



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**OCORRÊNCIA, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES  
DE *XANTHOMONAS*, CAUSADORAS DE MANCHA BACTERIANA EM  
TOMATE PARA MESA NO BRASIL**

**ROBERTA DA CRUZ PEREIRA**

**BRASÍLIA**

**2010**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**OCORRÊNCIA, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES  
DE *XANTHOMONAS*, CAUSADORAS DE MANCHA BACTERIANA EM  
TOMATE PARA MESA NO BRASIL**

**Roberta da Cruz Pereira**

**Orientadora: Dra. Marisa A. S. Velloso Ferreira**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Fitopatologia, do  
Departamento de Fitopatologia da  
Universidade de Brasília, como requisito  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Fitopatologia.**

**BRASÍLIA**

**2010**

**Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Professora Marisa A. S. Velloso Ferreira. Apoio institucional da Embrapa Hortaliças e financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).**

**Banca examinadora:**

---

**Dra. Marisa A. S. Velloso Ferreira** (Orientadora)  
Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília  
Brasília, DF

---

**Dr. Carlos Alberto Lopes**  
Embrapa Hortaliças  
Brasília, DF

---

**Dra. Betânia Ferraz Quirino**  
Embrapa Agroenergia  
Brasília, DF

**Aos meus queridos pais e irmã,  
Com todo carinho**

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por mais uma conquista, pelos meus erros e acertos. A tudo daí graças.

Aos meus pais, Lindenalva Pereira e Edson Pereira, e minha irmã, Renata Pereira, pelo apoio, amor e carinho em todos os momentos, principalmente nas dificuldades. Obrigada pelo amor sem medidas, vocês são a razão da minha vida.

Ao meu futuro esposo, Renato Machado, pela compreensão devido à distância e por todo amor a mim dedicado. O seu apoio foi fundamental para que eu pudesse suportar tudo. Também dedico esta vitória a você.

À todos da minha família que sempre torceram por mim.

À Dra. Alice Quezado pela orientação e amizade e à professora Marisa Ferreira pela orientação e ensinamentos. Obrigada pela oportunidade de trabalho e crescimento profissional.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília e aos funcionários, em especial Ribamar e Kamila.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, Carielli, Josineide, Cléia, Mauricio, Jocilene, Rayane, Helena, Isabela, Bruno, Manuela, Wilson, André, Marília e Dona Eremita, pelos momentos agradáveis que passei ao lado de vocês. Agradeço pela amizade e ajuda em vários momentos, inclusive de doença.

À Dra Alice Nagata pelas ajudas no laboratório.

Aos colegas do curso de pós-graduação Dina Márcia, Edivânio, Fabiane, Niday, Fernanda, Leila, Pablo, Cristiane, Celso, Priscila, Maria, Thiago e Daniel pelos estudos, companheirismo e trocas de experiências.

À Marco Aurélio e Claudênia pela ajuda na fase final da dissertação.

À amiga Ana Paula, Dona Dalva e Seu Osvaldo, pela recepção e moradia em Brasília. Vocês foram fundamentais ao meu estabelecimento nesta terra.

À amiga Niday por todas as dificuldades que passamos em Brasília. Dividimos casa, comida, fofocas e desesperos. Hoje somos vitoriosas, pois lutamos por um sonho, conseguimos superar cada obstáculo e estamos colhendo bons frutos.

Aos amigos Fabiane, Tia Maria do Carmo, Cleiton, Gisdenny, Ednalva, Dina Márcia, Cléia e Edivânio, que sempre estiveram ao meu lado e pela força nos momentos de tristeza e saudade de casa. Vocês também foram a minha família.

Aos amigos que fiz aqui em Brasília e aos que deixei no Rio de Janeiro.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da UFRRJ, Helena Montano, João Pedro Pimentel, Enia Mara e Jadier Cunha que me mostraram a Fitopatologia. Agradeço a todos os ensinamentos, conselhos, incentivos e amizade, pois vocês sempre acreditaram no meu potencial.

Aos meus queridos amigos da UFRRJ, Marcela, Regiane, Rosana, Frank, Bárbara, Zacarias, Mauro e Rhadyson que sempre me apoiaram e acreditaram nos meus sonhos.

A todos que de alguma forma contribuíram para este acontecimento.

À Embrapa Hortaliças pela oportunidade de trabalho no laboratório.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

Esta dissertação faz parte do projeto “Pragas do tomateiro: geração e estruturação de informações fitossanitárias para elevação da capacidade de seu manejo no Brasil”, com apoio do CNPq/ MAPA Edital nº64/2008.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS-----	x
ÍNDICE DE FIGURAS-----	x
RESUMO-----	xii
ABSTRACT-----	xiii
CAPÍTULO 1-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	1
1- A cultura do tomateiro-----	1
2- Mancha bacteriana do tomateiro-----	2
2.1- Histórico-----	2
2.2- Sintomatologia-----	3
2.3- Etiologia-----	5
2.3.1- Ocorrência de raças de <i>Xanthomonas</i> spp.-----	7
2.4- Distribuição geográfica-----	8
2.5- Diagnose-----	9
2.6- Epidemiologia-----	12
2.7- Controle-----	13
2.7.1- Controle genético-----	13
2.7.2- Controle químico-----	14
2.7.3- Controle cultural-----	16
2.7.4- Controle biológico-----	17
Justificativa e objetivos -----	18
Hipóteses -----	19
Referências bibliográficas -----	19
CAPÍTULO 2-OCORRÊNCIA, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>XANTHOMONAS</i> , CAUSADORAS DE MANCHA BACTERIANA EM TOMATE PARA MESA NO BRASIL-----	
-----	25
RESUMO-----	26
INTRODUÇÃO-----	28
MATERIAIS E MÉTODOS-----	31
Obtenção cultivo e preservação dos isolados-----	31

Caracterização bioquímica-----	36
Reação de hipersensibilidade em fumo ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)-----	36
Testes de patogenicidade-----	36
Caracterização molecular-----	37
Extração de DNA-----	37
Quantificação do DNA-----	38
Identificação das espécies de <i>Xanthomonas</i> por métodos moleculares-----	38
rep-PCR-----	39
PCR com iniciadores específicos-----	40
Identificação da raça T1 de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> -----	41
Identificação das raças de <i>Xanthomonas perforans</i> -----	41
Hidrólise do amido-----	42
Sensibilidade ao cobre e estreptomicina-----	42
RESULTADOS-----	43
Caracterização bioquímica-----	43
Reação de hipersensibilidade em fumo ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)-----	43
Testes de patogenicidade-----	44
Caracterização molecular-----	44
rep-PCR-----	44
PCR com iniciadores específicos-----	49
Identificação da raça T1 de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> -----	52
Identificação das raças de <i>Xanthomonas perforans</i> -----	52
Hidrólise do amido-----	52
Sensibilidade ao cobre e estreptomicina-----	54
DISCUSSÃO-----	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS-----	65
REFERÊNCIAS-----	66
ANEXOS-----	69
Testes Bioquímicos-----	69
Planilha para análise de similaridade (BOX-PCR) -----	70
Planilha para análise de similaridade (REP-PCR) -----	71
Géis de BOX-PCR-----	72

Géis de REP-PCR-----	74
PCR para otimização do programa para amplificação com os iniciadores específicos, realizada em termociclador de gradiente-----	76

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Tabela 1</b> Distribuição das raças e espécies de <i>Xanthomonas</i> associadas à mancha bacteriana do tomateiro-----	8
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Tabela 1</b> Designação, origem e caracterização fenotípica e molecular de isolados de <i>Xanthomonas</i> coletados em campos de tomate de mesa com sintomas de mancha bacteriana -----	33
<b>Tabela 2</b> Identificação de <i>Xanthomonas</i> spp. do tomateiro, através de PCR com iniciadores específicos-----	51
<b>Tabela 3</b> Sensibilidade ao cobre e ao antibiótico estreptomicina de isolados de <i>Xanthomonas</i> spp., causadores de mancha bacteriana em tomateiro-----	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Figura 1</b> Sintomas de mancha bacteriana do tomateiro causado por <i>Xanthomonas</i> spp. em folhas e frutos A - B: sintomas em folhas; C e D: sintomas em frutos-----	4
<b>Figura 2</b> Evolução taxonômica dos agentes causais da mancha bacteriana---	7
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Figura 1</b> Sintomas de mancha bacteriana em tomateiro observados após inoculação por pulverização de: A) isolado CNPH 2008-32 (XV); B) isolado CNPH 2008-171 (XG); C) isolado CNPH 2009-46 (XE); D) isolado CNPH 2009-56 (XP); e em pimentão E) isolado CNPH 2008-171 (XG); F) isolado CNPH 2009-46 (XE). XV = <i>X. vesicatoria</i> ; XG = <i>X. gardneri</i> ; XE = <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> ; XP = <i>X. perforans</i> .-----	45
<b>Figura 2</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR obtidos com os iniciadores (A) BOX e (B) REP: M1: marcador 100 pb DNA ladder – (Promega); M2: marcador 1 Kb plus DNA Ladder – (Invitrogen); (1) IBSBF 2363– XE; (2) IBSBF 2364– XV; (3) IBSBF 2370– XP; (4) IBSBF 2373– XG; (5) CNPH 2009-46 – XE; (6) 2009-47 – XE; (7) 2009-42 – XV; (8) 2006-10 – XP; (9) 2008-36 – XP; (10) 2006-06 – XG; (11) 2007-12– XG. XE = <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> ; XV = <i>X. vesicatoria</i> ; XP = <i>X. perforans</i> ; XG = <i>X. gardneri</i> -----	46

- Figura 3** Dendrograma gerado por UPGMA a partir dos perfis genômicos obtidos BOX-PCR dos isolados de *Xanthomonas* spp., causadores de mancha bacteriana do tomateiro. O número de isolados com o mesmo haplótipo é indicado entre parênteses----- 47
- Figura 4** Dendrograma gerado por UPGMA a partir dos perfis genômicos obtidos REP-PCR dos isolados de *Xanthomonas* spp., causadores de mancha bacteriana do tomateiro. O número de isolados com o mesmo haplótipo é indicado entre parênteses----- 48
- Figura 5** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da amplificação do DNA de espécies de *Xanthomonas* com iniciadores desenvolvidos para as quatro espécies. M1: 1kb DNA ladder – (Gibco - BRL); M2: Marcador 100 pb DNA ladder - (Promega); XP: 197 pb; XE: 173 pb; XG: 154pb; XV: 138 pb. Isolados utilizados: (A) IBSBF 2363 – XE; (B) IBSBF 2364 – XV; (C) IBSBF 2370 – XP; (D) IBSBF 2373 – XG. XE = *Xanthomonas euvesicatoria*; XV = *X. vesicatoria*; XP = *X. perforans*; XG = *X. gardneri*----- 50
- Figura 6** Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR obtido com os iniciadores RST27 e RST 28 contendo o gene *avrRxv* (A) e RST88 e RST89 contendo o gene *avrXv3* (B). M: Marcador 100 pb DNA Ladder - (promega); Isolados: (1) CNPH 2009-46; (2):CNPH 2009-47; (3) CNPH 2008-173; (4) CNPH 2008-175; (5) CNPH 2008-177; (6) CNPH 2009-12; (7) CNPH 2009-13; (8) CNPH 2009-20; (9) CNPH 2009-21; (10) CNPH 2009-23; (11) CNPH 2009-24; (12) CNPH 2009-26; (13) CNPH 2009-31----- 53
- Figura 7** Porcentagem dos isolados de *Xanthomonas* spp. resistentes às diferentes concentrações de cobre (A) e estreptomicina (B) determinada por testes *in vitro*. XE = *Xanthomonas euvesicatoria*; XV = *X. vesicatoria*; XP = *X. perforans*; XG = *X. gardneri*----- 55
- Figura 8** Distribuição das espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana nos 11 estados brasileiros onde foram realizadas coletas----- 63
- Figura 9** Fluxograma para identificação de *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri* e suas respectivas raças. RH: Reação de hipersensibilidade; S: Suscetibilidade----- 64

## RESUMO

---

A mancha bacteriana do tomateiro é causada por, pelo menos, quatro espécies de *Xanthomonas* (*Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*), sendo uma das doenças mais importantes tanto para o tomate de mesa, quanto para o de indústria no Brasil. Oitenta e um isolados oriundos de campos comerciais de tomate para mesa, coletados em 23 localidades nas Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, entre os anos de 2005 a 2009, foram identificados para determinar a ocorrência dessas espécies. Esses isolados foram caracterizados por rep-PCR (BOX e REP), PCR com iniciadores específicos e testes de patogenicidade em genótipos suscetíveis de tomateiro e pimentão. Alta frequência de *X. perforans* (49,4%) e *X. gardneri* (40,7%) foi observada. Somente dois isolados corresponderam a *X. euvesicatoria* e seis a *X. vesicatoria*. Apenas na Região Sudeste do país foi detectada a presença das quatro espécies. Todos os isolados causaram sintomas em tomate, e somente isolados de *X. euvesicatoria* e 30 isolados de *X. gardneri* causaram sintomas em pimentão. Para determinação das raças, avaliou-se a presença/ausência dos genes *avrRxv* (presentes na raça T1) e *avrXv3* e reação no genótipo de tomateiro CNPH 1500, portador do gene *Xv3*. Todos os isolados de *X. perforans* induziram reação de hipersensibilidade neste genótipo, indicando que pertencem à raça T3, o que foi, na maioria dos casos, confirmado por *avrXv3*-PCR. Isolados de *X. vesicatoria* e *X. gardneri* foram classificados como raça T2, pois nenhum produto foi detectado por PCR (genes *avrRxv* e *avrXv3*). Dentre os 81 isolados, portanto, foram identificadas as raças T1, T2 e T3, não sendo encontradas as raças T4 e T5. Avaliou-se também a sensibilidade *in vitro* de todos os isolados ao cobre e estreptomicina. Utilizou-se sulfato de cobre nas concentrações 50, 100 e 200 µg/mL e sulfato de estreptomicina nas concentrações 25, 50 e 100 µg/mL, considerando-se resistentes os isolados que apresentaram crescimento confluyente em três repetições. Nenhum isolado foi resistente ao cobre na concentração de 200 µg/mL. Entretanto, 97,53% dos isolados foram resistentes a 100 µg/mL e 98,77% foram resistentes à concentração de 50 µg/mL. A frequência de isolados resistentes à estreptomicina foi 8,64% (100 µg/mL), 76,54% (50 µg/mL) e 83,95% (25 µg/mL). Isolados representantes das quatro espécies apresentaram resistência a ambos, cobre e estreptomicina. Este é o primeiro levantamento e caracterização de espécies de *Xanthomonas* em tomate de mesa no Brasil.

## ABSTRACT

---

Tomato bacterial spot is caused by at least four *Xanthomonas* species (*Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* and *X. gardneri*), and is one of the most important diseases of both processing and fresh market tomato crops in Brazil. Eighty one isolates, collected from 23 commercial tomato fields, located in southern, southeastern, central-west and northeastern regions of the country, from 2005 to 2009, were identified to determine the occurrence of these species. These isolates were characterized through rep-PCR-based fingerprint analysis (BOX and REP-PCR), PCR with species-specific primers and pathogenicity tests on tomato and pepper susceptible varieties. Highest frequencies were observed for *X. perforans* (49.4%) and *X. gardneri* (40.7%). Only two isolates were *X. euvesicatoria* and six were *X. vesicatoria*. The occurrence of all four species was detected only in the southeast region of Brazil. All isolates were pathogenic on tomato. On pepper, only those of *X. euvesicatoria* and 30 isolates of *X. gardneri* caused bacterial spot symptoms. Isolates were also classified in races by *avrRxv* (present in race T1) and *avrXv3*-PCR amplification and by hypersensitive reaction on tomato genotype carrying the *Xv3* gene. All *X. perforans* isolates induced hypersensitive response on this genotype, indicating that they belong to race T3, and in most cases confirmed by *avrXv3*-PCR. *Xanthomonas vesicatoria* and *X. gardneri* isolates were classified as race T2 since no PCR products were detected for *avrRxv* or *avrXv3*. Among the 81 isolates, races T1, T2 and T3 were identified, while races T4 and T5 of *X. perforans* were not detected. Sensitivity of all isolates to copper and streptomycin was evaluated by *in vitro* assays, with 50, 100 and 200 µg/mL of copper sulfate and 25, 50 and 100 µg/mL of streptomycin sulfate, with three replicates. Resistance was detected when bacterial growth was observed in all three replicates. None of the isolates was resistant to copper at 200 µg/mL. However, 97.53% were resistant to copper at 100 µg/mL and 98.77% were resistant to copper at 50 µg/mL. The frequencies of isolates resistant to streptomycin were 8.64% (100 µg/mL), 76.54% (50 µg/mL) and 83.95% (25 µg/mL). Isolates representing all four *Xanthomonas* species showed resistance, both to copper and streptomycin. This is the first survey and characterization of xanthomonads on fresh market tomatoes in Brazil.

## CAPÍTULO 1

---

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1- A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) tem como centro primário de origem um território limitado ao norte pelo Equador, ao sul pelo Chile, oeste pelo oceano pacífico e leste pela Cordilheira dos Andes. Antes da colonização espanhola, a cultura foi levada para o México, onde foi cultivada e melhorada (Filgueira, 2000). No Brasil, a cultura foi introduzida no final do século XIX por imigrantes europeus (Filgueira, 2003).

O tomateiro é uma das plantas hortícolas mais cultivadas no mundo. Seu fruto, o tomate, é amplamente utilizado na culinária em diversos países. Pertence à família Solanaceae e, no Brasil, é a espécie do grupo das hortaliças com maior volume de produção (Alves *et al.*, 2008). O tomateiro é cultivado em dois tipos de segmentos produtivos, o destinado ao mercado para o consumo *in natura* (“de mesa”) e o para processamento industrial. No primeiro, as plantas geralmente são de crescimento indeterminado, sendo cultivadas estaqueadas com exceções de cultivos rasteiros para mesa, principalmente em lavouras do nordeste. Já o tomateiro destinado à indústria de sucos, molhos e polpas é o de porte rasteiro.

O Brasil apresenta uma grande diversidade de área de plantio de tomate. Do total da área cultivada de tomate de mesa, o segmento salada é o de maior importância. Outros segmentos importantes são: o italiano/saladete, santa cruz e o cereja (ABC sem, 2009).

China e Estados Unidos produzem cerca de 30% do total mundial, sendo que a porcentagem destinada ao consumo *in natura* (“de mesa”) é de 95% na China, enquanto que nos Estados Unidos, apenas 21% da produção tem esse destino (Agrianual, 2008).

A cadeia produtiva de tomate tem forte relevância econômica no agronegócio brasileiro, movimentando em torno de R\$ 2 bilhões por ano (cerca de 16 % do PIB da produção de hortaliças no Brasil). Em 2008, a área cultivada de tomate foi de 55.000 hectares, sendo 69% destinado para consumo *in natura* e 31% para o processamento industrial (ABC sem, 2009). A produção nacional em 2007 foi de 3.200.846 toneladas, sendo que cerca de 65% foi destinado ao consumo *in natura* (Agrianual, 2008).

A Região Sudeste tem a maior concentração da área plantada de tomate para consumo *in natura*, com 57 %, sendo que São Paulo e Minas Gerais correspondem a 43% desse total. A Região Sul tem 19 %, distribuídos entre Paraná (9%), Santa Catarina (6%) e Rio Grande do Sul (4%). O Centro-Oeste e Nordeste participam com 24 % do total da área plantada. Goiás tem a maior concentração de área plantada de tomate para processamento industrial (62%), seguido por São Paulo (20%) e Minas Gerais (16%) (ABC sem, 2009).

A cultura do tomateiro está sujeita a vários problemas fitossanitários, que podem ser causados por fungos, vírus, nematóides e bactérias. Entre as bactérias de ocorrência no Brasil, destacam-se: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith 1910) Davis *et al.*, 1984. (cancro bacteriano); *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi *et al.*, 1996 (murcha bacteriana); *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Van Hall 1904 (pinta bacteriana) e *Xanthomonas* spp. (mancha bacteriana) (Malavolta Junior, 2007).

## **2- Mancha bacteriana do tomateiro**

### **2.1 - Histórico**

A mancha bacteriana é considerada uma das doenças mais importantes do tomateiro, principalmente devido à eficiência variável do controle químico, indisponibilidade de cultivares com resistência adequada, rápida disseminação na

lavouira sob condições favoráveis e através do uso de sementes contaminadas (Jones *et al.*, 1997).

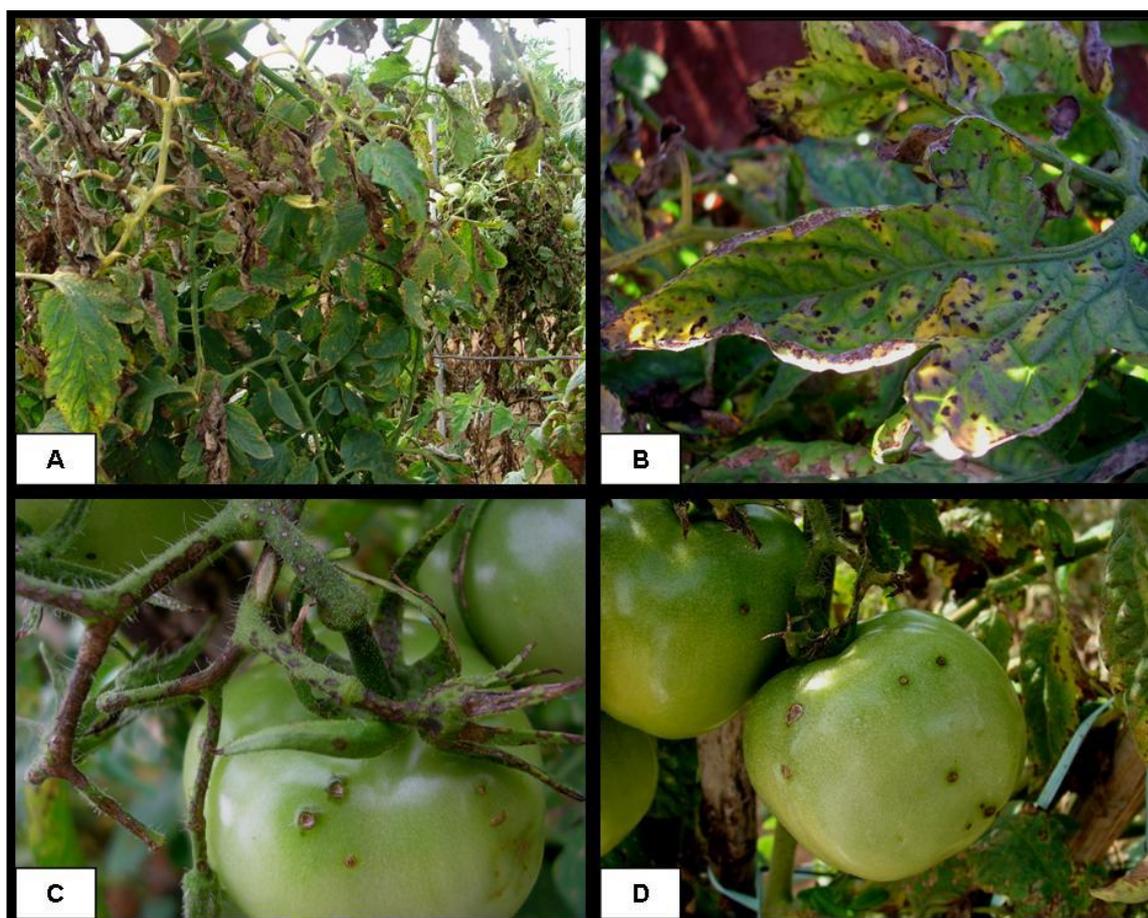
A ocorrência da doença foi mencionada pela primeira vez em 1914 na África do Sul, onde foi denominada de cancro do tomateiro (Doidge, 1920). No Brasil, foi relatada pela primeira vez no Estado de São Paulo, em 1959 (Rodrigues Neto *et al.*, 1984). A distribuição é generalizada e provoca perdas consideráveis tanto em tomate para consumo *in natura* como em tomate para processamento industrial. Em regiões onde as condições climáticas não são favoráveis à doença, como as áreas de cerrado, a situação tende a se agravar, pois a umidade advinda do uso da irrigação por aspersão cria um microclima favorável à doença (Silva - Lobo, 2000). A mancha bacteriana afeta não só o cultivo do tomateiro, mas também do pimentão.

## **2-2 - Sintomatologia**

Sintomas da mancha bacteriana podem ser observados em folhas, frutos, flores e caules. Nas folhas, os sintomas aparecem como pequenas manchas, encharcadas, de formato irregular e com os bordos definidos. Essas manchas tornam-se deprimidas, passando de coloração amarelada ou verde-clara para marrom escuro até a necrose do tecido (Goode & Sasser, 1980) (Figura 1). O coalescimento das lesões nas folhas ocorre seguido de secagem e destruição da folhagem a partir da parte inferior da planta (Lopes & Quezado-Soares, 1997). Em plantas de pimentão a mancha bacteriana leva à queda das folhas, já no tomateiro isto não ocorre.

Nos frutos, as lesões iniciais aparecem como pequenas áreas encharcadas e amareladas, tornando-se marrons, de textura áspera e com os bordos ligeiramente elevados (Jones *et al.*, 1997).

As perdas causadas por essa doença ocorrem em função da queda de produtividade em decorrência direta dos sintomas, do custo dos produtos químicos utilizados como estratégia de controle e de suas aplicações às lavouras (Quezado-Duval *et al.*, 2003b). Sob condições experimentais de campo, já foi registrada redução de 52% da produção de tomate rasteiro no Brasil (Quezado-Soares *et al.*, 1998).



**Figura 1** Sintomas de mancha bacteriana do tomateiro causado por *Xanthomonas* spp. em folhas e frutos. A - B: sintomas em folhas; C e D: sintomas em frutos. Fotos: A. M. Quezado Duval

### 2.3 – Etiologia

A mancha bacteriana é causada por espécies do gênero *Xanthomonas*. As bactérias são baciliformes (0,7 – 1,0 x 2,0 – 2,4 µm), gram negativas, aeróbias e móveis por um flagelo polar (Jones *et al.*, 1997). Suas colônias são lisas, mucóides, amarelas, havendo a produção do pigmento xantomonadina (Stall, 1993). As bactérias são classificadas dentro do domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, Ordem Xanthomonadales, família Xanthomonadaceae e gênero *Xanthomonas* (Garrity & Holt, 2000).

Desde a descrição feita por Doidge (1920) o patógeno mostrou-se bastante variável de acordo com suas características fenotípicas e genotípicas, o que ocasionou diversas reclassificações ao longo do tempo (Figura 2).

Na mesma época em que a doença foi descrita como cancro do tomateiro na África do Sul, foi relatada nos Estados Unidos uma doença similar denominada de "bacterial spot" ou mancha bacteriana (Gardner & Kendrick, 1921), denominação pela qual a doença é conhecida atualmente. Os nomes atribuídos aos agentes causadores dessas supostas duas doenças foram, respectivamente, *Bacterium vesicatorium* e *Bacterium exitiosa*. Também nessa mesma época, Sherbakoff (1918) descreveu a ocorrência de mancha bacteriana em pimentão.

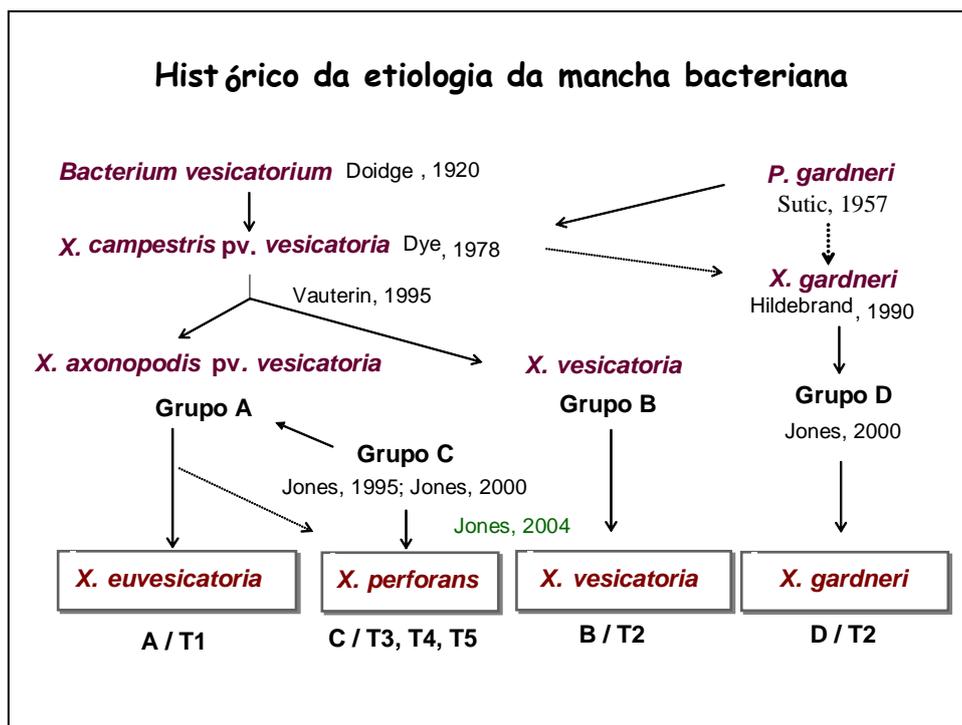
Em 1923, Gardner & Kendrick usaram vários testes determinativos para comparar *B. vesicatorium*, *B. exitiosa* e um isolado de pimentão oriundo da Flórida, e concluíram que os três patógenos deveriam pertencer a uma única espécie de bactéria, a qual denominaram *B. vesicatorium* Doidge.

A nomenclatura do patógeno sofreu seguidas alterações: *Pseudomonas vesicatoria* (1925), *Phytomonas vesicatoria* (1930), *Xanthomonas vesicatoria* (1939) e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Dowson (1978) (Quezado-Duval, 2003a).

Em 1957 Šutic identificou, na Jugoslávia, a bactéria *Pseudomonas gardneri* que atacava tomate, causando sintomas de “olho de passarinho” em frutos. A espécie, no entanto, foi considerada sinônimo de *Xanthomonas vesicatoria* por Dye (1966), pois não havia como diferenciá-las através de testes fisiológicos e de patogenicidade (Jones *et al.*, 1998). Em 1990, Hildebrand *et al.*, através de estudos de hibridização de DNA, verificaram que *X. gardneri* estava mais relacionada a *X. campestris* pv. *carotae*, *X. campestris* pv. *pelargoni* e *X. campestris* pv. *taraxaci* e que *X. campestris* pv. *vesicatoria* pertencia a um grupo separado .

Pelo fato do patógeno ter se mostrado variável em suas características fenotípicas e genotípicas, foi possível distinguí-lo em quatro grupos (A, B, C e D). Vauterin *et al.* (1995) separaram *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em duas espécies: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A) para os isolados não amilolíticos e *X. vesicatoria* (grupo B) para os isolados fortemente amilolíticos. Jones *et al.* (2000) propuseram a criação de quatro grupos: A e C como *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, B como *X. vesicatoria* e D como *X. gardneri*. O grupo C foi colocado como uma subespécie do grupo A, pois apresentava diferenças fenotípicas, mas alta homologia em experimentos de hibridização DNA–DNA. Já o grupo D mostrou-se pouco relacionado aos grupos A e B, no entanto, foi classificado como uma terceira espécie, também associada à doença.

Jones *et al.* (2004a) mostraram que *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A) tinha menos de 70% de homologia de DNA com outros *X. axonopodis*, e que o grupo C diferia do grupo A por ser fortemente amilolítico e pectolítico e também por diferenças na utilização de fontes de carbono. Por isso, foi proposto que esses dois grupos fossem elevados ao status de espécie, sendo renomeados como *X. euvesicatoria* e *X. perforans*, respectivamente.



**Figura 2** Evolução taxonômica dos agentes causais da mancha bacteriana. Fonte: A. M. Quezado

Duval

### 2.3.1 – Ocorrência de raças de *Xanthomonas* spp.

De acordo com Leach & White (1996), raças são definidas de acordo com as reações de um grupo definido de genótipos da hospedeira. Portanto, alguns indivíduos atacam certas variedades da planta hospedeira, mas não outras. Em *Xanthomonas* spp. foram identificadas cinco raças, sendo denominadas T1 (*Xanthomonas euvesicatoria*), T2 (*Xanthomonas vesicatoria* e *Xanthomonas gardneri*), T3, T4 e T5 (*Xanthomonas perforans*) com base nas reações quando inoculadas em genótipos diferenciais (Souza *et al.*, 2008). A raça T1 causa reação de hipersensibilidade no genótipo Hawaii 7998, enquanto que a raça T3 causa reação de hipersensibilidade no genótipo Hawaii 7981. Já ambos os genótipos são suscetíveis à raça T2 (Jones *et al.*, 1998). Raças T4 e T5 são mutações da raça T3 (Jones *et al.*, 2005) e reação de hipersensibilidade é observada no genótipo LA 716 à raça T4 (Robbins *et al.*, 2009). No Brasil, as raças T1, T2 e T3 foram

encontradas associadas com plantas de tomate rasteiro, em lavouras comerciais para a indústria (Quezado-Duval & Camargo, 2004a), não havendo relatos de ocorrência das raças T4 e T5.

## 2.4 - Distribuição geográfica

A mancha bacteriana do tomateiro é um problema grave em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. *Xanthomonas euvesicatoria* e *X. vesicatoria*, grupos A e B respectivamente, estão distribuídas mundialmente. *Xanthomonas perforans* foi isolada originalmente em 1991 e tem sido encontrada, nas regiões produtoras de tomate nos Estados Unidos, México, Tailândia e Brasil. *Xanthomonas gardneri*, originalmente da Costa Rica e Yugoslávia, tem sido encontrada no Brasil e nos Estados Unidos (Tabela 1) (Jones *et al.*, 2005).

**Tabela 1** Distribuição das raças e espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha bacteriana do tomateiro.

Espécie	Hospedeira	Grupo	Raças	Distribuição
<i>X. euvesicatoria</i>	Tomate / pimentão	A	T1	Mundial
<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	T2	Mundial
<i>X. perforans</i>	Tomate	C	T3,T4,T5	Brasil, México, Tailândia, EUA
<i>X. gardneri</i>	Tomate / pimentão	D	T2	Costa Rica, EUA, Yugoslávia, Brasil

Fonte: Jones *et al.*, 2005 (adaptada).

## 2.5 – Diagnose

A diagnose da mancha bacteriana pode ser feita através da observação dos sintomas, observação do fluxo bacteriano, isolamento da bactéria em cultura pura, testes bioquímicos, teste de patogenicidade (com observação de sintomas característicos) e também através de testes moleculares.

A caracterização das espécies de *Xanthomonas* pode ser feita tanto fenotípica quanto genotipicamente. Jones *et al.* (1998) citou a presença de forte atividade amilolítica e pectolítica na espécie pertencente ao grupo B, e negativa ou fraca atividade amilolítica e pectolítica na espécie pertencente ao grupo A. Outras características fenotípicas como perfis de proteínas totais (Vauterin *et al.*, 1991), utilização de fontes de carbono, composição e conteúdo de ácidos graxos e sensibilidade ao cobre e estreptomocina (Bouzar *et al.*, 1999) também foram utilizadas. Características genotípicas tem sido muito usadas na identificação e caracterização do patógeno. Segundo Louws *et al.*, 1999, métodos baseados na análise do DNA podem ser divididos em dependentes e independentes de amplificação por PCR (polymerase chain reaction).

Dentre os que independem da amplificação do DNA, o grau de homologia DNA-DNA tem sido considerado o maior determinante para definição de espécies de bactérias. Métodos baseados na digestão do genoma total ou do DNA plasmidial com enzimas de restrição e análise dos padrões de bandas resultantes (Restriction Enzyme Analysis, REA), ou após hibridização utilizando sondas genômicas específicas (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) também são empregados (Louws *et al.*, 1999). Análises genômicas independentes da amplificação por PCR são menos usadas do que as que dependem de amplificação, que em geral exigem apenas uma pequena quantidade de DNA e proporcionam maior especificidade, sensibilidade e rapidez.

Alguns métodos vêm sendo estabelecidos para a detecção e identificação de *Xanthomonas* spp. causadora da mancha bacteriana, com o emprego da técnica de PCR. Bouzar *et al.* (1999) utilizaram rep-PCR (PCR repetitivo) em isolados de *Xanthomonas* spp. causadoras de mancha bacteriana no Caribe e América Central, revelando a presença de quatro grupos distintos (A–D). Cuppels *et al.* (2006) também utilizaram rep-PCR para comparar isolados de *Xanthomonas gardneri* de diferentes locais, concluindo que todos os isolados utilizados apresentavam padrões iguais de rep-PCR. O método rep-PCR é baseado em sequências de DNA conservadas, dispersas no genoma. Esses elementos são denominados: REP (repetitive extragenic palindromic), ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) e BOX. Os iniciadores utilizados contêm seqüências correspondentes a esses elementos, porém amplificam a região entre dois elementos consecutivos. As sequências nucleotídicas REP foram descritas primeiramente em *Escherichia coli* e *Salmonella thyphimurium*. Estas sequências possuem cerca de 35 nucleotídeos (Stern *et al.*, 1984). As sequências nucleotídicas ERIC foram descritas inicialmente em regiões intergênicas dos cromossomos de *E. coli* e *S. thyphimurium* e apresentam uma sequência de 126 pb (Sharples & Lloyd, 1990). Já o elemento BOX foi descrito primeiramente em *Streptococcus pneumoniae* e consiste de várias combinações de três subunidades: BOX A, BOX B e BOX C, com 59, 45 e 50 nucleotídeos, respectivamente (Martin *et al.*, 1992). Segundo Louws *et al.* (1994) a distribuição dessas sequências reflete a organização genômica da bactéria, além de ser uma técnica simples e reprodutível para a identificação de isolados. Este método além de ser usado para diagnose, também é empregado para a diferenciação de estirpes, assim como avaliar a diversidade genética de patógenos de planta (Louws *et al.*, 1999). De acordo com Rademaker *et al.* (2005), os dados gerados por rep-PCR permitem uma avaliação detalhada da diversidade genética a nível sub-específico e também podem ser usados para

a criação de um banco de dados de padrões genômicos, úteis para comparação e identificação de isolados desconhecidos.

O desenvolvimento dos iniciadores específicos, como os pares BSX1/2 e RST 65/69, tornaram a técnica da PCR passível de utilização na identificação. Os iniciadores BSX1/2 (Cuppels *et al.*, 2006) foram desenvolvidos a partir da sonda KK1750 e produzem amplicons de 579-pb, para os grupos A, B e D. No entanto, nenhum produto foi obtido para o grupo C (*X. perforans*) (Cuppels *et al.*, 2006). Os iniciadores RST 65/69, derivados dos iniciadores RST2/3 (Leite Júnior *et al.*, 1995), produzem amplicons de 420-pb para os quatro grupos, que devem ser posteriormente identificados em uma segunda etapa, através de análise de restrição utilizando-se as enzimas CfoI, TaqI e HaeIII (Leite Júnior *et al.*, 1995; Obradovic *et al.*, 2004). Análise de restrição enzimática de regiões genômicas como a espaçadora do rDNA 16S-23S (ITS) revelou polimorfismo entre isolados de *Xanthomonas* causadora da mancha bacteriana, no entanto, não foi possível diferenciar as quatro espécies (Rabalho, 2007).

Iniciadores específicos para as quatro espécies de *Xanthomonas* já foram desenvolvidos a partir de sequenciamento de fragmentos de DNA obtidos por AFLP. A especificidade desses iniciadores foi testada com diferentes isolados, porém, devido ao pequeno número de representantes das espécies, há necessidade de validá-los com número maior de isolados (Koenraad *et al.*, 2009). Recentemente foram desenvolvidos iniciadores específicos para *X. euvesicatoria*, desenhados a partir da sequência de fragmentos de DNA obtidos por REP-PCR, disponibilizando-se assim, um método rápido, sensível e específico para esta bactéria (Moretti *et al.*, 2009).

Quezado–Duval *et al.* (2004b) caracterizaram isolados oriundos de campos de tomate industrial no Brasil através de PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado), atividades amilolíticas e pectolíticas e relataram a presença de *X. vesicatoria*, *X.*

*axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. gardneri*. Este foi o primeiro relato de *X. gardneri* no Brasil.

## 2.6 – Epidemiologia

*Xanthomonas* spp. pode atacar todos os órgãos aéreos da planta, resultando no comprometimento da produtividade devido à redução da área foliar, queda de flores e frutos em formação, além da redução da qualidade dos frutos para consumo (Jones *et al.*, 1997).

A mancha bacteriana encontra condições ideais de temperaturas entre 20 e 30°C (Lopes & Santos, 1994). A doença é favorecida com temperaturas altas e umidade relativa entre 95 e 100%, associada com a presença de água livre. A doença é mais severa quando há chuvas com ventos fortes (Barreto & Scaloppi, 2007). A bactéria penetra na planta através dos estômatos ou por ferimentos provocados por equipamentos ou tratos culturais (Vakili, 1967). A disseminação ocorre por respingos de água por mudas ou por sementes infectadas (Lopes & Quezado-Soares, 1997).

O uso de sementes infectadas representa uma das principais fontes de inóculo primário para a ocorrência de epidemias de mancha bacteriana (Corrêa *et al.*, 2008). Plantas de tomate originadas do ciclo anterior da cultura, e plantas daninhas também são fontes de inóculo. Na literatura internacional, há relatos da ocorrência da mancha bacteriana em outros hospedeiros, como: *Capsicum frutescens* L., *Datura stramonium* L., *Solanum dulcamara* L., *S. rostratum* Dunal e *S. tuberosum* L. (citados por Silva – Lobo, 2000).

Sementes podem ser contaminadas durante o processo de extração, quando ficam em contato direto com as lesões presentes no fruto. Uma vez infectado, o patógeno pode

ser encontrado tanto na superfície quanto no interior das células da semente (Maringoni & Kurozawa, 1994).

A princípio, a bactéria não sobrevive no solo por longos períodos. No entanto, pode sobreviver em restos de cultura infectados (Quezado-Duval *et al.*, 2008).

## **2.7 – Controle**

O controle da doença depende da combinação de práticas culturais, incluindo uso de sementes e plântulas livres do patógeno, limpeza da área, rotação de cultura, tratamento químico e uso de cultivares resistentes (Silva-Lobo *et al.*, 2005). Esse controle deve ser realizado desde antes do plantio até a fase de comercialização (Lopes & Quezado-Soares, 1997).

### **2.7.1 – Controle genético**

De acordo com Silva-Lobo *et al.* (2005), a resistência genética é a melhor opção de controle. No entanto, poucos genótipos com resistência a esta doença foram identificados, não havendo materiais comerciais resistentes disponíveis no Brasil nem para o tomate de mesa, nem para o tomate de indústria.

Para o sucesso de um programa de melhoramento é necessário conhecer o tipo de herança, visando à escolha do método mais adequado a ser aplicado no desenvolvimento de novas cultivares (Silva-Lobo *et al.*, 2005). Formas de resistência quantitativa e hipersensibilidade a *Xanthomonas* spp. causadora da mancha bacteriana ocorrem tanto em tomate quanto em pimentão (Stall *et al.*, 2009). Resistência à raça T1 foi descrita em ‘Hawaii 7998’, o qual apresentou reação de hipersensibilidade. A raça T1 é portadora do gene *avrRxv*, que interage com pelo menos três genes não dominantes (*rx1*, *rx2* e *rx3*) do genótipo ‘Hawaii 7998’. Para a raça T2, um estudo usando ‘PI 114490’ como fonte de

resistência concluiu que o controle genético da resistência é conferido por um mínimo de dois genes. Resistência à raça T3 foi observada em 'Hawaii 7981'. Neste caso a resistência é controlada por um gene de dominância incompleta *Xv3* que confere reação de hipersensibilidade (citado por Souza *et al.*, 2008). Isolados da raça T3 são portadores dos genes de avirulência *avrXv3* e *avrXv4* e interagem com o gene de resistência *Xv3* e *Xv4* (Quezado – Duval, 2003a).

Stall *et al.* (2009) relataram que resistência quantitativa ou multigênica parece ser mais durável que a resistência por hipersensibilidade, ressaltando que a durabilidade de um gene de resistência baseada em reação de hipersensibilidade na planta, depende da estabilidade do gene *avr* no patógeno.

O desenvolvimento de variedades com a resistência tem sido difícil devido à emergência de novas espécies e raças, à falta de uma correlação entre uma resposta de hipersensibilidade e resistência no campo, e à herança quantitativa da resistência (Yang *et al.*, 2004).

### **2.7.2 - Controle químico**

Fungicidas cúpricos e antibióticos (estreptomicina e oxitetraciclina) registrados para o uso agrícola são muito utilizados em lavouras de tomate para o controle da mancha bacteriana, no entanto, nem sempre resultam em controle eficiente. O aparecimento de estirpes resistentes é uma das causas dessa baixa eficiência.

Fungicidas cúpricos atuam na proteção do tecido vegetal contra infecção, e na redução da população bacteriana na superfície foliar. Entretanto, são necessárias várias aplicações desses produtos para alcançar o controle adequado da doença, pois o excesso de cobre pode causar toxidez às células bacterianas, afetando suas funções metabólicas. O antibiótico oxitetraciclina inibe a síntese de proteínas em bactérias por interferir com

a incorporação de aminoácidos ativados (aminoacil-tRNA) à cadeia proteica em formação, nos ribossomos. Já o antibiótico estreptomicina, pode atuar tanto no início da síntese proteica, por bloquear a formação do complexo iniciante (associação do aminoacil-tRNA aos ribossomas), como interferir com a leitura correta do código genético, o que causa a incorporação de aminoácidos diferentes dos esperados, resultando numa enzima inativa ou não funcional (Kurylowicz, 1981).

Segundo Carmo *et al.* (2001), a eficiência do controle químico à base de fungicida cúprico é bastante variável e na maioria das vezes ineficiente. Em experimento realizado em campo, plantas infectadas foram submetidas a tratamentos com e sem aplicação de oxiclreto de cobre, em diferentes épocas do ano. Foi constatado que em épocas de altas temperaturas e elevada precipitação havia maior intensidade da doença. A isto foi atribuído o fato de que, com o aumento da temperatura, há maior frequência nas irrigações e na aplicação de fungicidas, e com isto pode haver o desenvolvimento de variantes resistentes ao longo do período de pulverizações provocado pela constante lavagem do produto e exposição a subdosagens.

O primeiro relato de resistência ao cobre em *Xanthomonas* do tomateiro foi constatado na Flórida. Marco & Stall (1983) relataram a ineficiência de produtos à base de cobre no controle da mancha bacteriana, relatando pela primeira vez estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* com resistência ao cobre. Também na Flórida foi feito o primeiro relato de resistência ao antibiótico estreptomicina, que até então era utilizado (Stall & Thayer, 1962).

Quezado-Duval *et al.* (2003b) citam a ocorrência de resistência ao cobre em estudos realizados na Itália, EUA, Caribe e América Central. Aguiar *et al.* (2000) detectaram isolados de *Xanthomonas* spp. resistentes ao cobre no Brasil.

Quezado-Duval *et al.* (2003a) verificaram a sensibilidade ao cobre, estreptomicina e oxitetraciclina de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A, raça T1 e grupo C, raça T3), *X. vesicatoria* (grupo B, raça T2) e *X. gardneri* (grupo D, raça T2) provenientes de lavouras para indústria no Brasil. Na ocasião, observaram que nenhum dos isolados testados foi resistente à oxitetraciclina. Quanto à estreptomicina, a frequência de isolados resistentes foi alta para *X. gardneri* (98%) e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (38%), sendo baixa para *X. vesicatoria* (2%). Quando avaliado o uso de cobre, nenhum dos isolados foi resistente, na concentração de 200 µg /mL, porém houve resistência na concentração menor (50 µg /mL).

A ação de hidróxido de cobre foi avaliada, *in vitro*, em isolados de *X. gardneri* e *X. perforans* de tomate para processamento industrial, no estado de Goiás, revelando que o produto testado não teve ação sobre os isolados na dosagem recomendada, havendo efeito apenas em dosagem cem vezes superior (Nascimento, 2009).

### **2.7.3 - Controle cultural**

Várias medidas de controle podem ser adotadas para evitar o aparecimento da doença. Lopes & Quezado–Soares (1997) mencionaram a importância de plantar mudas selecionadas a partir de sementes de boa qualidade; não plantar tomate seguidamente na mesma área ou intercalados com pimentão; evitar cultivo próximo a lavouras mais velhas de tomate e pimentão; evitar irrigação excessiva e eliminar restos culturais logo após a colheita.

Carmo *et al.* (2004) compararam a eficiência de tratamentos físicos e químicos na erradicação de *X. vesicatoria* em sementes de tomate “Santa Clara Miss Brasil”, e também avaliaram seus efeitos sobre a qualidade fisiológica e sanitária das sementes. O tratamento consistiu do uso de HCl (5%), calor seco (70°C/96 horas) e imersão em água

(50° C). HCl erradicou *X. vesicatoria* das sementes proporcionando maior velocidade de germinação, quando a semeadura foi feita logo após a aplicação do tratamento. No entanto, esse tratamento foi prejudicial à germinação e ao vigor das plântulas, quando as sementes foram armazenadas. O tratamento com calor seco reduziu a população bacteriana e a velocidade de germinação, 24 horas após a aplicação dos tratamentos, com a vantagem da manutenção da qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento. Já o tratamento com imersão em água quente não afetou a qualidade fisiológica das sementes, porém, não erradicou, nem reduziu a população de *X. vesicatoria*.

#### **2.7.4 – Controle biológico**

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse no uso do controle biológico das doenças bacterianas de plantas por meio de bacteriófagos, bactérias antagonistas, ou a ativação de mecanismos de defesa natural da planta por resistência sistêmica adquirida (SAR). Um relato sobre antagonismo bacteriano por estirpes não-patogênicas para a mancha bacteriana do tomate foi realizado por Colin *et al* (1984) que determinaram em experimentos *in vitro*, que *Pseudomonas* spp. era antagônica à *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Contudo, além de bactérias não-patogênicas, estirpes bacterianas patogênicas mostraram ser antagônicas a estirpes bacterianas intimamente relacionadas. Como exemplo, a raça T3 mostrou ser antagonista à raça T1 pela produção de compostos tipo bacteriocina. A raça T3 continha pelo menos três diferentes bacteriocinas que inibiram a raça T1. Hert (2001) demonstrou que duas daquelas bacteriocinas foram essenciais para a vantagem competitiva da estirpe T3 sobre a T1 (citados por Jones *et al.*, 2004b). Hert *et al.*, (2009) relataram o uso de isolados de *X. perforans* produtores de bacteriocina com patogenicidade atenuada colonizando tecido foliar de *X. euvesicatoria*, sendo efetivo na supressão de *X. euvesicatoria*.

Jones *et al.* (2004b) demonstraram a importância de bacteriófagos e aplicações de acibenzolar-S-metil (que é indutor de resistência sistêmica adquirida), sozinhos ou combinados, para o controle da mancha bacteriana e aumento na produção sob condições de campo.

Jones *et al.* (2007) relataram o uso de bacteriófagos com grande potencial para substituir o controle químico, ressaltando a facilidade na preparação de tratamentos com fagos e o baixo custo de produção. O estudo demonstrou que a combinação de fagos e ASM (acibenzolar-S-metil) promoveu a redução da doença, resultando em maior eficiência do controle da doença do que o uso de fagos, ASM ou cobre-mancozeb sozinhos. Obradovic *et al.* (2005) também mencionaram o efeito positivo do uso de bacteriófagos combinado com ASM para controlar a mancha bacteriana no tomateiro.

Experimentos em campo na Flórida demonstraram que o uso de PAS (sais de ácido fosfórico) combinado com ASM reduziu significativamente a mancha bacteriana no tomateiro, sem afetar o rendimento. No entanto, são necessários mais experimentos em campo para confirmar esse efeito sobre a cultura do tomate (Wen *et al.*, 2009).

## **JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

A mancha bacteriana do tomateiro tem ocorrência mundial, sendo considerada uma das principais doenças da cultura (Silva-Lobo *et al.*, 2005). A doença atinge tanto tomate para processamento industrial, quanto para o consumo *in natura*, causando severos danos. No Brasil, há relatos sobre a ocorrência das espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha bacteriana em tomate industrial (Quezado-Soares *et al.*, 1998; Silva-Lobo VL, 2000; Quezado-Duval *et al.*, 2003a; Quezado-Duval *et al.*, 2004). No entanto, pouco se sabe sobre a ocorrência de espécies e raças de *Xanthomonas* em lavouras de tomate para mesa. A resistência da bactéria a produtos cúpricos e

antibióticos, os quais são empregados para o controle da doença, também vem sendo observada em tomate industrial no Brasil (Quezado – Duval *et al.*, 2003b; Nascimento, 2009), mas nenhum estudo foi realizado em lavouras de tomate para mesa.

Considerando o exposto acima, os objetivos deste estudo foram:

(1) Manter uma coleção de isolados de *Xanthomonas* associados à mancha bacteriana em tomate de mesa, originados de diferentes regiões produtoras do Brasil.

(2) Identificar os isolados ao nível específico através de rep-PCR, comparando-os aos isolados de referência de cada espécie, obtidos da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Instituto Biológico (IBSBF) e determinar a variabilidade intraespecífica das espécies de *Xanthomonas*.

(3) Caracterizar os isolados quanto à patogenicidade em tomate e pimentão e identificá-los quanto à raça.

(4) Caracterizar os isolados quanto à sensibilidade *in vitro* ao cobre e à estreptomicina.

## **HIPÓTESES**

(1) Quatro espécies de *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*) causam a mancha bacteriana em lavouras produtoras de tomate de mesa no Brasil.

(2) Assim como no tomate de indústria, apenas as raças T1, T2, e T3 estão presentes em lavouras de mesa.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABC sem, 2009. Associação Brasileira do comércio de sementes e mudas. Disponível em: [<http://www.ABCsem.com.br>]

Agrianual, 2008. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP consultoria e comércio, 479-484.

Aguiar LA, Kimura O, Castilho AM, Castilho KSC, Ribeiro RLD, Akiba F, Carmo MGF, 2000. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. *Agronomia*, **34**, 78-82.

Alves SMF, Fernandes PM, Marin JOB, 2008. Condições de trabalho associadas ao uso de agrotóxicos na cultura de tomate de mesa em Goiás. *Ciência agrotécnica* **32**, 1737-1742.

Barreto M, Scaloppi EAG, 2007. Sistema de previsão de doenças de hortaliças in: Zambolim L, ed. Manejo integrado – doenças pragas e plantas daninhas. Viçosa UFV, 169-189.

Bouzar H, Jones JB, Stall FJ, Louws RE, Louws FJ, Schneider M, Rademaker JLW, Brujin DE, Jackson LE, 1999. Multiphasic analysis of Xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. *Phytopathology* **89**, 328-335.

Carmo MGF, Macagnan D, Carvalho AO, 2001. Progresso da mancha-bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inóculo e do emprego ou não do controle com oxiclreto de cobre. *Horticultura Brasileira* **19**, 342-347.

Carmo MGF, Correa FM, Cordeiro ES, Carvalho AO, Rosseto CAV, 2004. Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. *Horticultura Brasileira* **22**, 579-584.

Corrêa FM, Carvalho AO, Carmo MGF, 2008. Inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomateiro. *Summa Phytopathologica* **34**, 71-75.

Cuppels DA, Louws FJ, Ainsworth T, 2006. Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Disease* **90**, 451-458.

Doidge EM, 1920. A tomato canker. *Journal of Department of Agriculture Union South Africa* **1**, 718-721.

Filgueira FAR, 2000. *Novo manual de olericultura*. Viçosa: UFV.

Filgueira FAR, 2003. *Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, berinjela e jiló*. Lavras: UFLA.

Gardner MW, Kendrick JB, 1921. Bacterial spot of tomato. *Journal of Agriculture* **21**, 123-156.

- Gardner MW, Kendrick JB, 1923. Bacterial spot of tomato and pepper. *Phytopathology* **13**, 307-315.
- Garrity GM, Holt JG, 2000. An overview of the road map to the manual. *Systematic Bacteriology*. New York: Springer.
- Goode M, Sasser M, 1980. Prevention the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. *Plant Disease* **64**, 831-834.
- Hert AP, Marutani M, Momol MT, Roberts PD, Olson SM, Jones JB, 2009. Suppression of the bacterial spot pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on tomato leaves by an attenuated mutant of *Xanthomonas perforans*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 3323-3330.
- Hildebrand DC, Palleroni NJ, Schroth MN, 1990. Deoxyribonucleic acid relatedness of 24 *Xanthomonas* strain representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, 263-269.
- Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA, 1997. *Compendium of Tomato Diseases*. St Paul: American Phytopathological Society press.
- Jones JB, Stall RE, Bouzar H, 1998. Diversity among Xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annual Review of Phytopathology* **36**, 41-58.
- Jones JB, Bouzar H, Stall RE, Almira EC, Robert PD, Bowen BW, Sudberry J, Strickler PM, Chun J, 2000. Systematic analysis of Xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated whit pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1211-1219.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW, 2004a. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* **27**, 755-762.
- Jones JB, Momol MT, Balogh B, Olson SM, 2004b. Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Disease* **88**, 736-740.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Minsavage GV, Stall RE, Schaad NW, 2005. Bacterial spot – Worldwide distribution, importance and review. *Acta Horticulturae* **695**, 27-33.
- Jones JB, Jackson LE, Balogh B, Obradovic A, Iriarte FB, Momol MT, 2007. Bacteriophages for plant diseases control. *Annual Review of Phytopathology* **45**, 245-262.
- Koenraad H, van Betteray B, Germain R, Hiddink G, Jones JB, Oosterhof J, Rijlaarsdam A, Roorda P, Wouldt B, 2009. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *Acta Horticulturae* **808**, 99-102.

Kurylowicz W, 1981. *Antibióticos - Uma revisão crítica*. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Leach JE White FF, 1996. Bacterial avirulence genes. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 153-179.

Leite Júnior RP, Jones JB, Somodi GC, Minsavage GV, Stall RE, 1995. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Disease* **79**, 917-922.

Lopes CA, Santos JRM, 1994. *Doenças do tomateiro*. Embrapa-CNPH.

Lopes CA, Quezado-Soares AM, 1997. *Doenças Bacteriana das Hortaliças – Diagnose e controle*. Embrapa – CNPH.

Louws FJ, Fuibright DW, Stephens CT, Bruijn FJ, 1994. Specific genome fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* e *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2286-2295.

Louws FJ, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, 1999. The three D's of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection and disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* **37**, 81-125.

Malavolta Junior VA, 2007. *Doenças bacterianas em tomateiro: Etiologia e controle*. Disponível em [<http://www.pontaluniagro.com.br/realizações/doebacter.pdf>].

Marco GM, Stall RE, 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease* **67**, 779-781.

Maringoni AC, Kurozawa C, 1994. Erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro. *Revista Brasileira de Sementes* **16**, 191-194.

Martin B, Hunbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, Andrew P, Prudhomme M, Alloing G, Hakenbeck R, Marrison DA, Boulnois GJ, Claverys JP, 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research* **20**, 3479-3483.

Moretti C, Amatulli MT, Buonauro R, 2009. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. *Letters in Microbiology* **49**, 466-471.

Nascimento AR, 2009. Ação de produtos químicos in vitro, em mudas e campos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*) em tomate para processamento industrial. Goiás: Universidade Federal de Goiás. Escola de Agronomia e engenharia de alimentos, Tese de Doutorado.

Obradovic A, Mavridis A, Rudolph K, Janse JD, Arsenijevic M, Jones JB, Minsavage GV, Wang JF, 2004. Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas*

*campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 285-292.

Obradovic A, Jones JB, Momol MT, Olson SM, Jackson LE, Balogh B, Guven K, Iriarte FB, 2005. Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Disease* **89**, 712-716.

Quezado-Duval AM, 2003a. Diversidade de *Xanthomonas* spp. Associadas à mancha bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil. Piracicaba, São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Tese de Doutorado.

Quezado-Duval AM, Gazzoto Filho A, Leite Junior RP, Camargo LEA, 2003b. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira* **21**, 672-677.

Quezado-Duval AM, Camargo LEA, 2004a. Raças de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil. *Horticultura Brasileira* **22**, 80-86.

Quezado-Duval AM, Leite Junior RP, Truffi D, Camargo LEA, 2004b. Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central-west Brazil. *Plant Disease* **88**, 157-161.

Quezado-Duval AM, Guimarães CMN, Silva CS, 2008. Tigüeras: uma fonte de inóculo inicial da mancha bacteriana em tomate para processamento industrial. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Embrapa Hortaliças.

Quezado-Soares AM, Silva VL, Giordano LB, Lopes CA, 1998. Redução na produtividade de tomateiro para processamento industrial devido à mancha bacteriana. *Horticultura Brasileira* **16**, 1998.

Rabalho AA, 2007. *Xanthomonas* spp. causadora da mancha bacteriana do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.): detecção em sementes e diferenciação. Piracicaba, São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Tese de Doutorado.

Rademaker JLW, Louws FJ, Shultz MH, Rossbach U, Vauterin L, Swings J, de Bruijn FJ, 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* **95**, 1098-1111.

Robbins MD, Darrigues A, Sim SC, Masud MAT, Francis DM, 2009. Characterization of hypersensitive resistance to bacterial spot race T3 (*X. perforans*) from tomato accession PI 128216. *Phytopathology* **99**, 1037-1044.

Rodrigues Neto J, Sugimori MH, Malavolta Júnior VA, 1984. Raças de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, no estado de São Paulo. Arquivo do Instituto Biológico **51**, 13-16.

Sharples GJ, Lloyd RG, 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research* **18**, 6503-6508.

- Sherbakoff CD, 1918. Report of the associate plant pathologist. *Florida Agriculture Experiment Station Report 1916-1917*, 66R-86R.
- Silva-Lobo VL, 2000. Herança e componentes da resistência à mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, raça 2), em tomateiro. Brasília, DF: Universidade de Brasília, Tese de Doutorado.
- Silva-Lobo VL, Giordano LB, Lopes CA, 2005. Herança da resistência à mancha bacteriana em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* **30**, 343-349.
- Souza MFR, Rodrigues R, Amaral Junior AT, Sudré CP, 2008. Resistance to *Xanthomonas* spp. in tomato: diallel analysis and gene effects estimative in a breeding programme carried out in Brazil. *Journal of Phytopathology* **156**, 660-667.
- Stall RE, 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: cause of bacterial spot of tomato and pepper. In: Swings JG, Civerolo EL. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 57-60.
- Stall RE, Jones JB, Minsavage GV, 2009. Durability of resistance in tomato and pepper to *Xanthomonads* causing bacterial spot. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 265-284.
- Stall RE, Thayer PL, 1962. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Disease Reporter* **46**, 389-392.
- Stern MJ, Ames GFL, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF, 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* **37**, 1015-1026.
- Šutic D, 1957. Bakterioze Crvenog patlidzana. Tomato bacteriosis. *The Review of Applied Mycology* **36**, 734-735.
- Vakili NG, 1967. Importance of wounds in bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*) of tomatoes in the field. *Phytopathology* **57**, 1099-1003.
- Vauterin L, Swings J, Kersters K, 1991. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *Journal of General Microbiology* **137**, 1677-1687.
- Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings J, 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 472-489.
- Wen A, Balogh B, Momol MT, Olson SM, Jones JB, 2009. Management of bacterial spot of tomato with phosphorous acid salts. *Crop Protection* **28**, 859-863.
- Yang W, Miller SA, Scott JW, Jones JB, Francis DM, 2004. Mining tomato genome sequence databases for molecular markers: application to bacterial resistance and marker assisted selection. *Acta Horticulturae* **695**, 241-250.

## **CAPÍTULO 2**

---

Ocorrência, identificação e caracterização das espécies de *Xanthomonas*, causadoras de mancha bacteriana em tomate para mesa no Brasil

## **OCORRÊNCIA, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *XANTHOMONAS*, CAUSADORAS DE MANCHA BACTERIANA EM TOMATE PARA MESA NO BRASIL**

Roberta C. Pereira<sup>1</sup>, Edivânio R. Araújo<sup>1</sup>, Alice M. Quezado-Duval<sup>2</sup> e Marisa A.S.V. Ferreira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília-DF, Brasil. <sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, BR060, Km 9, 70359-970, Brasília-DF, Brasil.  
E-mail: alice@cnpq.embrapa.br

A mancha bacteriana do tomateiro é causada por, pelo menos, quatro espécies de *Xanthomonas* (*Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*), sendo uma das doenças mais importantes tanto para o tomate de mesa, quanto para o de indústria no Brasil. Oitenta e um isolados oriundos de campos comerciais de tomate para mesa, coletados em 23 localidades nas Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, entre os anos de 2005 a 2009, foram identificados para determinar a ocorrência dessas espécies. Esses isolados foram caracterizados por rep-PCR (BOX e REP), PCR com iniciadores específicos e testes de patogenicidade em genótipos suscetíveis de tomateiro e pimentão. Alta frequência de *X. perforans* (49,4%) e *X. gardneri* (40,7%) foi observada. Somente dois isolados corresponderam a *X. euvesicatoria* e seis a *X. vesicatoria*. Apenas na Região Sudeste do país foi detectada a presença das quatro espécies. Todos os isolados causaram sintomas em tomate, e somente isolados de *X. euvesicatoria* e 30 isolados de *X. gardneri* causaram sintomas em pimentão. Para determinação das raças, avaliou-se a presença/ausência dos genes *avrRxv* (presentes na raça T1) e *avrXv3* e reação no genótipo de tomateiro CNPH 1500, portador do gene *Xv3*. Todos os isolados de *X. perforans* induziram reação de hipersensibilidade neste genótipo, indicando que pertencem à raça T3, o que foi, na maioria dos casos, confirmado por *avrXv3*-PCR. Isolados de *X. vesicatoria* e *X. gardneri* foram classificados como raça T2, pois nenhum produto foi detectado por PCR (genes *avrRxv* e *avrXv3*). Dentre os 81 isolados, portanto, foram identificadas as raças

T1, T2 e T3, não sendo encontradas as raças T4 e T5. Avaliou-se também a sensibilidade *in vitro* de todos os isolados ao cobre e estreptomicina. Utilizou-se sulfato de cobre nas concentrações 50, 100 e 200 µg/mL e sulfato de estreptomicina nas concentrações 25, 50 e 100 µg/mL, considerando-se resistentes os isolados que apresentaram crescimento confluyente em três repetições. Nenhum isolado foi resistente ao cobre na concentração de 200 µg/mL. Entretanto, 97,53% dos isolados foram resistentes a 100 µg/mL e 98,77% foram resistentes à concentração de 50 µg/mL. A frequência de isolados resistentes à estreptomicina foi 8,64% (100 µg/mL), 76,54% (50 µg/mL) e 83,95% (25 µg/mL). Isolados representantes das quatro espécies apresentaram resistência a ambos, cobre e estreptomicina. Este é o primeiro levantamento e caracterização de espécies de *Xanthomonas* em tomate de mesa no Brasil.

Palavras-chave: Diagnose, rep-PCR, resistência ao cobre, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

## INTRODUÇÃO

A mancha bacteriana do tomateiro é causada por pelo menos quatro espécies de *Xanthomonas*: *X. euvesicatoria* (grupo A); *X. vesicatoria* (grupo B); *X. perforans* (grupo C); e *X. gardneri* (grupo D) (Jones *et al.*, 2004). É considerada uma das doenças mais importante para a cultura, devido à eficiência variável do controle químico, indisponibilidade de cultivares com resistência adequada, rápida disseminação nas lavouras sob condições favoráveis e transmissão por sementes contaminadas (Jones *et al.*, 1997).

Cinco raças foram identificadas entre as espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana, denominadas: T1 (*X. euvesicatoria*), T2 (*X. vesicatoria* e *X. gardneri*), T3, T4 e T5 (*X. perforans*) (Jones *et al.*, 2005). As raças T1, T2 e T3 têm sido identificadas com base em reações diferenciais em genótipos de tomateiro. As raças T4 e T5 de *X. perforans* (grupo C) foram identificadas na Flórida, EUA. Essas raças surgiram devido a mutações no gene *avrXv3* e nos genes *avrXv3* e *avrXv4*, respectivamente (Jones *et al.*, 2005). No Brasil foram encontradas as raças T1, T2 e T3 em tomate para processamento industrial (Quezado-Duval & Camargo, 2004).

Métodos moleculares têm facilitado análises genômicas dos microrganismos, possibilitando o aumento da capacidade de caracterizar e classificar estirpes, e de avaliar a diversidade genética das populações. A diversidade das populações pode ser analisada de maneira eficiente, com o uso de métodos como o rep-PCR (repetitive-polymerase chain reaction), AFLP (amplified fragment length polymorphism) e o PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) (Louws *et al.*, 1999).

O rep-PCR é baseado em sequências de DNA conservadas, dispersas no genoma. Os elementos REP (repetitive extragenic palindromic), ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) e BOX correspondem a essas sequências de DNA

repetitivas, que são usadas para a distinção de estirpes relacionadas e também para avaliar a diversidade genética de patógenos de planta (Louws *et al.*, 1999). O método rep-PCR foi útil na diferenciação dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e os de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Mahuku *et al.*, 2006). Isolados de *Xanthomonas* que infectam alho também foram caracterizados por rep-PCR, entre outras técnicas (Gent *et al.*, 2004). Bouzar *et al.* (1999) também utilizaram rep-PCR para caracterizar isolados de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha bacteriana em tomateiro, identificando os quatro grupos descritos até então (A, B, C e D).

Análises de PCR-RFLP da região intergênica 16S-23S do rDNA e de uma região do gene *groEL* foram realizadas por Marques (2000) permitindo a diferenciação entre *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*, através da análise dos polimorfismos nessas regiões. Rabalho (2007) através da análise de restrição enzimática da região 16S-23S do rDNA, também observou polimorfismos entre isolados de *Xanthomonas* causadora da mancha bacteriana, no entanto, não foi possível diferenciar as quatro espécies.

Iniciadores (“primers”) específicos foram desenvolvidos para as espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana. O uso da PCR com tais iniciadores pode vir a ser um método rápido, sensível e específico para a detecção e identificação das espécies envolvidas, em novas áreas ou em material propagativo (Moretti *et al.*, 2009; Koenraadt *et al.*, 2009). Koenraadt *et al.* (2009) desenvolveram iniciadores específicos para as quatro espécies de *Xanthomonas* a partir de sequenciamento de fragmentos de DNA obtidos por AFLP. A especificidade desses iniciadores foi testada com isolados de diferentes origens geográficas, no entanto, especialmente para *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*, devido ao pequeno número de isolados utilizados, os autores sugeriram a necessidade de uma validação mais ampla desses iniciadores. Recentemente foram desenvolvidos iniciadores específicos para *X.*

*euvesicatoria*, desenhados a partir da seqüência de fragmentos de DNA obtidos por REP-PCR (Moretti *et al.*, 2009).

Além de métodos moleculares, características fenotípicas também podem ser utilizadas para diferenciar algumas espécies de *Xanthomonas*. Segundo Jones *et al.* (2004), *X. perforans* e *X. vesicatoria* são fortemente amilolíticas e pectolíticas. Já *X. euvesicatoria* é fracamente amilolítica e pectolítica e *X. gardneri* é caracterizada por não hidrolizar amido ou pectato (Bouzar *et al.*, 1999).

O controle químico da mancha bacteriana do tomateiro tem sido feito utilizando fungicidas cúpricos e antibióticos agrícolas. No entanto, o aparecimento de estirpes resistentes a esses produtos tem contribuído para a baixa eficiência do controle. O primeiro relato de resistência ao antibiótico estreptomicina foi feito na Flórida, cujo uso, na época, era permitido para a hortaliça (Stall & Thayer, 1962). Também na Flórida, foi feito o primeiro relato de resistência ao cobre (Marco & Stall, 1983). Bouzar *et al.* (1999) relataram o aparecimento de estirpes resistentes à estreptomicina e ao cobre, no Caribe e na América Central. Relatos da baixa eficiência de produtos cúpricos em lavouras de tomate (Quezado-Soares & Lopes, 1999) e de pimentão (Carmo *et al.*, 2001) também estão descritos. Quezado-Duval *et al.* (2003b) relataram a existência de isolados de tomate para processamento industrial no Brasil resistentes ao cobre e à estreptomicina. Na ocasião, os autores descreveram que nenhum dos isolados foi resistente ao cobre na concentração de 200 µg/mL de sulfato de cobre, havendo diferença de sensibilidade na concentração de 50 µg/mL. Todos os isolados do grupo C (atualmente *X. perforans*) foram sensíveis à estreptomicina. Nascimento (2009) avaliou a sensibilidade, *in vitro*, de isolados de *X. perforans* e *X. gardneri* oriundos de tomate de lavoura para processamento industrial aos agrotóxicos registrados para o controle da mancha bacteriana. A eficiência do hidróxido de cobre foi testada em seis concentrações

e a sensibilidade foi constatada somente na maior concentração utilizada, a qual corresponde à dosagem cem vezes superior à recomendada.

A caracterização das espécies de *Xanthomonas* que causam a mancha bacteriana em tomate e sua distribuição nas regiões produtoras no país é importante como suporte para futuros projetos de melhoramento genético, auxiliando na escolha de genótipos ou cultivares de tomate mais adequados para cada região. Por outro lado, as ferramentas moleculares podem ser extremamente úteis para a diagnose correta da mancha bacteriana. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar, através de métodos fenotípicos e moleculares, as espécies e raças de *Xanthomonas*, isoladas de tomateiro em lavouras para mesa das Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, entre os anos de 2005 a 2009 e avaliar os isolados quanto a sensibilidade *in vitro* ao cobre e estreptomicina.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Obtenção, cultivo e preservação dos isolados**

Folhas e frutos apresentando sintomas foram coletados em campos de produção de tomate de mesa em 11 estados das Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do país, nos anos de 2005 a 2009 (Tabela 1).

Das amostras de folhas ou frutos com sintomas de mancha bacteriana foram retirados pedaços do tecido lesionado, sendo então desinfestados superficialmente com etanol 70% durante 10 segundos. Em seguida, os pedaços foram colocados em hipoclorito de sódio 3 % por 30 segundos e enxaguados em água destilada estéril. Após esse procedimento, fez-se a maceração dos tecidos em 100 µL de água destilada estéril. A suspensão obtida foi distribuída em meio Ágar Nutriente (AN) (10 g de peptona; 3 g de extrato de carne; 20 g de ágar em 1 L de água), pelo método de estrias ou riscas. As

placas foram incubadas em câmaras de crescimento a temperatura de 28°C durante três dias. Colônias típicas de *Xanthomonas* foram repicadas para novas placas contendo meio AN para obtenção de culturas puras. Para preservação a curto e médio prazo, os isolados foram armazenados em tampão fosfato (1,48 g de  $K_2HPO_4$ ; 1,02 g de  $KH_2PO_4$  em 1 L de água; pH 7,0) e mantidos a temperatura ambiente.

**Tabela 1** Designação, origem e caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Xanthomonas* coletados em campos de tomate de mesa com sintomas de mancha bacteriana

Isolado	Local / ano de coleta	Variedade ou segmento varietal	Patogenicidade		Haplótipo		Espécie <sup>c</sup>	Raça
			Cv. Bonny Best (Tomate)	Cv. Early Calwonder (Pimentão)	BOX	REP		
CNPH 2009-46	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	+	HB1	HR1	XE	T1
CNPH 2009-47	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	+	HB2	HR1	XE	T1
CNPH 2008-32	Luziânia-GO / 2008	SI <sup>a</sup>	+	-	HB3	HR2	XV	T2
CNPH 2008-167	Paty do Alferes-RJ / 2008	Gladiador	+	-	HB4	HR3	XV	T2
CNPH 2008-168	Paty do Alferes-RJ / 2008	Gladiador	+	-	HB4	HR3	XV	T2
CNPH 2008-170	Paty do Alferes-RJ / 2008	Gladiador	+	-	HB4	HR3	XV	T2
CNPH 2008-169	Paty do Alferes-RJ / 2008	Gladiador	+	-	HB5	HR4	XV	T2
CNPH 2009-42	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	-	HB6	HR5	XV	T2
CNPH 2005-11	São José dos Pinhais-PR / 2005	SI	+	+	HB7	HR6	XG	T2
CNPH 2007-20	Marilândia do sul-PR / 2007	Dominador	+	+	HB7	HR6	XG	T2
CNPH 2007-22	Marilândia do sul-PR / 2007	Dominador	+	+	HB7	HR6	XG	T2
CNPH 2007-31	Caxias do Sul-PR / 2007	Nemonetta	+	+	HB7	HR6	XG	T2
CNPH 2007-32	Caxias do Sul-PR / 2007	Nemonetta	+	+	HB7	HR6	XG	T2
CNPH 2007-35	Caí-RS / 2007	Empire	+	+	HB7	HR6	XG	T2
CNPH 2007-37	Caí-RS / 2007	Empire	+	+	HB7	HR6	XG	T2
CNPH 2006-06	Mucugê-BA / 2006	Saladinha <sup>b</sup>	+	+	HB8	HR6	XG	T2
CNPH 2007-12	Goianápolis-GO / 2007	SI	+	+	HB8	HR6	XG	T2
CNPH 2006-08	Ibicoara -BA / 2006	Saladinha <sup>b</sup>	+	+	HB9	HR6	XG	T2
CNPH 2007-13	Goianápolis-GO / 2007	SI	+	+	HB9	HR6	XG	T2
CNPH 2008-171	São Sebastião do Alto-RJ / 2008	Dominador	+	+	HB9	HR6	XG	T2
CNPH 2008-179	Espírito Santo-ES / 2008	SI	+	+	HB9	HR6	XG	T2
CNPH 2009-22	Goianápolis-GO / 2009	Dominador	+	+	HB9	HR6	XG	T2
CNPH 2007-17	Marilândia do sul-PR / 2007	Pollyana	+	+	HB10	HR6	XG	T2
CNPH 2007-18	Marilândia do sul-PR / 2007	Pollyana	+	+	HB11	HR7	XG	T2
CNPH 2007-19	Marilândia do sul-PR / 2007	Pollyana	+	-	HB11	HR7	XG	T2
CNPH 2007-34	Caxias do Sul-PR / 2007	Nemonetta	+	+	HB12	HR6	XG	T2
CNPH 2007-40	Caí-RS / 2007	SI	+	+	HB13	HR8	XG	T2

CNPH 2007-41	Caí-RS / 2007	SI	+	+	HB13	HR8	XG	T2
CNPH 2007-42	Santa Lucia-RS / 2007	Empire	+	+	HB13	HR8	XG	T2
CNPH 2007-43	Santa Lucia-RS / 2007	Empire	+	+	HB13	HR8	XG	T2
CNPH 2007-44	Santa Lucia-RS / 2007	Empire	+	+	HB13	HR8	XG	T2
CNPH 2007-45	Santa Lucia-RS / 2007	Empire	+	+	HB13	HR8	XG	T2
CNPH 2008-35	São Paulo-SP / 2008	Paron	+	+	HB13	HR8	XG	T2
CNPH 2008-22	Espírito Santo-ES / 2008	SI	+	+	HB14	HR9	XG	T2
CNPH 2009-30	Araguari-MG / 2009	SI	+	+	HB15	HR6	XG	T2
CNPH 2009-33	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	-	HB15	HR6	XG	T2
CNPH 2009-37	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	-	HB15	HR6	XG	T2
CNPH 2009-40	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	+	HB15	HR6	XG	T2
CNPH 2009-45	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	+	HB15	HR6	XG	T2
CNPH 2009-49	Araguari-MG / 2009	Paron	+	+	HB15	HR6	XG	T2
CNPH 2009-183	Teresópolis-RJ / 2009	Cerejinha <sup>b</sup>	+	+	HB15	HR6	XG	T2
CNPH 2006-10	Ibicoara -BA / 2006	Itapitã	+	-	HB16	HR10	XP	T3
CNPH 2008-172	São Sebastião do Alto-RJ / 2008	Dominador	+	-	HB16	HR10	XP	T3
CNPH 2008-173	São Sebastião do Alto-RJ / 2008	Dominador	+	-	HB16	HR10	XP	T3
CNPH 2008-174	São Sebastião do Alto-RJ / 2008	Dominador	+	-	HB16	HR10	XP	T3
CNPH 2008-175	São Sebastião do Alto-RJ / 2008	Dominador	+	-	HB16	HR10	XP	T3
CNPH 2008-176	Miracema-RJ / 2008	Alambra	+	-	HB16	HR10	XP	T3
CNPH 2008-177	Miracema-RJ / 2008	Alambra	+	-	HB16	HR10	XP	T3
CNPH 2009-12	Anápolis-GO / 2009	Dominador	+	-	HB16	HR10	XP	T3
CNPH 2009-13	Anápolis-GO / 2009	Dominador	+	-	HB16	HR10	XP	T3
CNPH 2009-14	Anápolis-GO / 2009	Dominador	+	-	HB16	HR10	XP	T3
CNPH 2009-15	Anápolis-GO / 2009	Dominador	+	-	HB16	HR10	XP	T3
CNPH 2009-20	Goianápolis-GO / 2009	Dominador	+	-	HB16	HR10	XP	T3
CNPH 2008-36	Catalão-GO / 2008	San Vito	+	-	HB17	HR11	XP	T3
CNPH 2009-21	Goianápolis-GO / 2009	Dominador	+	-	HB17	HR11	XP	T3
CNPH 2009-23	Goianápolis-GO / 2009	Dominador	+	-	HB17	HR11	XP	T3
CNPH 2009-05	Camocim São Félix-PE / 2009	SI	+	-	HB18	HR12	XP	T3

CNPH 2009-31	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	-	HB18	HR12	XP	T3
CNPH 2009-32	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	-	HB18	HR12	XP	T3
CNPH 2009-38	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	-	HB18	HR12	XP	T3
CNPH 2009-39	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	-	HB18	HR12	XP	T3
CNPH 2009-44	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	-	HB18	HR12	XP	T3
CNPH 2009-24	Goianápolis-GO / 2009	Dominador	+	-	HB19	HR11	XP	T3
CNPH 2009-48	Araguari-MG / 2009	Paron	+	-	HB19	HR13	XP	T3
CNPH 2009-26	Goianápolis-GO / 2009	Dominador	+	-	HB20	HR11	XP	T3
CNPH 2009-34	Uberaba-MG / 2009	Alambra	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-55	Araguari-MG / 2009	Paron	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-56	Araguari-MG / 2009	Paron	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-57	Araguari-MG / 2009	Alambra	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-58	Araguari-MG / 2009	Alambra	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-59	Araguari-MG / 2009	Alambra	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-61	Araguari-MG / 2009	Alambra	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-78	Guaraciaba do norte-CE / 2009	Dominador	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-79	Guaraciaba do norte-CE / 2009	Dominador	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-80	Guaraciaba do norte-CE / 2009	Dominador	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-95	Viçosa do Ceará-CE / 2009	Dominador	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-97	Viçosa do Ceará-CE / 2009	Dominador	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-177	Tangará da Serra-MT / 2009	Juliana	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-179	Tangará da Serra-MT / 2009	Juliana	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-181	Tangará da Serra-MT / 2009	Juliana	+	-	HB20	HR10	XP	T3
CNPH 2009-182	Tangará da Serra-MT / 2009	Juliana	+	-	HB20	HR10	XP	T3

<sup>a</sup>SI = Sem identificação

<sup>b</sup>Segmento varietal

<sup>c</sup>XE = *Xanthomonas euvesicatoria*; XV = *X. vesicatoria*; XG = *X. gardneri*; XP = *X. perforans*

## **Caracterização bioquímica**

Testes bioquímicos foram realizados para confirmação da identificação dos isolados ao nível de gênero, de acordo com Schaad *et al.* (2001). Após o isolamento em meio AN, os isolados que apresentaram colônias convexas, brilhantes, lisas e de cor amarela foram repicados e submetidos aos seguintes testes: teste KOH (alternativo ao teste Gram); teste de crescimento aeróbico; fluorescência em meio King's B; crescimento de colônias amarelas em meio AN; crescimento a 33° em meio YDC; e atividade de catalase.

## **Reação de hipersensibilidade em fumo (*Nicotiana tabacum* L.)**

Os isolados foram cultivados em meio AN e em seguida foram incubados a 28°C por um período de 3 a 5 dias. Uma colônia foi selecionada e repicada sob as mesmas condições. Preparou-se suspensão bacteriana com sulfato de magnésio (10 mMol/L) e a concentração ajustada para aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC/mL ( $A_{600} = 0,3$ ) em espectrofotômetro (Micronal B495). Em seguida, procederam-se as infiltrações na epiderme, na face abaxial das folhas de fumo. A infiltração foi realizada com o auxílio de seringas hipodérmicas de plástico com capacidade de 1 mL. A suspensão bacteriana foi infiltrada até a obtenção de uma área encharcada. As plantas foram submetidas a ciclos de 12h/12h (luz/escuro) a 28°C e a reação de hipersensibilidade foi constatada através da necrose dos tecidos em até 24 horas após a inoculação.

## **Testes de patogenicidade**

Os isolados, com características de colônias típicas de *Xanthomonas*, foram inoculados em plantas das cultivares suscetíveis Bonny Best (tomate) e Early Calwonder (pimentão) (Jones *et al.*, 2000). As plantas foram obtidas através do semeio

de 1-2 sementes por célula em bandeja de poliestereno de 128 células com substrato Plantmax<sup>®</sup>. As plantas foram transplantadas (uma planta/vaso) 3-4 semanas após o semeio, para vasos preenchidos com solo esterilizado. Os isolados foram riscados em meio AN conforme descrito anteriormente. Colônias bacterianas foram transferidas para tubos Falcon contendo 30 mL de sulfato de magnésio (10 mMol/L). A suspensão obtida foi agitada e a concentração foi ajustada para aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC/mL em espectrofotômetro ( $A_{600} = 0,3$ ) (Micronal B495). A suspensão foi inoculada com auxílio de borrifador manual quando as plantas estavam com cerca de cinco folhas verdadeiras. As plantas foram mantidas em câmaras úmidas feitas com sacos de plástico transparente, durante dois dias e permaneceram em casa de vegetação (25 a 35°C) até o desenvolvimento dos sintomas.

## **Caracterização molecular**

### **Extração de DNA**

O DNA genômico foi extraído utilizando-se o método CTAB de Ausubel *et al.* (1992) com modificações. Colônias bacterianas cultivadas em meio sólido AN foram transferidas para meio nutriente líquido e mantidas sob agitação por um período de 20-24 horas. Após esse período seguiu-se com a centrifugação de 1,5 mL da cultura a 4600 x g por 10 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 520 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) e agitado. Adicionou-se 15 µL de SDS 20% e 3 µL de proteinase K (20 mg/mL). A suspensão foi incubada por uma hora a 37°C. Em seguida adicionou-se 100 µL de NaCl 5M e 80 µL de CTAB/NaCl (CTAB 10% em 0,7 M de NaCl). A suspensão foi incubada a 65°C por 10 minutos e mantida no gelo por 15 minutos. Um volume igual de clorofórmio: álcool isoamil (24:1) foi adicionado à suspensão e esta foi,

mantida em gelo por 5 minutos até nova centrifugação a 7200 x g /20 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo novo, adicionando-se 0,6 do volume de isopropanol para a precipitação do DNA a -20°C por cerca de 20 horas. Seguiu-se com a centrifugação a 7200 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, o DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70% e o precipitado foi seco a 37° por uma hora em estufa. Os ácidos nucléicos precipitados foram então dissolvidos em 50 µL de TE e armazenados a - 20°C.

### **Quantificação do DNA**

A quantificação foi realizada através da comparação visual com o marcador molecular High DNA Mass Ladder (Invitrogen). Através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, preparado em tampão 0,5X TBE (5,4 g de Tris-base, 2,75g de ácido bórico e 0,375g de EDTA para 1000 mL). Para tal, 5 µL do DNA extraído dos isolados foram misturados a 2 µL do tampão de carregamento 6X loading dye (Promega). Os isolados foram submetidos a uma corrente constante de 90V/1hora e, em seguida, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ mL) por 15 minutos. Em seguida realizou-se a descoloração em água destilada por 15 minutos e a digitalização em fotodocumentador L-PIX ST (Loccus biotecnologia).

### **Identificação das espécies de *Xanthomonas* por métodos moleculares**

Os isolados obtidos de lavouras de tomate foram identificados quanto à espécie através da comparação dos perfis genômicos obtidos por rep-PCR com os isolados de referência das quatro espécies, e com iniciadores específicos e posterior confirmação por PCR dos haplótipos com iniciadores específicos. Os isolados de referência foram fornecidos por Júlio Rodrigues Neto, curador da Coleção de Fitobactérias Patogênicas

do Instituto Biológico de Campinas, sendo denominados: IBSBF 2363 (*Xanthomonas euvesicatoria*), IBSBF 2364 (*X. vesicatoria*), IBSBF 2370 (*X. perforans*) e IBSBF 2373 (*X. gardneri*). Replicatas dos isolados de referência foram preservados em meio nutriente líquido contendo 30% de glicerol, a -80°C e em tampão fosfato (1,48 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,02 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 1 L de água; pH 7,0) a temperatura ambiente, e mantidos nas coleções de trabalho da Universidade de Brasília e da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF.

### **rep-PCR**

Para as reações de amplificação utilizou-se iniciadores correspondentes às seqüências repetitivas BOX 1AR (5'CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G) e o par REP 1R (5'-III ICG ICG ICA TCI GGC) e REP 2 (5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC) (Versalovic *et al.*, 1991). A reação foi composta de: Tampão 1X; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada um dos dNTPs; 2 µM de cada iniciados; 1,26 U de Taq DNA polimerase; aproximadamente 50 ng de DNA; e água milliQ para um volume final de 12µL. Os isolados foram amplificados em termociclador My Cyclex<sup>TM</sup> (BIO RAD). O programa utilizado para amplificação foi 95°C/7min seguido de 30 ciclos (para BOX-PCR) e 35 ciclos (para REP-PCR) de: 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 53°C por 1 minuto (BOX) e 44°C por 8 minutos (REP) para anelamento e 65°C por 8 minutos para a extensão. A extensão final foi realizada a 65°C por 15 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5%, por eletroforese conduzida a 90 V durante 2 horas e 45 minutos. Após esse período, o gel foi corado, descorado e digitalizado como descrito anteriormente. O marcador utilizado foi o 100 pb-DNA ladder (Promega). Para cada isolado, cada reação foi repetida pelo menos duas vezes.

Os perfis de amplificação dos isolados, obtidos por BOX e REP-PCR, foram analisados visualmente de acordo com a presença (1) e ausência (0) de bandas, separados e conjuntamente por meio do programa MVSP 3.1 (Multi-Variate Statistical Package, version 3.11h/1985-2000 (Kovach, 1999). A similaridade entre os isolados foi determinada pelo coeficiente de Sorensen, e a análise de agrupamento de acordo com método UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) para a construção de um dendrograma.

### **PCR com iniciadores específicos**

Os iniciadores desenhados por Koenraad *et al.* (2009) foram testados primeiramente com os isolados de referência (IBSBF) para verificação da especificidade e otimização do programa para amplificação. Para tal, foram testadas cinco diferentes temperaturas de anelamento (49,8; 56,2; 61,3; 65,7 e 68,0 °C) em termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf). O ciclo utilizado foi: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. A extensão final foi feita a 72°C por 7 minutos. Para *X. euvesicatoria* os iniciadores foram BS-XeF (5'-CTA GAA GAA CTC GGC GTA TCG) e BS-XeR (5'-GTC GGA CAT AGT GGA CAC ATA C) com amplificação esperada de um fragmento de 173 pb; *X. vesicatoria* com iniciadores BS-XvF (5'-CCA TGT GCC GTT GAA ATA CTT G) e BS-XvR (5'-ACA AGA GAT GTT GCT ATG ATT TGC) com fragmento de 138 pb; *X. gardneri* com iniciadores BS-XgF (5'-TCA GTG CTT AGT TCC TCA TTG TC) e BS-XgR (5'-TGA CCG ATA AAG ACT GCG AAA G) com fragmento de 154 pb; e *X. perforans* com iniciadores BS-XpF (5'-GTC GTG TTG ATG GAG CGT TC) e BS-XpR (5'-GTG CGA GTC AAT TAT CAG AAT GTG G) com fragmento de 197 pb. A composição da reação de amplificação foi a mesma utilizada para rep-PCR.

### **Identificação da raça T1 de *Xanthomonas euvesicatoria***

A presença do gene *avrRxv* foi verificada através de PCR, com a utilização de primers específicos RST 27 (5' - AGT CGC GCG GAC ATT TAG CCC CGC C) e RST 28 (5'-CGT CGA TGG TGC GCC TGG AAT GCG C) (Bouzar *et al.*, 1994). A reação foi composta por tampão 1X; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de cada dNTP; 0,5 μM de cada primer; 0,3 U de Taq DNA polimerase; e aproximadamente 50 ng de DNA em um volume final de 50 μl. As reações foram realizadas em termociclador My Cyclor™ (BIO RAD) com temperatura inicial de 95°C por cinco minutos, seguidos de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 64°C por 30 segundos (anelamento), e 72°C por 45 segundos (extensão). A extensão final foi a 72°C durante 5 minutos.

### **Identificação das raças de *Xanthomonas perforans***

A análise foi realizada com os 40 isolados, que tiveram perfis de BOX e REP-PCR semelhantes ao isolado de referência de *X. perforans* (IBSBF 2370). Verificou-se a presença do gene *avrXv3* por meio de PCR, com a amplificação de um fragmento de 654-pb. Utilizaram-se os iniciadores RST88 (5'-CCG CTC GAG A TGA CAA GTA GTA TCA ATC) e RST89 (5'-CTC GAG CTA CTT AAC GAG ATT TGT TAC) (Astua-Monge *et al.*, 2000). A reação foi composta como descrita para amplificação do gene *avrRxv*, com exceção da concentração dos iniciadores que foi de 1,0 μM. O programa para amplificação foi composto de: desnaturação inicial de 95°C por 30 segundos, anelamento de 48°C por 30 segundos, extensão de 72°C por 60 segundos, seguida de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos. A extensão final foi a 72°C durante 5 minutos.

Após a realização da PCR para detecção do gene *avrXv3*, foi conduzido o teste de inoculação em genótipo de tomate CNPH 1500 (= FL7060-NIL216). O genótipo NIL

216 foi obtido pela Universidade da Flórida, sendo uma linha quase isogênica de FL7060, mas portando resistência por hipersensibilidade à raça T3 (*X. perforans*) originalmente encontrada no acesso PI 128216. O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita para o teste em fumo e a reação de hipersensibilidade foi constatada pela observação de necrose dos tecidos em até 36 horas após a inoculação. Além de CNPH 1500, foi feita a inoculação por infiltração na cultivar suscetível Bonny Best. Paralelamente à infiltração, todos os isolados foram inoculados por pulverização em CNPH 1500 e Bonny Best. A reação de hipersensibilidade é induzida em CNPH 1500 por isolados da raça T3, já para os isolados pertencentes às raças T4 e T5, o mesmo não ocorre.

### **Hidrólise de amido**

Isolados identificados como *X. vesicatoria* e *X. gardneri*, ambos pertencentes à raça T2, puderam também ser diferenciados pela capacidade em hidrolisar amido. Os isolados foram cultivados em meio AN suplementado com 1% de amido de milho (Maizena<sup>®</sup>). A hidrólise foi observada pela presença de um halo transparente ao redor da colônia formada. Os isolados IBSBF 2364 (*X. vesicatoria*) e IBSBF 2373 (*X. gardneri*) foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

### **Sensibilidade ao cobre e estreptomicina**

Foram avaliados todos os 81 isolados quanto à sensibilidade *in vitro* ao cobre e ao antibiótico estreptomicina. Para a realização dos testes, esses isolados (mantidos em tampão fosfato) foram transferidos para meio AN e incubados por 48 horas a 28°C. Após repicagem, as placas foram mantidas nas mesmas condições e as colônias bacterianas dissolvidas em 1 mL da solução sulfato de magnésio (10mMol/L), com

obtenção de suspensão bacteriana. Alíquotas de 10 µL desta suspensão foram depositadas em meio MMCC (medium minimal complexing copper) (Pohronezny *et al.*, 1992) e em meio AN para os testes de sensibilidade à cobre e ao antibiótico, respectivamente. O meio MMCC possui baixa capacidade de complexar íons cobre e foi suplementado com sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O–Merk) nas concentrações de 200 e 100 µg/mL (Obradovic *et al.*, 2004) e 50 µg/mL (Quezado-Duval *et al.*, 2003b). O meio AN foi suplementado com sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 25 µg/mL (Quezado-Duval *et al.*, 2003), 50 e 100 µg/mL (Obradovic *et al.*, 2004). Cada isolado foi testado em três repetições e avaliado após 72 horas de incubação a 28°C. Considerou-se resistentes os isolados que apresentaram crescimento confluyente nas três repetições.

## **RESULTADOS**

### **Caracterização bioquímica**

Todos os 81 isolados apresentaram: reação positiva no teste KOH, portanto, gram negativos; crescimento aeróbico em meio ágar-extrato de levedura-glucose 0,1%; ausência de fluorescência em meio King's B; colônias amarelas em meio AN; crescimento a 33°C em meio YDC; e atividade catalase positiva. Dessa forma, todos os isolados apresentaram características típicas do gênero *Xanthomonas* (Schaad *et al.*, 2001).

### **Reação de hipersensibilidade em fumo (*Nicotiana tabacum* L.)**

O teste de hipersensibilidade em folhas de fumo foi positivo para todos os 81 isolados, com reação necrótica e dessecação da região infiltrada. A resposta pode ser

observada em até 24 horas após a inoculação, indicando que todos os isolados tratavam-se de bactérias fitopatogênicas.

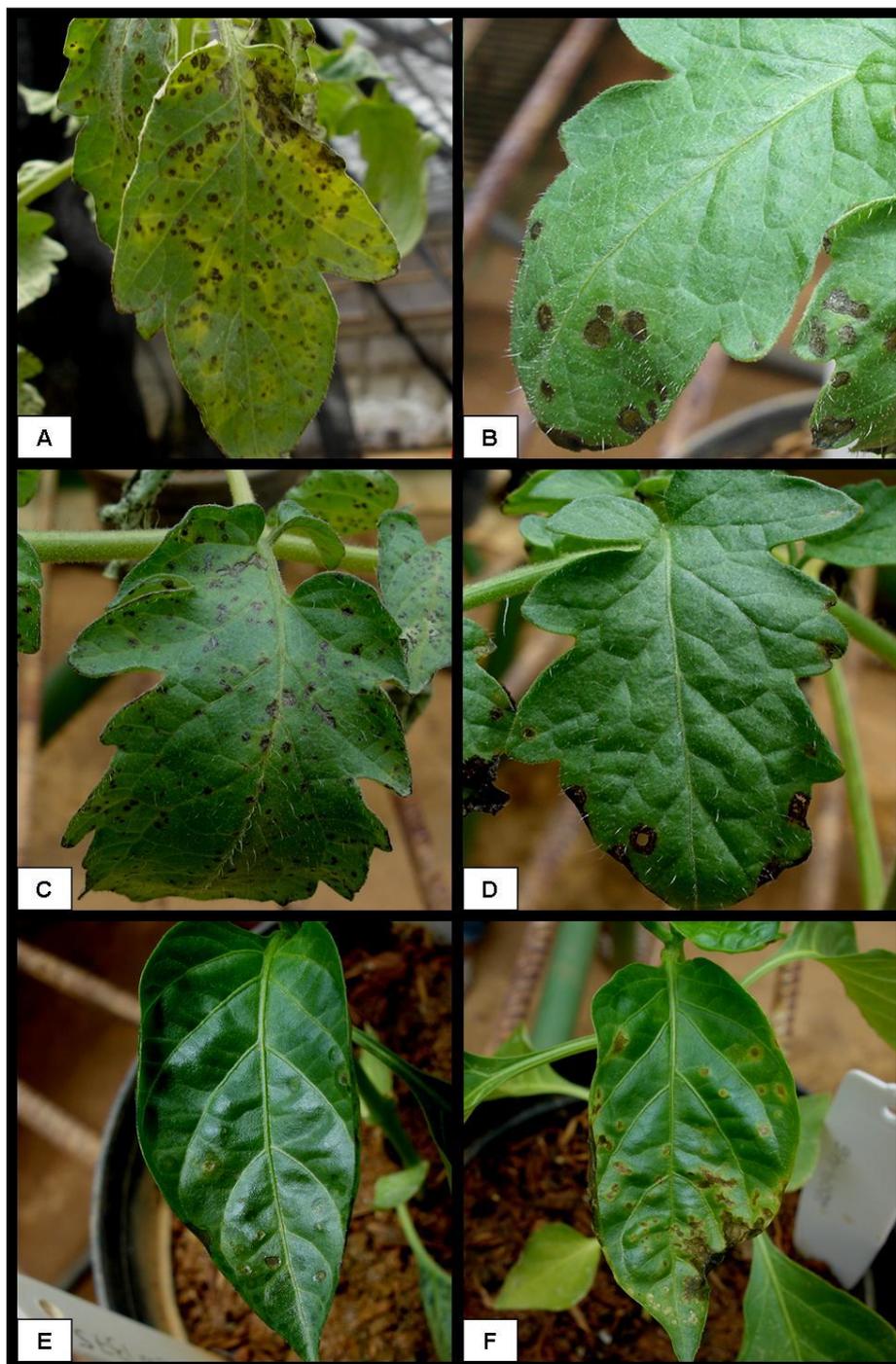
### **Testes de patogenicidade**

Do total, 32 isolados foram patogênicos ao tomate e ao pimentão, enquanto 49 isolados foram patogênicos somente a tomate (Tabela 1). Os sintomas observados em ambas as hospedeiras foram característicos de mancha bacteriana, com observação de perfurações causadas por isolados de *X. perforans* em tomateiro (Figura 1D).

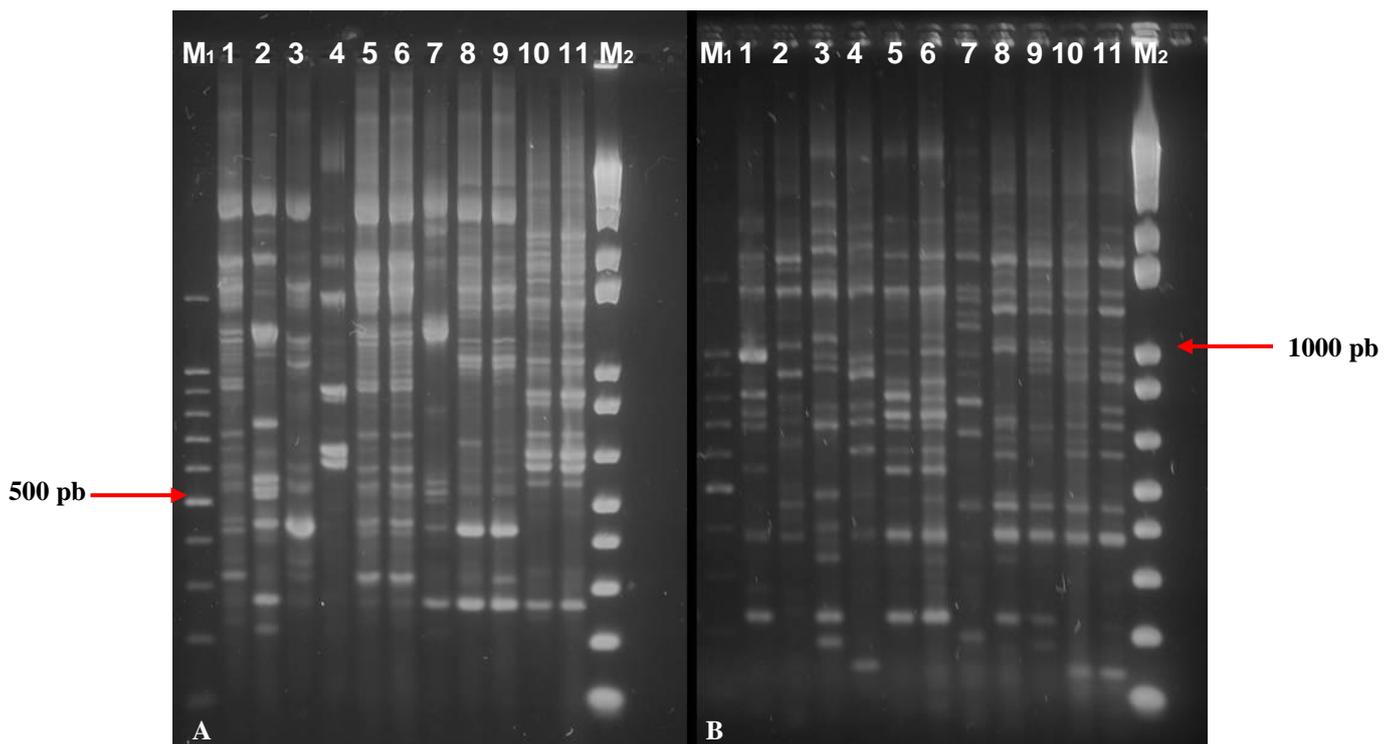
### **Caracterização molecular**

#### **rep-PCR**

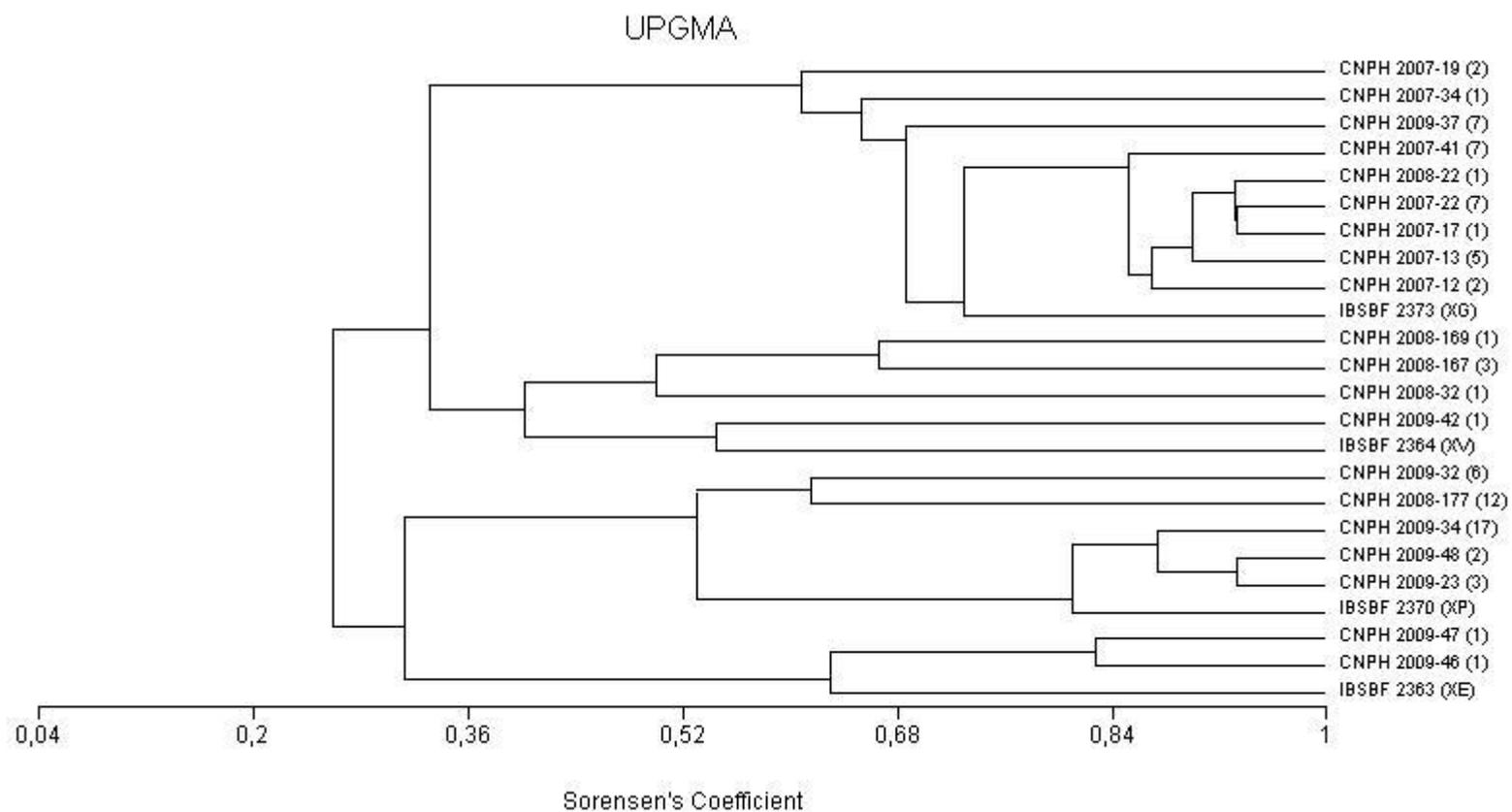
De acordo com os padrões gerados com BOX e REP-PCR (Figura 2) foi possível diferenciar as quatro espécies de *Xanthomonas* e identificar os 81 isolados comparando-os aos isolados de referência. Dos 81 isolados, dois corresponderam a *X. euvesicatoria*, seis a *X. vesicatoria*, 40 a *X. perforans* e 33 a *X. gardneri*. Foi possível distinguir 20 haplótipos por BOX-PCR (Tabela 1), dos quais dois em *X. euvesicatoria*, quatro em *X. vesicatoria*, cinco em *X. perforans* e nove em *X. gardneri*. REP-PCR gerou 13 haplótipos (Tabela 1), sendo um em *X. euvesicatoria*, quatro em *X. vesicatoria*, quatro em *X. perforans* e quatro em *X. gardneri*. A análise de similaridade e agrupamento revelou quatro grupos distintos, correspondentes a cada uma das espécies e seus respectivos isolados de referência (Figuras 3 e 4).



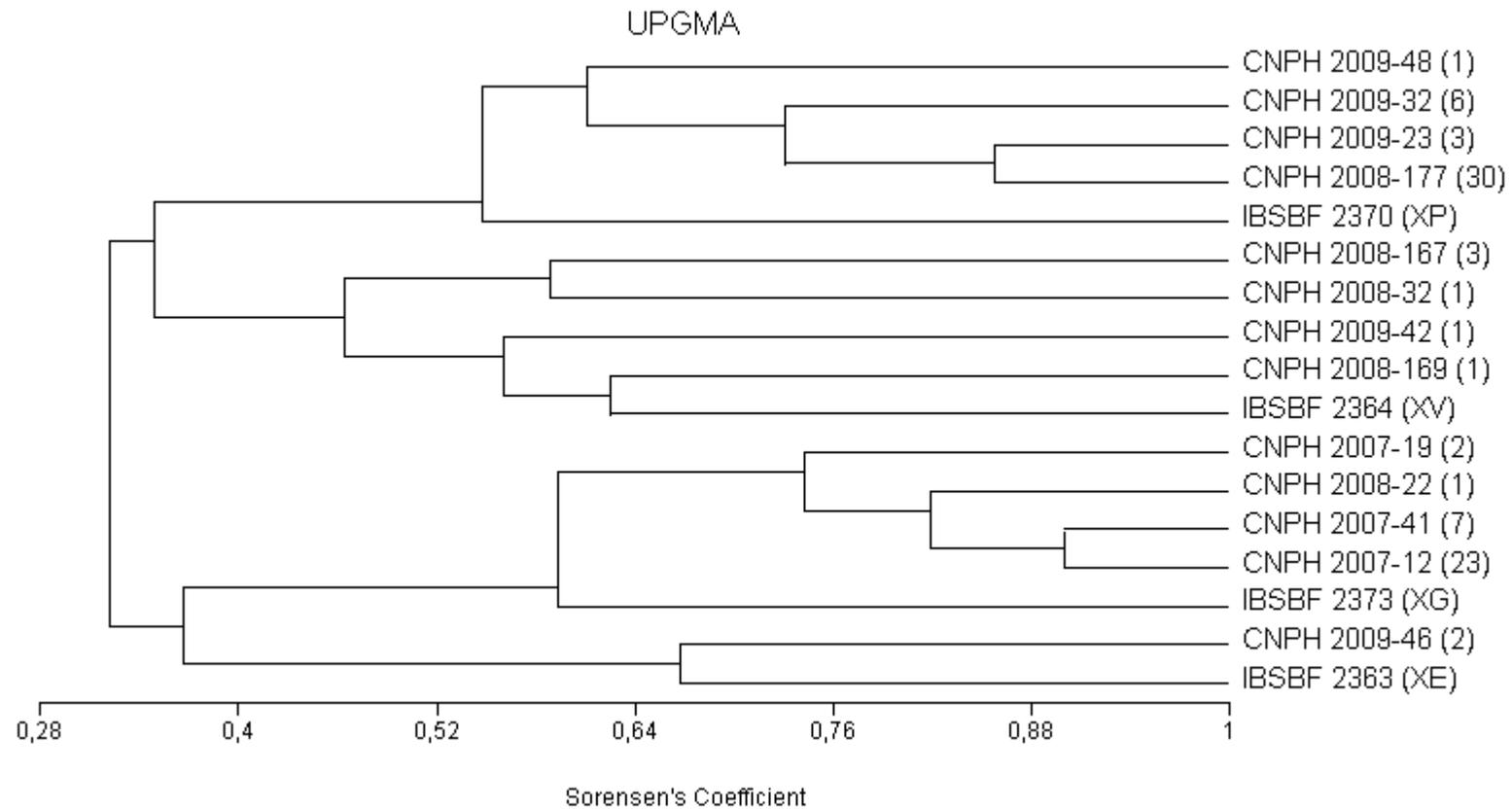
**Figura 1** Sintomas de mancha bacteriana em tomateiro observados após inoculação por pulverização de: A) isolado CNPH 2008-32 (XV); B) isolado CNPH 2008-171 (XG); C) isolado CNPH 2009-46 (XE); D) isolado CNPH 2009-56 (XP); e em pimentão E) isolado CNPH 2008-171 (XG); F) isolado CNPH 2009-46 (XE). XV = *Xanthomonas vesicatoria*; XG = *X. gardneri*; XE = *X. euvesicatoria*; XP = *X. perforans*.



**Figura 2** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR obtidos com os iniciadores (A) BOX e (B) REP: M1: marcador 100 pb DNA ladder – (Promega); M2: marcador 1 Kb plus DNA Ladder – (Invitrogen); (1) IBSBF 2363– XE; (2) IBSBF 2364– XV; (3) IBSBF 2370– XP; (4) IBSBF 2373– XG; (5) CNPH 2009-46 – XE; (6) 2009-47 – XE; (7) 2009-42 – XV; (8) 2006-10 – XP; (9) 2008-36 – XP; (10) 2006-06 – XG; (11) 2007-12– XG. XE = *Xanthomonas euvesicatoria*; XV = *X. vesicatoria*; XP = *X. perforans*; XG = *X. gardneri*.



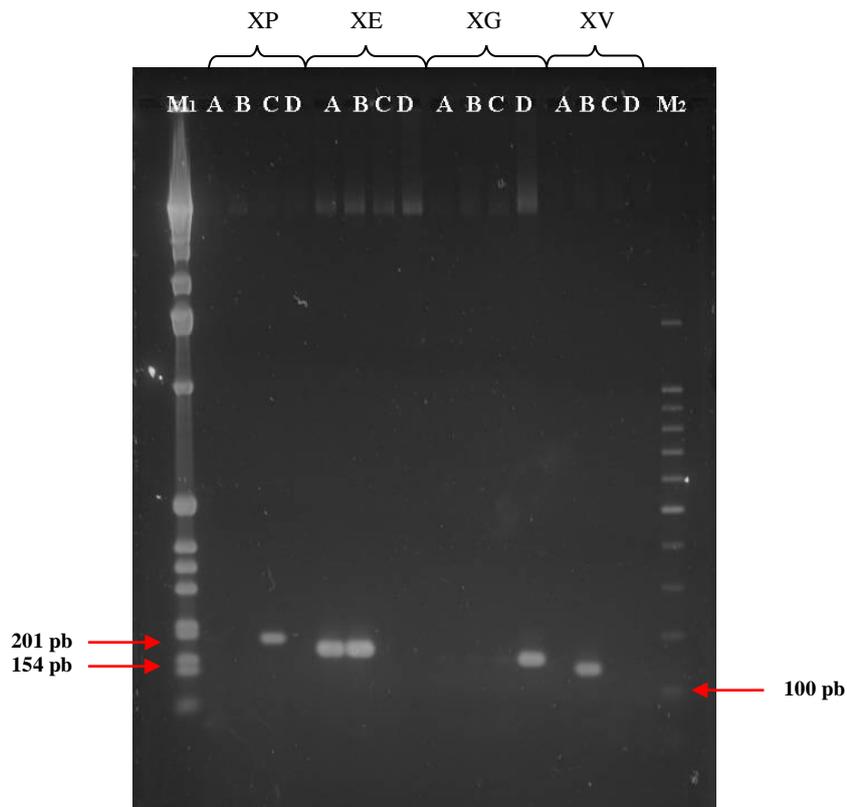
**Figura 3** Dendrograma gerado por UPGMA a partir dos perfis genômicos obtidos BOX-PCR dos isolados de *Xanthomonas* spp., causadores de mancha bacteriana do tomateiro. O número de isolados com o mesmo haplótipo é indicado entre parênteses.



**Figura 4** Dendrograma gerado por UPGMA a partir dos perfis genômicos obtidos REP-PCR dos isolados de *Xanthomonas* spp., causadores de mancha bacteriana do tomateiro. O número de isolados com o mesmo haplótipo é indicado entre parênteses.

### PCR com iniciadores específicos

Os iniciadores BS-XeF e BS-XeR amplificaram o DNA de *Xanthomonas euvesicatoria* e o DNA de *X. vesicatoria* em todas as cinco temperaturas testadas. BS-XvF e BS-XvR amplificaram somente o DNA de *X. vesicatoria*, conforme o esperado. BS-XgF e BS-XgR amplificaram apenas o DNA de *X. gardneri*, nas temperaturas de 65,7°C e 68,0°C. Os iniciadores para *X. perforans* foram específicos nas temperaturas 61,3; 65,7; e 68,0°C, pois não amplificaram o DNA de nenhuma das outras espécies. A temperatura de 65,7°C foi escolhida para o programa de amplificação. No entanto, testes adicionais ainda são necessários para se chegar a uma temperatura ideal para os iniciadores BS-XeF e BS-XeR, de *X. euvesicatoria*, uma vez que estes não foram específicos. Desta forma, o programa usado foi: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65,7°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. A extensão final foi 72°C por 7 minutos. Após a otimização das condições de amplificação para os quatro pares de iniciadores com os isolados de referência, foi confirmada a especificidade de todos os pares de iniciadores, com exceção de BS-XeF e BS-XeR, que também amplificaram o DNA de *X. vesicatoria* (Figura 5). Representantes de todos os 20 haplótipos tiveram suas identidades confirmadas pelos iniciadores, corroborando os resultados obtidos por BOX-PCR (Tabela 2).



**Figura 5** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da amplificação do DNA de espécies de *Xanthomonas* com iniciadores desenvolvidos para as quatro espécies. M1:1kb DNA ladder – (Gibco - BRL); M2: Marcador 100 pb DNA ladder - (Promega); XP: 197 pb; XE: 173 pb; XG: 154pb; XV: 138 pb. Isolados utilizados: (A) IBSBF 2363 – XE; (B) IBSBF 2364 – XV; (C) IBSBF 2370 – XP; (D) IBSBF 2373 – XG. XE = *Xanthomonas euvesicatoria*; XV = *X. vesicatoria*; XP = *X. perforans*; XG = *X. gardneri*.

**Tabela 2** Identificação de *Xanthomonas* spp. do tomateiro, através de PCR com iniciadores específicos

<b>Espécie / Isolado</b>	<b>Bs-XgF / XgR</b>	<b>Bs-XpF / XpR</b>	<b>Bs-XvF / XvR</b>	<b>Bs-XeF / XeR</b>
<i>X.gardneri</i> / 2007-12	+	-	-	-
<i>X.gardneri</i> / 2007-13	+	-	-	-
<i>X.gardneri</i> / 2007-17	+	-	-	-
<i>X.gardneri</i> / 2007-19	+	-	-	-
<i>X.gardneri</i> / 2007-22	+	-	-	-
<i>X.gardneri</i> / 2007-34	+	-	-	-
<i>X.gardneri</i> / 2007-41	+	-	-	-
<i>X.gardneri</i> / 2008-22	+	-	-	-
<i>X.gardneri</i> / 2009-37	+	-	-	-
<i>X. perforans</i> / 2008-177	-	+	-	-
<i>X. perforans</i> / 2009-23	-	+	-	-
<i>X. perforans</i> / 2009-32	-	+	-	-
<i>X. perforans</i> / 2009-34	-	+	-	-
<i>X. perforans</i> / 2008-48	-	+	-	-
<i>X. vesicatoria</i> / 2008-32	-	-	+	+
<i>X. vesicatoria</i> / 2008-167	-	-	+	+
<i>X. vesicatoria</i> / 2008-169	-	-	+	+
<i>X. vesicatoria</i> / 2009-42	-	-	+	+
<i>X. euvesicatoria</i> / 2009-46	-	-	-	+
<i>X. euvesicatoria</i> / 2009-47	-	-	-	+

### **Identificação da raça T1 de *Xanthomonas euvesicatoria***

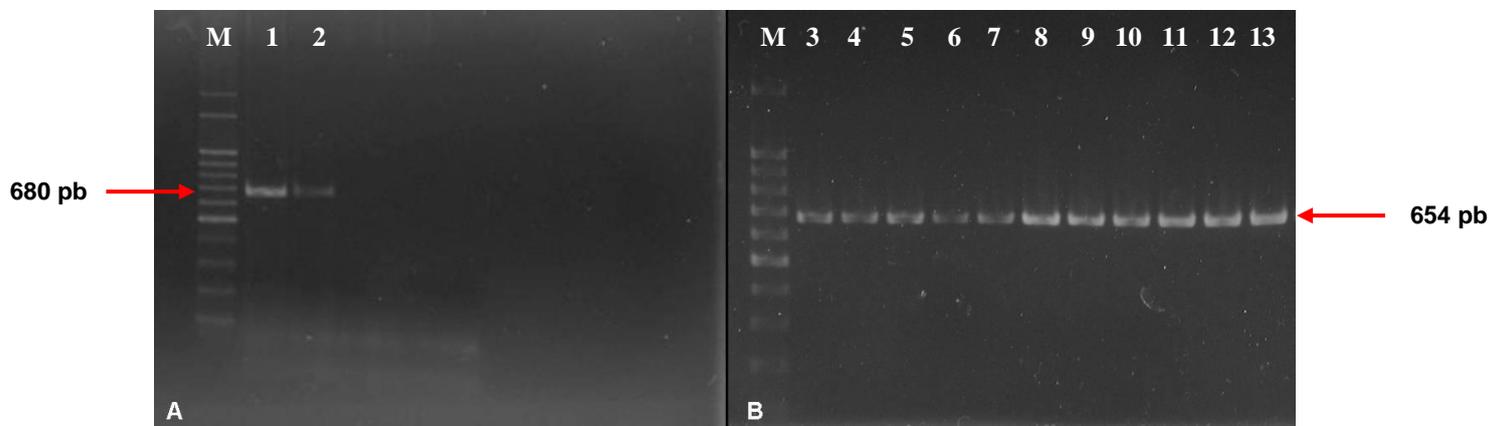
A amplificação de um fragmento de 680 pb contendo o gene *avrRxv* foi observada com o DNA dos dois isolados (CNPH 2009-46 e CNPH 2009-47) que apresentaram perfis semelhantes de BOX e REP-PCR (Figura 2) ao do isolado de referência IBSBF 2363 (*X. euvesicatoria*). Não foi detectada amplificação com os demais isolados (Figura 6A).

### **Identificação das raças de *Xanthomonas perforans***

Um fragmento de 654 pb contendo o gene *avrXv3* foi amplificado em 27 dos 40 isolados que tiveram perfis semelhantes de BOX e REP-PCR ao do isolado IBSBF 2370 (*X. perforans*) (Figura 6B). Reação de hipersensibilidade no genótipo CNPH1500 foi observada em todos os 40 isolados num período de 24 a 36 horas após a infiltração. Quanto ao teste de inoculação por pulverização, todos isolados causaram sintomas em Bonny Best e não foram patogênicos ao CNPH 1500.

### **Hidrólise de amido**

Nenhum dos isolados de *X. gardneri* foi capaz de degradar o amido, já todos os isolados de *X. vesicatoria* degradaram o mesmo, confirmando sua atividade amilolítica.



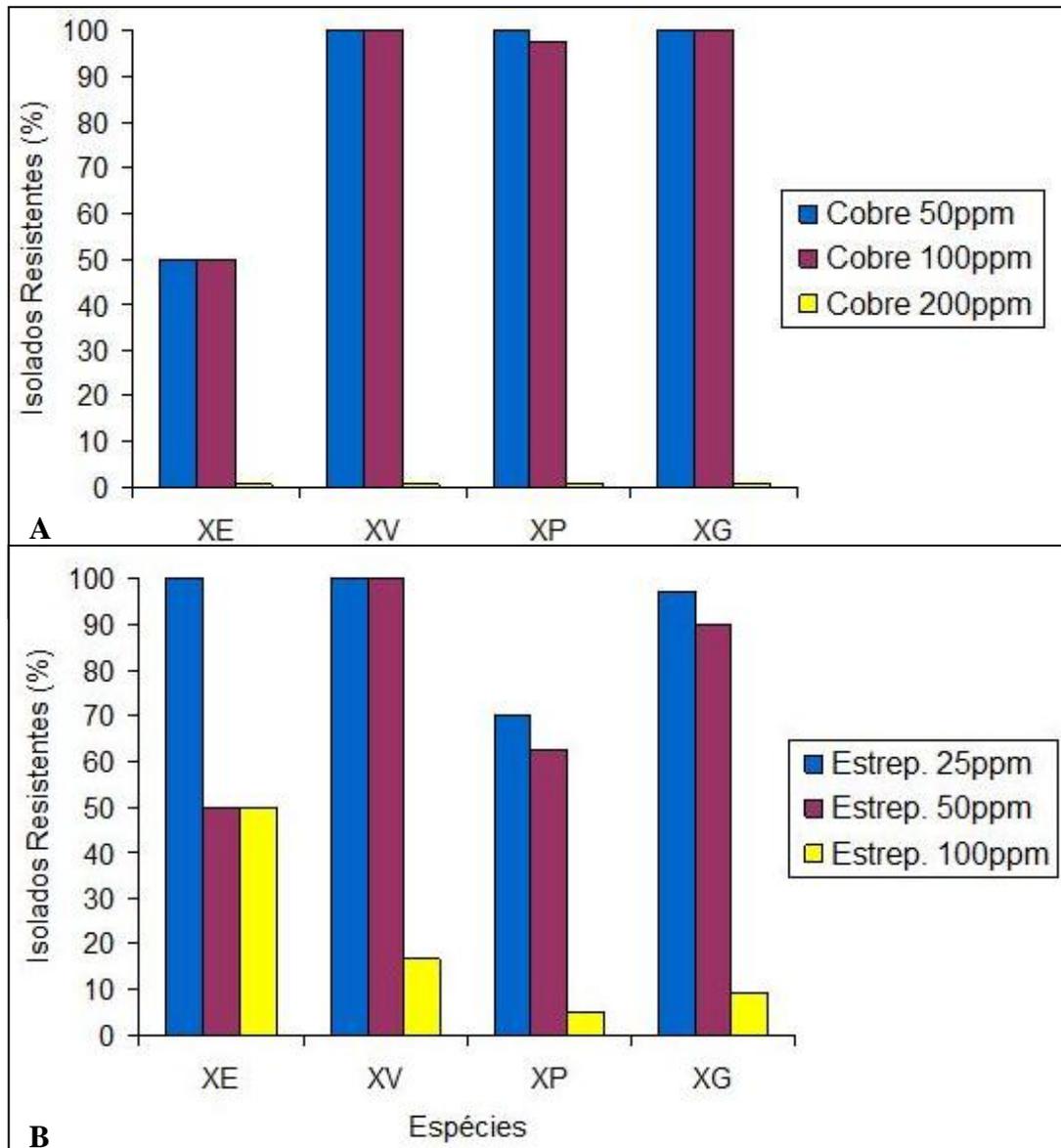
**Figura 6** Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR obtido com os iniciadores RST27 e RST 28 contendo o gene *avrRxv* (A) e RST88 e RST89 contendo o gene *avrXv3*(B). M: Marcador 100 pb DNA Ladder - (promega); Isolados: (1) CNPH 2009-46; (2) CNPH 2009-47; (3) CNPH 2008-173; (4) CNPH 2008-175; (5) CNPH 2008-177; (6) CNPH 2009-12; (7) CNPH 2009-13; (8) CNPH 2009-20; (9) CNPH 2009-21; (10) CNPH 2009-23; (11) CNPH 2009-24; (12) CNPH 2009-26; (13) CNPH 2009-31.

### **Sensibilidade ao cobre e estreptomicina**

Nenhum isolado foi resistente ao sulfato de cobre na concentração de 200 µg/mL. No entanto, 97,53% dos isolados foram resistentes a 100 µg/mL e 98,77% foram resistentes na concentração de 50 µg/mL.

Quanto à estreptomicina, 8,64% dos isolados se mostraram resistentes a maior concentração utilizada (100 µg/mL), enquanto a 50 e 25 µg/mL, as porcentagens de isolados resistentes foram 76,54% e 83,95%, respectivamente. Dos sete isolados que apresentaram resistência ao antibiótico na maior concentração, três foram *X. gardneri*, dois *X. perforans*, um *X. euvesicatoria* e um *X. vesicatoria* (Tabela 3).

Em relação às espécies, 100% dos isolados *X. gardneri* foram resistentes às duas menores concentrações de cobre testadas, enquanto que todos os isolados de *X. vesicatoria* foram resistentes as duas menores concentrações de cobre e estreptomicina utilizadas (Figura 7).



**Figura 7** Porcentagem dos isolados de *Xanthomonas* spp. resistentes às diferentes concentrações de cobre (A) e estreptomicina (B) determinada por testes *in vitro*. XE = *Xanthomonas euvesicatoria*; XV = *X. vesicatoria*; XP = *X. perforans*; XG = *X. gardneri*

**Tabela 3** Sensibilidade ao cobre e ao antibiótico estreptomicina de isolados de *Xanthomonas* spp., causadores de mancha bacteriana em tomateiro

<sup>a</sup> Espécie / Isolado	Cobre (µg/mL)			Estreptomicina (µg/mL)		
	50	100	200	25	50	100
XE/CNPH 2009-46	<sup>b</sup> +	+	-	<sup>c</sup> +	-	-
XE/CNPH 2009-47	-	-	-	+	+	+
XV/CNPH 2008-32	+	+	-	+	+	-
XV/CNPH 2008-167	+	+	-	+	+	+
XV/CNPH 2008-168	+	+	-	+	+	-
XV/CNPH 2008-170	+	+	-	+	+	-
XV/CNPH 2008-169	+	+	-	+	+	-
XV/CNPH 2009-42	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2005-11	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-20	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-22	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-31	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-32	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-35	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-37	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2006-06	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-12	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2006-08	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-13	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2008-171	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2008-179	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2009-22	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-17	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-18	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-19	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-34	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-40	+	+	-	+	-	-
XG/CNPH 2007-41	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-42	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-43	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-44	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2007-45	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2008-35	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2008-22	+	+	-	+	+	+
XG/CNPH 2009-30	+	+	-	+	+	+
XG/CNPH 2009-33	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2009-37	+	+	-	+	+	+
XG/CNPH 2009-40	+	+	-	+	+	-
XG/CNPH 2009-45	+	+	-	+	-	-
XG/CNPH 2009-49	+	+	-	-	-	-
XG/CNPH 2009-183	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2006-10	+	+	-	-	-	-
XP/CNPH 2008-172	+	+	-	+	+	-

XP/CNPH 2008-173	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2008-174	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2008-175	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2008-176	+	+	-	-	-	-
XP/CNPH 2008-177	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-12	+	+	-	+	-	-
XP/CNPH 2009-13	+	+	-	+	-	-
XP/CNPH 2009-14	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-15	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-20	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2008-36	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-21	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-23	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-05	+	-	-	-	-	-
XP/CNPH 2009-31	+	+	-	-	-	-
XP/CNPH 2009-32	+	+	-	+	-	-
XP/CNPH 2009-38	+	+	-	-	-	-
XP/CNPH 2009-39	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-44	+	+	-	+	+	+
XP/CNPH 2009-24	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-48	+	+	-	-	-	-
XP/CNPH 2009-26	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-34	+	+	-	-	-	-
XP/CNPH 2009-55	+	+	-	-	-	-
XP/CNPH 2009-56	+	+	-	-	-	-
XP/CNPH 2009-57	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-58	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-59	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-61	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-78	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-79	+	+	-	-	-	-
XP/CNPH 2009-80	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-95	+	+	-	+	+	+
XP/CNPH 2009-97	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-177	+	+	-	-	-	-
XP/CNPH 2009-179	+	+	-	-	-	-
XP/CNPH 2009-181	+	+	-	+	+	-
XP/CNPH 2009-182	+	+	-	+	+	-

<sup>a</sup>XE = *Xanthomonas euvesicatoria*; XV = *X. vesicatoria*; XP = *X. perforans*; XG = *X. gardneri*.

<sup>b</sup> (+) - Crescimento confluyente (positivo) no meio MMCC suplementado com sulfato de cobre, avaliado após 72 horas de incubação a 28°C.

<sup>c</sup> (+) - Crescimento confluyente (positivo) no meio AN suplementado com sulfato de estreptomicina, avaliado após 72 horas de incubação a 28°C.

## DISCUSSÃO

A partir do levantamento realizado em diversas regiões produtoras de tomate de mesa no Brasil, observou-se a ocorrência das quatro espécies (*Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*) envolvidas no complexo da mancha bacteriana do tomateiro. *Xanthomonas perforans* ocorreu nas Regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país. Na Região Sul, somente *X. gardneri* foi detectada e a Região Sudeste foi a única onde ocorreu a presença das quatro espécies (Figura 8). Um fator para a introdução de espécies em determinados locais e em outros não, pode ser atribuído ao emprego de sementes contaminadas. A presença de apenas *X. gardneri* na Região Sul pode estar relacionada com a temperatura, a qual pode ter favorecido esta espécie, fazendo com que houvesse predominância sobre as outras. Apenas dois isolados (oriundos de Uberaba-MG) foram identificados como *X. euvesicatoria*, havendo mais representantes de *X. perforans* (40 isolados), o que talvez esteja relacionado com uma maior competitividade (“fitness”) de *X. perforans* sobre *X. euvesicatoria*, como observado por Jones *et al.* (1998). As duas espécies que predominaram neste estudo foram *X. perforans* (49,4%) e *X. gardneri* (40,7%).

Os perfis genômicos obtidos com rep-PCR foram reproduzíveis e eficientes para a diferenciação inter e intraespecífica. O número de haplótipos identificados foi diferente para BOX e REP-PCR, havendo mais bandas polimórficas verificadas em BOX-PCR. Outros estudos também revelaram diferenças quanto a resolução dos iniciadores, como o observado por Louws *et al.* (1995), onde o elemento REP foi o menos útil para discriminação entre isolados dentro do grupo A de *Xanthomonas* spp. da mancha bacteriana. Estudo realizado por Trindade *et al.* (2005) mostrou que ERIC-PCR revelou mais bandas polimórficas do que BOX e REP em isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, que causa o cancro bacteriano da videira. De acordo com

Rademaker *et al.* (2000), a resolução taxonômica ao se utilizar BOX, REP ou ERIC-PCR não é sempre idêntica, sendo que isto pode ocorrer devido a diferenças no número de bandas geradas com cada iniciador, à condição de anelamento e também porque a prevalência ou a distribuição dos elementos repetitivos pode variar em cada espécie ou isolado. Nesse estudo, apenas os iniciadores BOX e REP-PCR foram utilizados, uma vez que ERIC-PCR não gerou perfis reproduzíveis para todos os isolados.

Os dendrogramas gerados por BOX e REP-PCR mostraram a separação de quatro espécies distintas, contendo suas respectivas espécies de referência. Para BOX-PCR, o isolado IBSBF 2363 (*X. euvesicatoria*) apresentou 63% de similaridade com os isolados de *X. euvesicatoria*; IBSBF 2370 (*X. perforans*) apresentou similaridade de 53 a 81% com os isolados de *X. perforans*; IBSBF 2364 (*X. vesicatoria*) apresentou similaridade de 40 a 54% com os isolados de *X. vesicatoria*; e IBSBF 2373 (*X. gardneri*) apresentou similaridade de 61 a 73% com os isolados de *X. gardneri*. O maior número de haplótipos observados em *X. gardneri* pode ser atribuído aos diferentes anos de coleta (2005 a 2009) e origens diversas dos isolados, mostrando que a espécie está se estabelecendo no país e aumentando sua diversidade. Quando analisou-se REP-PCR, a similaridade de IBSBF 2363 com isolados de *X. euvesicatoria* foi de 68%; IBSBF 2370 teve 54% com isolados de *X. perforans*; IBSBF 2364 teve 46% de similaridade com isolados de *X. vesicatoria*; e IBSBF 2373 teve 59% de similaridade com isolados de *X. gardneri*. Quando foi feita a análise de similaridade com os dados combinados de BOX e REP-PCR (dados não mostrados), a similaridade entre os isolados de referência (entre espécies) foi inferior a 40%.

O uso de iniciadores específicos permitiu a confirmação da identificação das espécies *X. perforans*, *X. gardneri* e *X. vesicatoria*. No entanto, os iniciadores utilizados para *X. euvesicatoria* não mostraram a especificidade esperada já que amplificaram

também DNA dos isolados de *X. vesicatoria*. Assim, tornam-se necessários estudos posteriores para se otimizar as condições da PCR com os iniciadores BS-XeF e BS-XeR, testando-se outros parâmetros, além de temperatura de anelamento, ou ainda, o desenvolvimento de novos iniciadores. Neste sentido, foram desenvolvidos iniciadores específicos para *X. euvesicatoria* (Moretti *et al.*, 2009) que não foram testados no presente estudo.

Quanto à patogenicidade, isolados de *X. euvesicatoria* causaram sintomas em tomate e pimentão, isolados de *X. vesicatoria* e *X. perforans* causaram sintomas apenas em tomate (com a presença de perfurações típicas causadas por *X. perforans*) e isolados de *X. gardneri* foram patogênicos ao tomate e variáveis quanto a patogenicidade em pimentão. Isolados de *X. gardneri* com patogenicidade variável a pimentão também foram encontrados por Quezado-Duval (2003a) em tomate para processamento industrial.

Embora os perfis de rep-PCR de *X. vesicatoria* e *X. gardneri* sejam distintos, o teste do amido foi utilizado como um teste confirmatório adicional para separação dessas duas espécies que correspondem à raça T2. A hidrólise do amido foi observada em isolados identificados como *X. vesicatoria*. A mesma não foi observada com os isolados de *X. gardneri*. Resultados semelhantes foram descrito por Jones *et al.* (2004).

Assim como foi relatado em tomate para processamento industrial no Brasil (Quezado-Duval & Camargo, 2004), a presença das raças T1 (*X. euvesicatoria*), T2 (*X. vesicatoria* e *X. gardneri*) e T3 (*X. perforans*) foram relatadas neste trabalho, não havendo ocorrência das raças T4 e T5 (ambas *X. perforans*).

A amplificação do fragmento de 680 pb contendo o gene *avrRxv* foi observada com os dois isolados identificados como *X. euvesicatoria*. DNA de isolados representantes das raças T2 e T3 foram utilizados com os mesmos iniciadores

(RST27/RST28), porém nenhum produto foi amplificado. Já o fragmento de 654 pb contendo o gene *avrXv3* foi amplificado em apenas 27 dos 40 isolados identificados como raça T3. A identificação dessa raça só foi possível através da verificação da reação de hipersensibilidade no genótipo CNPH 1500, o que só é observado quando inocula-se isolados pertencentes à raça T3. A ausência de amplificação do fragmento de 654 pb pode ser explicada pela ocorrência de mutação no sítio de anelamento dos iniciadores, não havendo amplificação eficiente do fragmento, no entanto, o gene pode ter permanecido funcional e por isso houve reação de hipersensibilidade em CNPH 1500. Outra hipótese seria um problema na composição da reação, reagentes ou inibidores na amostra, entretanto, os testes foram repetidos três vezes sem sucesso e, além disso, foram utilizados controles positivos (isolado CNPH 2005-29) e negativos (reação sem DNA) e os DNAs foram os mesmos utilizados para realização de rep-PCR. Isolados pertencentes à raça T2 também foram testados e causaram sintomas de mancha bacteriana em CNPH 1500 e não amplificaram o fragmento de 654 pb, como era esperado.

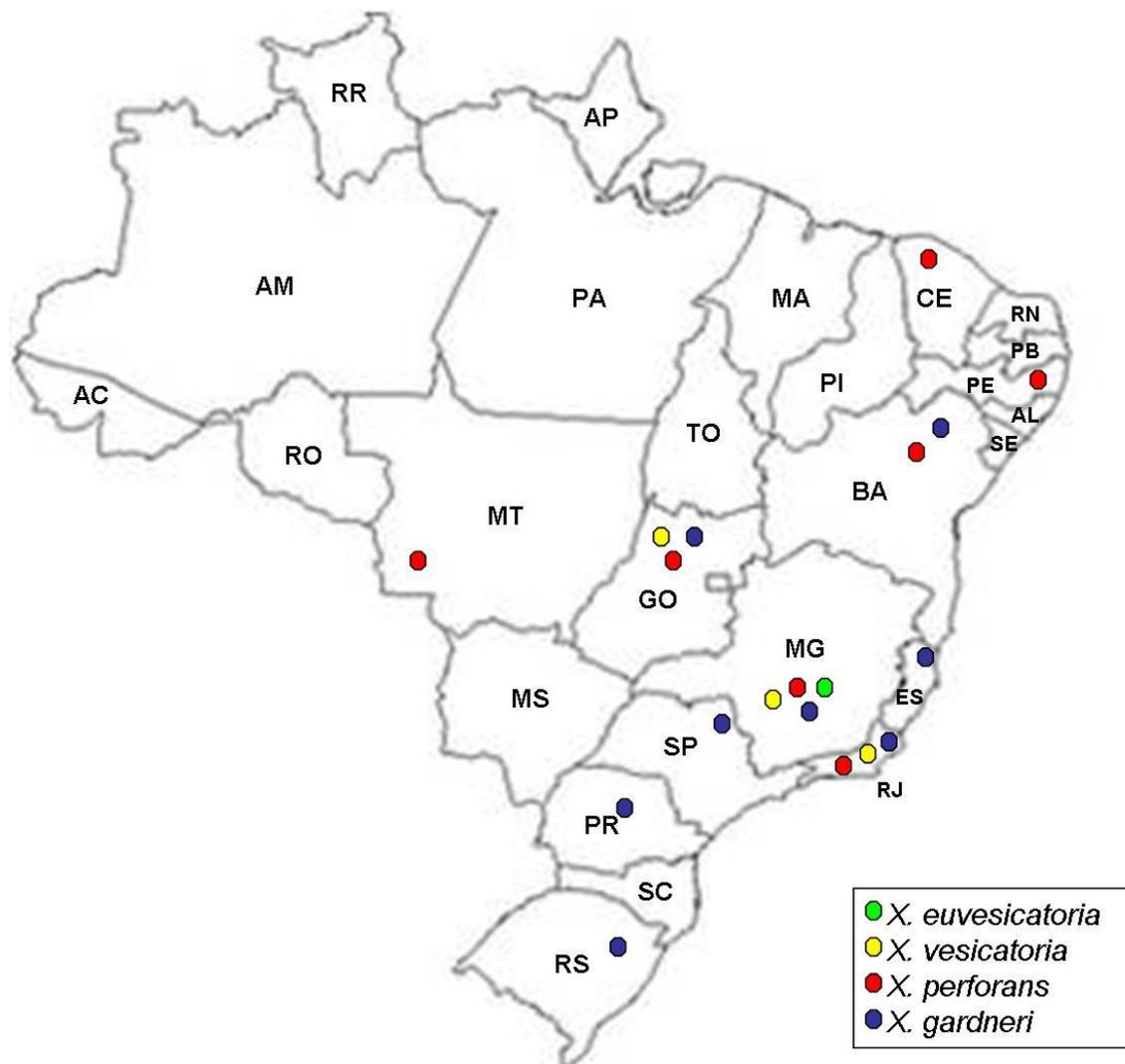
Os isolados analisados nesse estudo apresentaram resistência tanto ao cobre quanto ao antibiótico estreptomicina, não havendo uma relação entre espécie e resistência. Somente na maior concentração de cobre não houve resistência, porém o número de isolados resistentes foi alto nas outras duas concentrações (50 e 100 µg/mL). Relatos de resistência ao cobre já tinham sido feitos anteriormente por Marco & Stall (1983), Aguiar *et al.* (2000) e Nascimento (2009). Isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* na Sérvia também foram resistentes ao cobre na concentração de 100 µg/ml e de 200 µg/ml (Obradovic *et al.*, 2004). Outro relato, feito por Quezado-Duval *et al.* (2003b) constataram ausência de resistência ao cobre na concentração de 200

$\mu\text{g/mL}$  em isolados de *Xanthomonas* spp. causadores da mancha bacteriana em tomate industrial no Brasil.

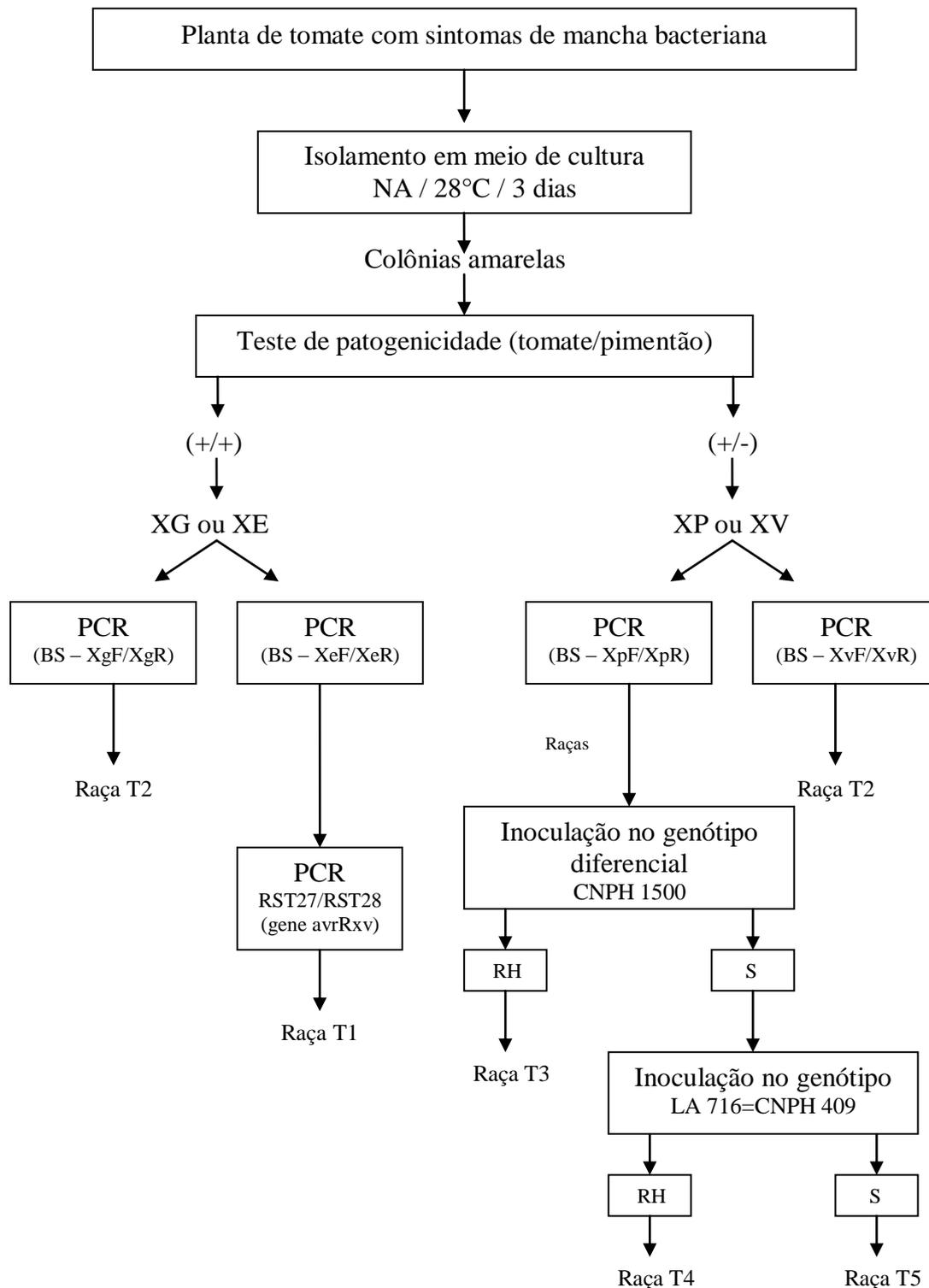
Com relação ao antibiótico estreptomicina, o número de isolados resistentes foi baixo na maior concentração (100  $\mu\text{g/mL}$ ) e alto para as outras duas concentrações (25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ). A presença de isolados resistentes a 100  $\mu\text{g/mL}$  de sulfato de estreptomicina já tinha sido relatada por Ritchie & Dittapongpitch (1991), que também relataram a presença de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* resistentes a uma concentração maior do produto (200  $\mu\text{g/mL}$ ). Quezado-Duval *et al.* (2003b) demonstraram igualmente a resistência à concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  do antibiótico em isolados de *Xanthomonas* spp. da mancha bacteriana oriundos de lavouras para indústria no Brasil.

Para a realização de testes de sensibilidade *in vitro* ao cobre e estreptomicina, normalmente utilizam-se concentrações 10 vezes menores do que as recomendadas para o controle da doença no campo, uma vez que, *in vitro*, a bactéria é exposta diretamente à ação dos produtos. Com isso, há uma correspondência das concentrações usadas no laboratório e as utilizadas em campo. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho e o observado na literatura, espera-se uma baixa eficiência de produtos químicos para o controle da mancha bacteriana, com exceção da maior concentração de sulfato de cobre (200  $\mu\text{g/mL}$ ), o que indica a necessidade de outras alternativas para o controle da doença.

De acordo com os testes realizados e resultados obtidos, um fluxograma para identificação das espécies e raças de *Xanthomonas* é proposto (Figura 9). O fluxograma mostra um conjunto de testes fenotípicos e moleculares que podem ser empregados em laboratórios de diagnose e em diversos estudos envolvendo a epidemiologia da mancha bacteriana, detecção das bactérias em sementes e novos registros de ocorrência.



**Figura 8** Distribuição das espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana nos 11 estados brasileiros onde foram realizadas coletas.



**Figura 9** Fluxograma para identificação de *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri* e suas respectivas raças. RH: Reação de hipersensibilidade; S: Suscetibilidade.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foi verificado a ocorrência das quatro espécies de *Xanthomonas* causando mancha bacteriana no tomateiro para mesa, distribuídas em 11 estados brasileiros. A Região Sudeste foi a única onde ocorreu a presença das quatro espécies e na Região Sul, somente *X. gardneri* foi detectada. *X. gardneri* e *X. perforans* foram as espécies predominantes (90,1% dos isolados), e maior variabilidade foi detectada em *X. gardneri*. Apenas as raças T1, T2 e T3 estão presentes entre os 81 isolados coletados, não tendo sido detectada a ocorrência das raças T4 e T5. Os iniciadores específicos utilizados, mostraram-se eficientes para a identificação das espécies, com exceção de *X. euvesicatoria*.

Há necessidade de caracterização de um número maior de isolados, abrangendo todas as regiões produtoras de tomate de mesa no Brasil, para que haja conhecimento mais detalhado da distribuição das espécies no país, assim como uma maior amostragem em estados onde poucos isolados foram caracterizados. A ocorrência de quatro espécies indica a ocorrência de quatro doenças distintas, embora com sintomas semelhantes. Isto deve refletir em práticas de manejo diferenciadas para cada um dos patossistemas, assim como uma nova designação para as raças. É interessante também investigar a possível maior adaptação das espécies segundo as zonas climáticas, uma vez que apenas *X. gardneri* foi encontrada na Região Sul do Brasil.

Quanto aos métodos de diagnose molecular, deve-se testar os iniciadores desenvolvidos para *X. euvesicatoria* por Moretti *et al.* (2009), assim como testar a especificidade e sensibilidade dos demais iniciadores frente a uma coleção maior de isolados. A possibilidade de desenvolvimento e uso de PCR-multiplex para a detecção e identificação simultânea das espécies envolvidas no complexo da mancha bacteriana também é uma perspectiva a ser explorada.

## REFERÊNCIAS

- Aguiar LA, Kimura O, Castilho AM, Castilho KSC, Ribeiro RLD, Akiba F, Carmo MGF, 2000. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. *Agronomia* **34**, 78-82.
- Astua-Monge G, Minsavage G V, Stall RE, Davis MJ, Bonas U, Jones JB, 2000. Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe interactions* **13**, 911-921.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, 1992. *Short protocols in molecular biology*. London: John Wiley & Sons Inc.
- Bouzar H, Jones JB, Minsavage G V, Stall RE, Scott JW, 1994. Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. *Phytopathology* **84**, 39-44.
- Bouzar H, Jones JB, Stall RE, Louws FJ, Schneider M, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, Jackson LE, 1999. Multiphasic analysis of Xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. *Phytopathology* **89**, 328-335.
- Carmo MGF, Macagnan D, Carvalho AO, 2001. Progresso da mancha-bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inóculo e do emprego ou não do controle com oxicleto de cobre. *Horticultura Brasileira* **19**, 342-347.
- Gent DH, Schuartz HF, Ishimaru CA, Louws FJ, 2004. Polyphasic characterization of *Xanthomonas* strains from onion. *Phytopathology* **94**, 184-195.
- Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA, 1997. *Compendium of tomato diseases*. St Paul: American Phytopathological Society Press.
- Jones JB, Bouzar H, Somodi GC, Stall RE, Pernezny K, El-Morsy G, Scott JW, 1998. Evidence for the preemptive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. *Phytopathology* **88**, 33-38.
- Jones JB, Bouzar H, Stall RE, Almira EC, Roberts PD, Bowen BW, Sudberry J, Strickler PM, Chun J, 2000. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1211-1219.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW, 2004. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* **27**, 755-762.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Minsavage GV, Stall RE, Schaad NW, 2005. Bacterial spot – Worldwide distribution, importance and review. *Acta Horticulturae* **695**, 27-33.

- Koenraad H, van Betteray B, Germain R, Hiddink G, Jones JB, Oosterhof J, Rijlaarsdam A, Roorda P, Wouldt B, 2009. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *Acta Horticulturae* **808**, 99-102.
- Kovach WL, 1999. MVSP- Multivariate Statistical Package for Windows, Version 3.1. Pentraeth, Wales, UK. Kovach Computing Services.
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ, 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* **85**, 528-536.
- Louws FJ, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, 1999. The three D's of PCR-based genomic analysis of Phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* **37**, 81-125.
- Mahuku GS, Jara C, Henriquez MA, Castellanos G, Cuasquer J, 2006. Genotypic characterization of the common bean bacterial blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by rep-PCR and RFLP of the ribosomal genes. *Phytopathology* **154**, 35-44.
- Marco GM, Stall RE, 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease* **67**, 779-781.
- Marques LLR, 2000. Avaliação de marcadores moleculares para o estudo da diversidade de bactérias *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, Tese de Doutorado.
- Moretti C, Amatulli MT, Buonauro R, 2009. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. *Letters in Microbiology* **49**, 466-471.
- Nascimento AR, 2009. Ação de produtos químicos *in vitro*, em mudas e campos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*) em tomate para processamento industrial. Goiás: Universidade Federal de Goiás. Escola de Agronomia e Engenharia de alimentos, Tese de Doutorado.
- Obradovic A, Mavridis A, Rudolph K, Janse JD, Arsenijevic M, Jones JB, Minsavage GV, Wang JF, 2004. Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 285-292.
- Pohronezny K, Sommerfeld M, Raid RN, 1992. Streptomycin resistance and copper tolerance among strains of *Pseudomonas cichorii* in commercial celery seedbeds. *Phytopathology* **82**, 1118.

Quezado-Duval AM, 2003a. Diversidade de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil. Piracicaba, São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Tese de Doutorado.

Quezado-Duval AM, Gazzoto Filho A, Leite Junior RP, Camargo LEA, 2003b. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira* **21**, 672-677.

Quezado-Duval AM, Camargo LEA, 2004. Raças de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil. *Horticultura Brasileira* **22**, 80-86.

Quezado-Soares AM, Lopes CA, 1999. Controle químico da mancha bacteriana em tomateiro para processamento industrial. *Summa Phytopathologica* **25**, 21.

Rabalho AA, 2007. *Xanthomonas* spp. causadora da mancha bacteriana do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.): detecção em sementes e diferenciação. Piracicaba, São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Tese de Doutorado.

Rademaker JLW, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Valterin P, de Bruijin FJ, 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 665-677.

Ritchie DF, Dittapongpich V, 1991. Copper and streptomycin-resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Disease* **75**, 733-736.

Schaad NW, Jones JB, Chun W, 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St Paul: American Phytopathological Society Press.

Stall RE, Thayer PL, 1962. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Disease Reporter* **46**, 389-392.

Trindade LC, Lima MF, Ferreira MASV, 2005. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. *Fitopatologia Brasileira* **30**, 46-54.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR, 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **19**, 6823-6831.

## ANEXOS

### I. Testes Bioquímicos

#### 1- Teste KOH (3%)

Adicionou-se algumas gotas de KOH sobre uma lâmina na qual depositou-se uma alça de massa bacteriana. O aumento da viscosidade da preparação foi um indicativo de que as bactérias eram gram negativas.

#### 2- Teste de crescimento aeróbico

- 10 g de peptona
- 5 g de extrato de levedura
- 1 g de glicose
- 15 g de ágar
- 1000 mL de água destilada

As bactérias foram inoculadas na parte inferior dos tubos contendo o meio e incubadas por 3 dias. O crescimento aeróbico foi observado quando houve crescimento bacteriano na parte superior do meio.

#### 3- Fluorescência em meio King's B

- 20 g de protease peptona
- 15 g de bacto ágar
- 8,7 g de glicerol
- 1,5 g de  $K_2HPO_4$
- 1,5 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 1000 mL de água destilada

Após inoculação das bactérias no meio e três dias de incubação a 28 °C, observou-se a presença de pigmentos fluorescentes sob luz UV.

#### 4- Crescimento em meio AN

- 3 g de extrato de carne
- 5 g de peptona
- 15 g da ágar
- 1000 mL de água destilada

Após inoculação das bactérias no meio e três dias de incubação a 28 °C, avaliou-se a presença de crescimento.

#### 5- Crescimento a 33°C em meio YDC

- 10 g de extrato de levedura
- 20 g de dextrose
- 20 g de carbonato de cálcio
- 18 g de ágar
- 1000 mL água destilada

Após inoculação das bactérias no meio e três dias de incubação a 33°C, avaliou-se a presença de crescimento.

#### 6- Atividade de catalase

Adicionou-se algumas gotas de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 20 volumes sobre uma lâmina na qual depositou-se uma alça de massa bacteriana. A formação de bolhas indica a liberação de oxigênio e, conseqüentemente, atividade de catalase positiv





### III. Géis de BOX-PCR

Lista de aislados analizados por BOX-PCR:

Gel 1. M- marcador 100 pb-DNA Ladder

- 1- CNPH 2007-18
- 2- CNPH 2007-19
- 3- -
- 4- CNPH 2007-40
- 5- CNPH 2007-42
- 6- CNPH 2007-42
- 7- CNPH 2007-43
- 8- CNPH 2007-44
- 9- CNPH 2007-45
- 10- CNPH 2008-32
- 11- CNPH 2008-35
- 12- CNPH 2008-36

Gel 2. 1- CNPH 2008-179

- 2- CNPH 2009-12
- 3- CNPH 2009-13
- 4- CNPH 2009-14
- 5- CNPH 2009-15
- 6- CNPH 2008-167
- 7- -
- 8- CNPH 2008-169
- 9- CNPH 2008-170
- 10- CNPH 2008-171
- 11- CNPH 2008-172
- 12- CNPH 2008-173
- 13- CNPH 2008-174
- 14- CNPH 2008-175
- 15- CNPH 2008-176

16- CNPH 2008-177

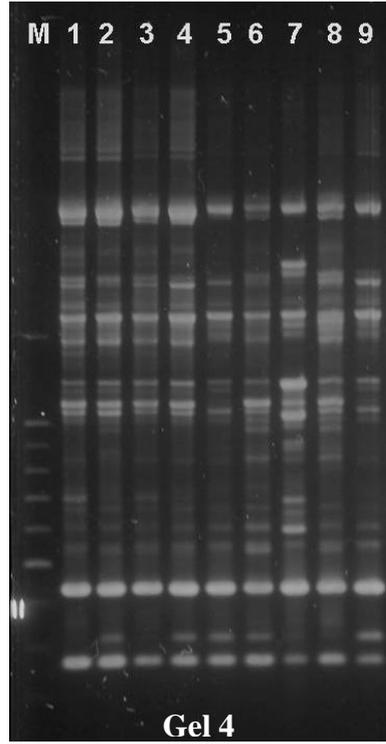
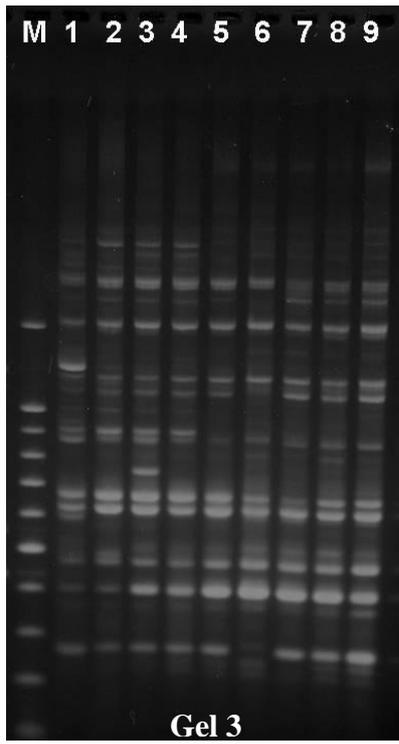
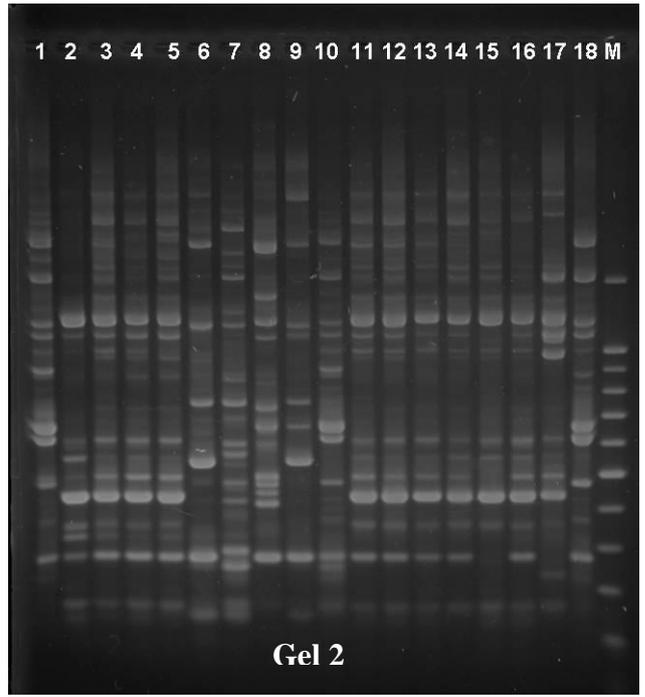
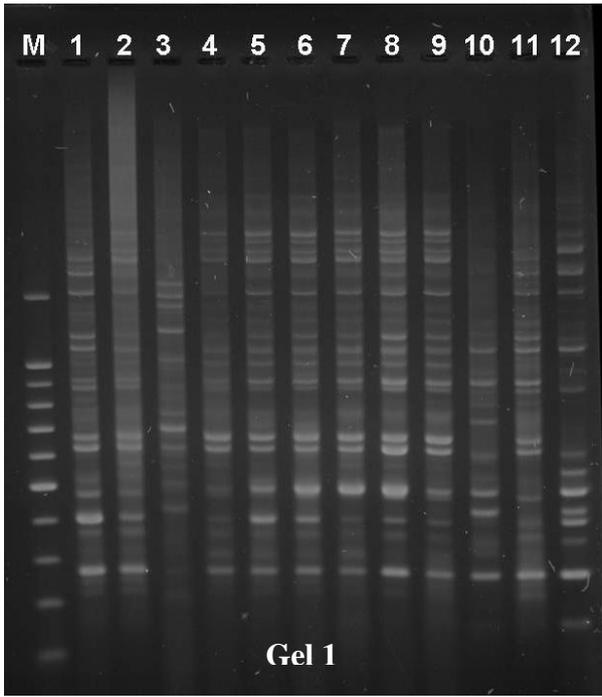
- 17- -
  - 18- CNPH 2008-22
- M- marcador 100 pb-DNA Ladder

Gel 3. M- marcador 100 pb-DNA Ladder

- 1- CNPH 2007-12
- 2- CNPH 2007-13
- 3- CNPH 2007-17
- 4- CNPH 2007-20
- 5- CNPH 2007-22
- 6- CNPH 2007-31
- 7- CNPH 2007-32
- 8- CNPH 2007-35
- 9- CNPH 2007-37

Gel 4. M- marcador 100 pb DNA Ladder

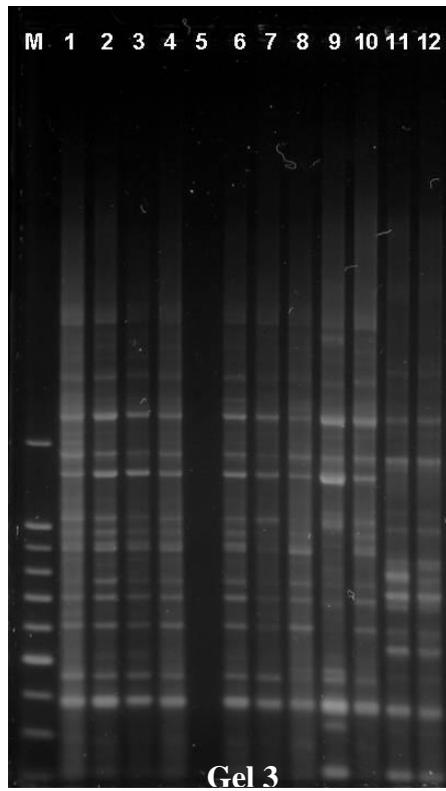
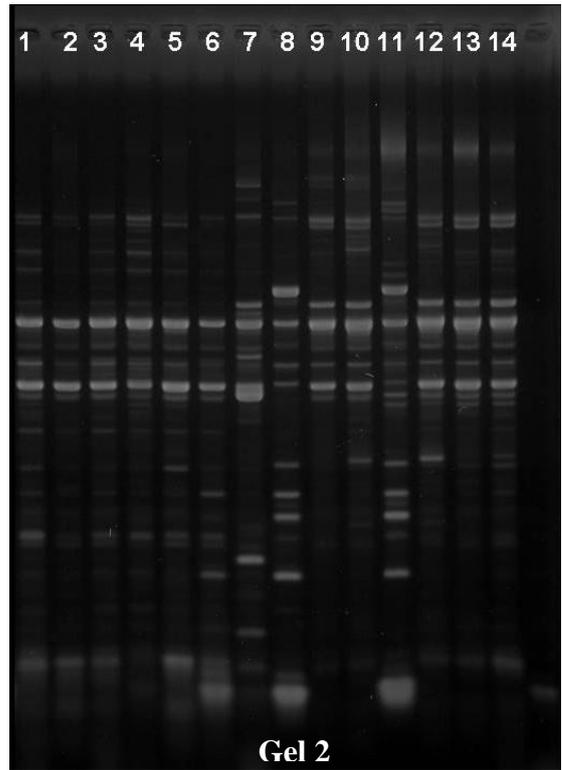
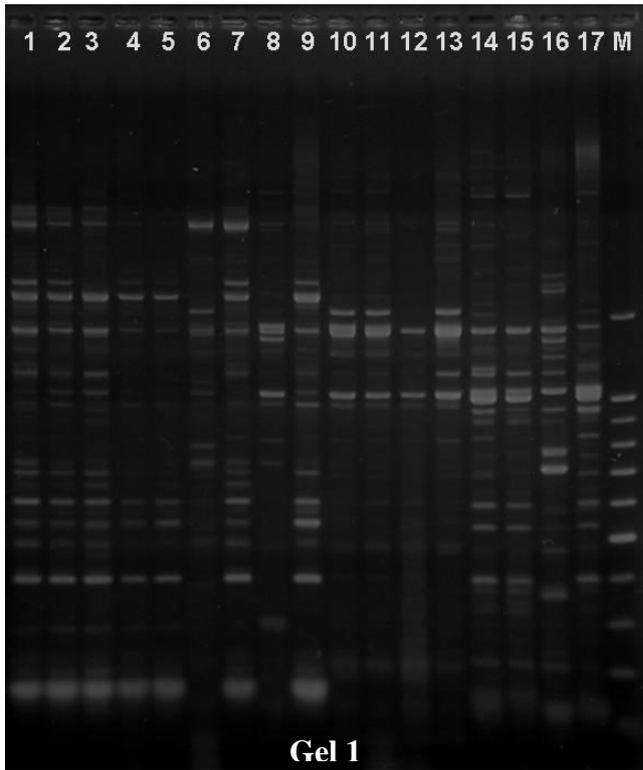
- 1- CNPH 2006-10
- 2- CNPH 2008-36
- 3- CNPH 2008-177
- 4- CNPH 2009-23
- 5- CNPH 2009-24
- 6- CNPH 2009-26
- 7- CNPH 2009-32
- 8- CNPH 2009-34
- 9- CNPH 2009-48



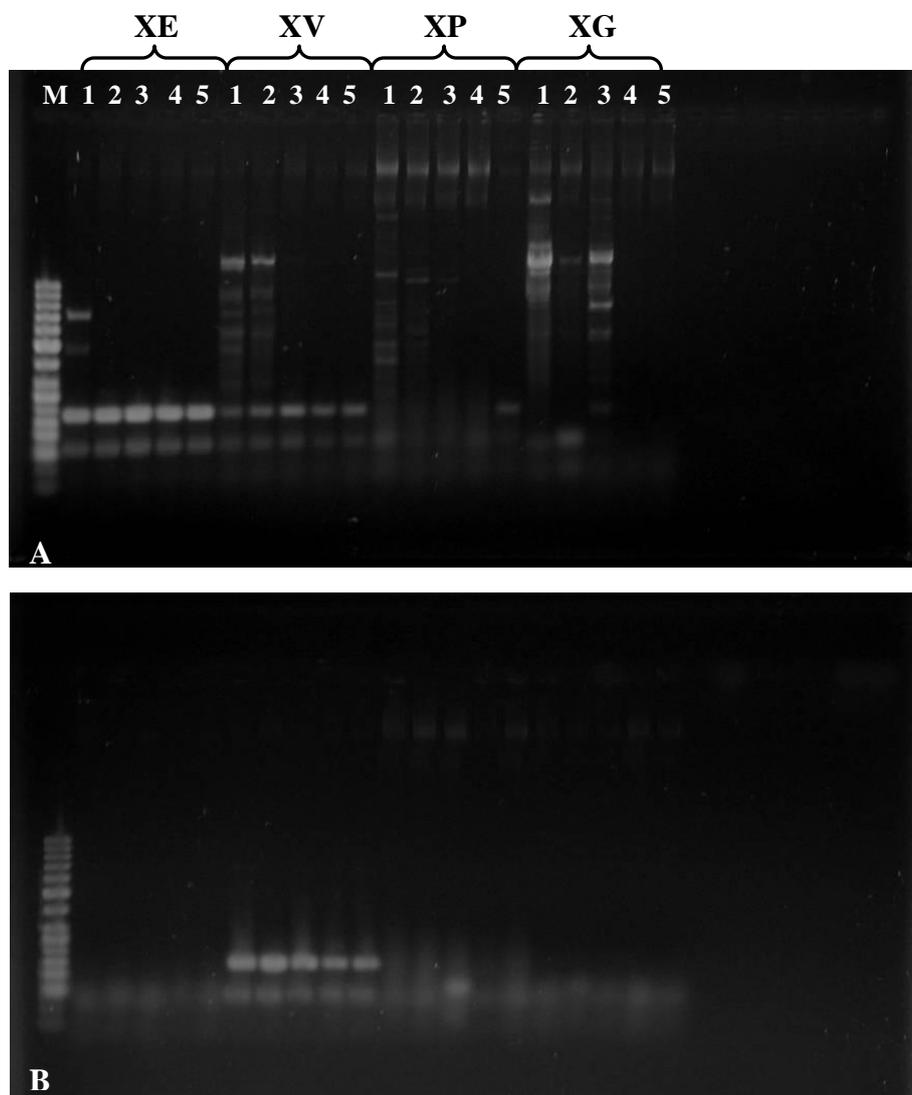
## Géis de REP-PCR

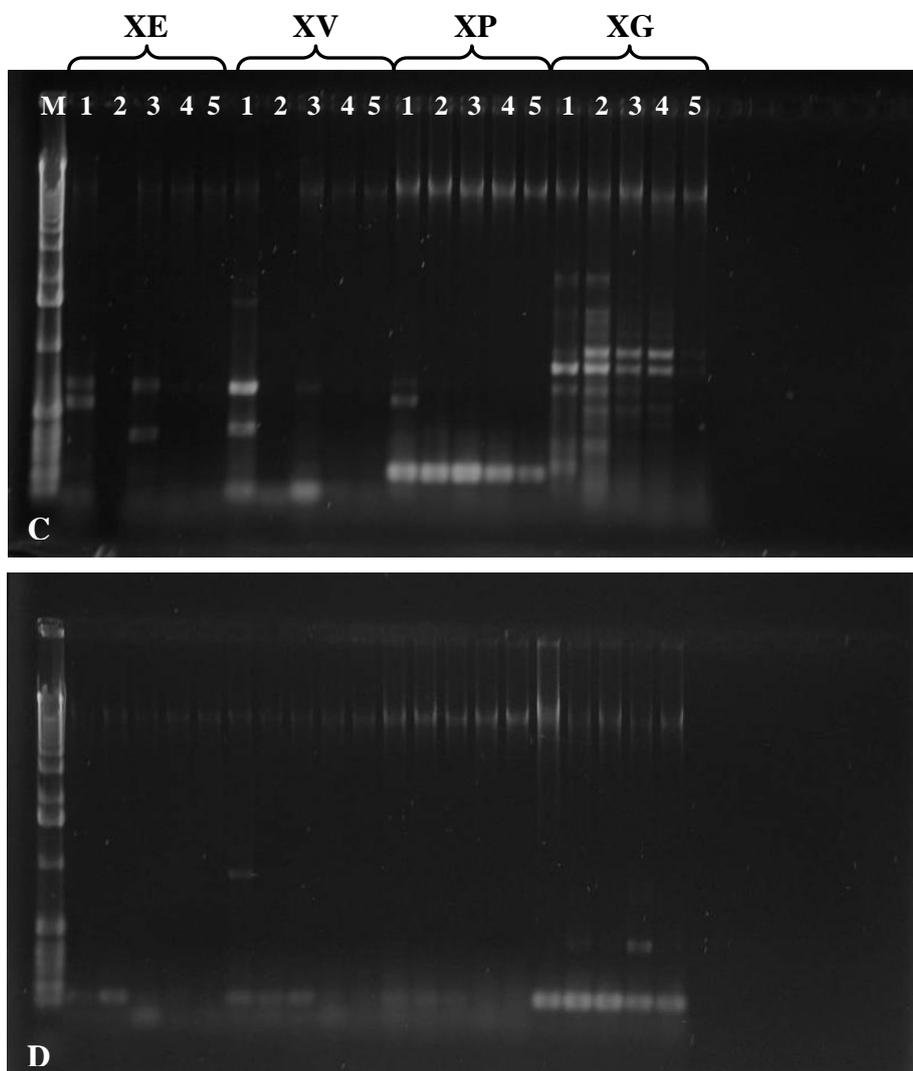
Lista de aislados analizados por REP-PCR:

- |        |                              |        |                              |
|--------|------------------------------|--------|------------------------------|
| Gel 1. | 1- CNPH 2007-41              | Gel 3. | M-marcador 100 pb-DNA Ladder |
|        | 2- CNPH 2007-42              |        | 1- CNPH 2006-06              |
|        | 3- CNPH 2007-43              |        | 2- CNPH 2007-12              |
|        | 4- CNPH 2007-44              |        | 3- CNPH 2007-13              |
|        | 5- CNPH 2007-45              |        | 4- CNPH 2007-17              |
|        | 6- CNPH 2008-32              |        | 5- -                         |
|        | 7- CNPH 2008-35              |        | 6- CNPH 2007-22              |
|        | 8- -                         |        | 7- CNPH 2007-34              |
|        | 9- CNPH 2008-179             |        | 8- CNPH 2007-41              |
|        | 10- CNPH 2009-12             |        | 9- CNPH 2008-32              |
|        | 11- CNPH 2009-13             |        | 10- CNPH 2009-37             |
|        | 12- -                        |        | 11- CNPH 2009-46             |
|        | 13- CNPH 2009-15             |        | 12- CNPH 2009-47             |
|        | 14- CNPH 2008-167            |        |                              |
|        | 15- CNPH 2008-168            |        |                              |
|        | 16- CNPH 2008-169            |        |                              |
|        | 17- CNPH 2008-170            |        |                              |
|        | M-marcador 100 pb-DNA Ladder |        |                              |
| Gel 2. | 1- CNPH 2008-172             |        |                              |
|        | 2- CNPH 2008-173             |        |                              |
|        | 3- CNPH 2008-174             |        |                              |
|        | 4- CNPH 2008-175             |        |                              |
|        | 5- CNPH 2008-176             |        |                              |
|        | 6- CNPH 2008-177             |        |                              |
|        | 7- -                         |        |                              |
|        | 8- CNPH 2008-22              |        |                              |
|        | 9- CNPH 2009-20              |        |                              |
|        | 10- CNPH 2009-21             |        |                              |
|        | 11- CNPH 2009-22             |        |                              |
|        | 12- CNPH 2009-23             |        |                              |
|        | 13- CNPH 2009-24             |        |                              |
|        | 14- CNPH 2009-26             |        |                              |



**IV. PCR para otimização do programa para amplificação com os iniciadores específicos, realizada em termociclador de gradiente**





Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da amplificação do DNA dos isolados de referência, com iniciadores específicos. (XE) IBSBF 2363-*Xanthomonas euvesicatoria*; (XV) IBSBF 2364-*X. vesicatoria*; (XP) IBSBF 2370-*X. perforans*; (XG) IBSBF 2373-*X. gardneri*; (1) 49,8°C; (2) 56,2°C; (3) 61,3°C; (4) 65,7°C; (5) 68,9°C; (A) iniciadores para XE; (B) iniciadores para XV; (C) iniciadores para XP; (D) iniciadores para XG; M ( em A e B): marcador 50bp-ladder; M ( em C e D): marcador 1 Kb-ladder.