	+	+	87,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Ácido-L-Galactonico lactona	-	-	+	-	-	-	-	-	12,5	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	70

Ácido-L-Glutâmico	+	+	+	+	-	+	+	+	87,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
D-Ácido aspártico	+	-	+	+	-	+	-	+	62,5	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	50
D-Ácido málico	+	-	-	-	-	-	-	-	12,5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
D-Arabitól	-	-	+	+	-	+	-	-	37,5	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	60
D-Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Dextrina	+	-	+	-	-	-	-	-	25	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	20
D-Frutose	+	-	+	+	-	+	-	-	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	90
D-Frutose-6-PO4	+	-	+	+	-	+	+	+	75	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	50
D-Fucose	-	-	+	-	-	+	-	-	25	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	30
D-Galactose	-	-	+	-	-	+	-	-	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	90
D-Glicose-6-PO4	+	-	+	+	-	+	-	-	50	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	50
D-Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	10
D-Manitol	-	-	-	+	-	-	-	-	12,5	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	40
D-Manose	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D-Melibiose	-	-	+	-	-	-	-	-	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D-Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D-Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D-Serina	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D-Trealose	+	-	+	+	-	-	+	-	50	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	80
D-Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Estaquiose	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Gelatina	-	-	+	-	-	-	-	-	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Gentiobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Glicerol	+	-	+	+	-	+	+	-	62,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	90
Glicil-L-Prolina	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Glucuronamida	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Inosina	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
L-Ácido láctico	-	-	+	+	-	-	-	-	25	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	50
L-Ácido málico	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100

Lactato de sódio 1%	-	-	-	+	-	-	+	-	25	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	20
Lincomicina	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Minociclina	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NaCl 1%	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	10
NaCl 4%	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	10
NaCl 8%	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	10
Niaproof 4	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
pH 5	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
pH 6	-	-	+	+	-	+	+	+	62,5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
Rifamicina SV	+	-	+	+	+	+	+	+	87,5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	90
Telurito de potássio	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Tetrazólio Azul	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Tetrazólio Violeta	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Troleandomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	10
Vancomicina	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	80

^y (+) Reação positiva, (-) reação negativa.



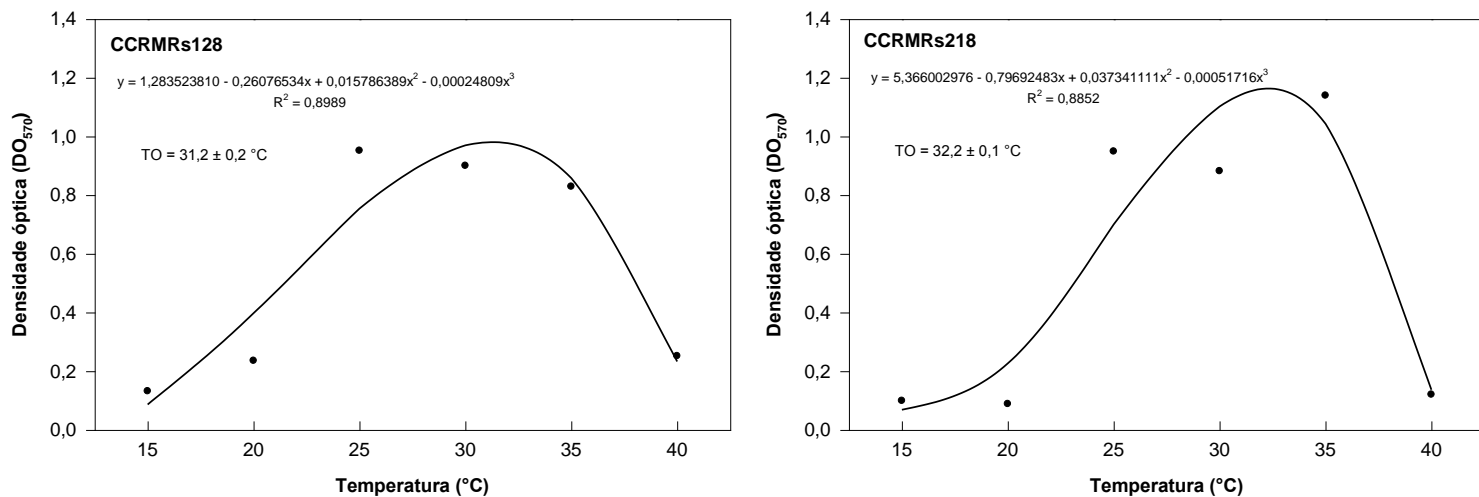


Figura S1 Curvas de performance de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* sob diferentes temperaturas *in vitro*.

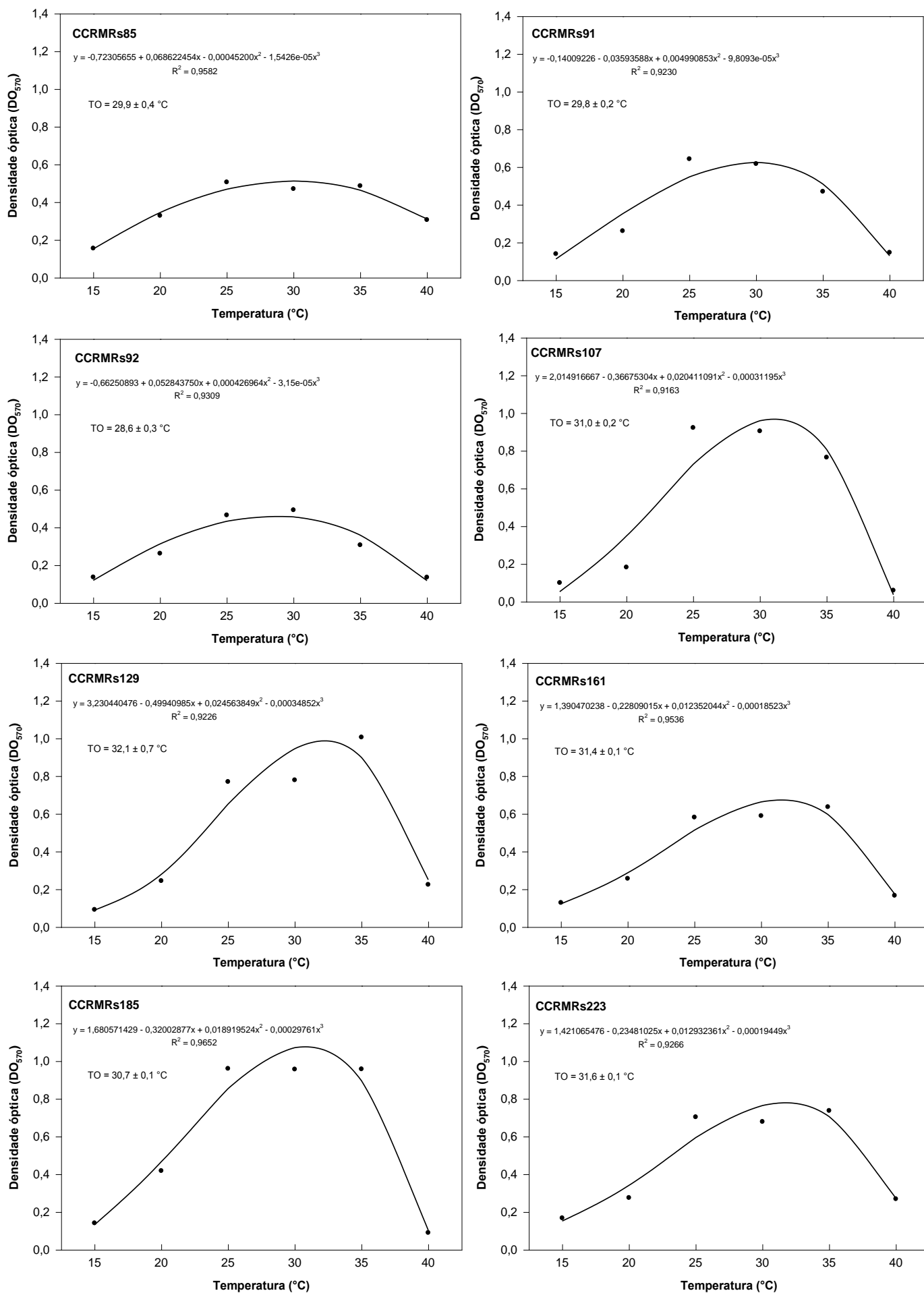


Figura S2 Curvas de performance de isolados de *Ralstonia solanacearum* sob diferentes temperaturas *in vitro*.

Conclusões gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. Isolados de *Ralstonia solanacearum* apresentaram uma maior faixa de temperatura ótima para crescimento *in vitro* que os de *R. pseudosolanacearum*;
2. As duas espécies de *Ralstonia* são capazes de crescer numa ampla faixa de pH (4,5 – 9,0), com *R. pseudosolanacearum* apresentando maiores taxas de crescimento em pH entre neutro e alcalino e *R. solanacearum* entre ácido e neutro;
3. O crescimento de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* foi inversamente proporcional à salinidade. Concentrações acima de 3% de NaCl foram letais para ambas espécies, mas isolados de *R. solanacearum* apresentaram superior adaptabilidade a condições de salinidade;
4. Isolados de *R. pseudosolanacearum* utilizaram uma maior variedade de fontes de carbono e apresentaram maior resistência as substâncias inibitórias do sistema Biolog GEN III;
5. Isolados de *R. solanacearum* exibiram maior habilidade para formação de biofilme e uma maior quantidade de isolados foram produtores de bacteriocinas em comparação a *R. pseudosolanacearum*;
6. *R. pseudosolanacearum* possuiu maior aptidão para causar doença em diferentes hospedeiros da família Solanaceae e colonizou mais rapidamente raízes de tomateiro;
7. As espécies de *Ralstonia* não diferiram quanto aos componentes epidemiológicos da murcha bacteriana em tomateiro e a densidade populacional em caules variou em decorrência do nível de agressividade do isolado e não da espécie;
8. Isolados de *R. pseudosolanacearum* apresentaram maior adaptabilidade patogênica e bioquímica enquanto os de *R. solanacearum* maior adaptabilidade fisiológica e ecológica;
9. No momento não existem indícios de que uma espécie de *Ralstonia* seja capaz de extinguir ou declinar a população da outra no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, uma vez que apresentaram vantagens adaptativas distintas.