



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

**DIAGNOSE MOLECULAR E ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS
DA MANCHA-BACTERIANA DO TOMATEIRO**

Edivânio Rodrigues de Araújo

Brasília – DF

2014

Edivânio Rodrigues de Araújo

**DIAGNOSE MOLECULAR E ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS
DA MANCHA-BACTERIANA DO TOMATEIRO**

Tese apresentada à Universidade de
Brasília como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em
Fitopatologia pelo Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia

Orientadora

Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira, Dra.

Co-orientadora

Alice Maria Quezado-Duval, Dra.

Brasília

Distrito Federal – Brasil

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Araújo, Edivânio Rodrigues

Diagnose molecular e estudos epidemiológicos da mancha-bacteriana do tomateiro. Orientação: Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira; Co-orientação: Alice Maria Quezado-Duval. 2014. 107p.

Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.
1 – *Xanthomonas* spp. 2 – Detecção. 3 – Temperatura e molhamento foliar

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Araújo, E.R. 2014. Diagnose molecular e estudos epidemiológicos da mancha-bacteriana do tomateiro. Brasília, Universidade de Brasília, Tese de Doutorado. 107p.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Edivânio Rodrigues de Araújo

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: Diagnose molecular e estudos epidemiológicos da mancha-bacteriana do tomateiro

GRAU: DOUTOR

ANO: 2014

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. Ao autor reservam-se os outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Dedicatória

Dedico essa tese aos meus pais, Francisca Edivany R. de Araújo e Antônio Cezário de Araújo, que foram meus mestres e doutores no aprendizado do caráter, dignidade e responsabilidade.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me concedido saúde e sabedoria para realizar todas as atividades relacionadas a esta tese. Te agradeço!
- Agradeço à CAPES e ao CNPq (Projeto CNPq-MAPA/Edital 64), pelo auxílio e suporte financeiro durante esses quatro anos.
- Agradeço à pesquisadora Alice Quezado. Mais que uma orientadora competente, você foi uma amiga sábia durante esses anos de trabalho.
- Agradeço à professora Marisa Ferreira, sempre solícita e inteligente para resolver todos os problemas.
- Agradeço a todos os professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília. Vocês compartilharam de forma muito eficiente os seus conhecimentos.
- Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, com os quais convivi desde a época de Pibic.
- Agradeço ao pesquisador Antonio W. Moita, pela presteza e disponibilidade para auxílio nas árduas análises estatísticas, desde os experimentos de Mestrado. No mesmo quesito, agradeço ao professor Nadson Pontes, pelo companheirismo e ajuda.
- Agradeço à Embrapa Hortaliças, pela disponibilização de espaço, equipamentos e reagentes para a realização deste trabalho. Foi nesse lugar que formei uma nova família nestes últimos anos.
- Um agradecimento especial a todos os integrantes do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças. Devo citá-los: Amanda: paraibana da gema e ótima parceira de forró; Aracelle: ou será Aracleide?; Bruno Costa: quase não lembrava dele; Celma: sempre procurando o seu lugar; Cléia: trabalhadora, vendedora, pitimbada; Elenice: debandeou pra piscicultura; Fabiana: boa mãe em casa e no laboratório (ainda bem que temos imunidade boa); Fred: prestativo, muito mineiro e um grande cara; Janderson: garoto do controle químico, reforçou bem a bacteriologia; Jheferson: meu manin caçula, quando vai, trabalha muito; Luana: defensora ferrenha da bacteriologia e parceira para todas as horas; Maurício: hilário e representante da segunda doença mais importante do tomateiro; Nadson: já é professor e fera na estatística; Rayane: gênica e companheira de *Xanthomonas*; Wagner: tirando a coluna e os quatro membros, ele está ótimo. Vocês fizeram meus dias mais felizes!!
- Agradeço aos meus irmãos e a todos os familiares, inclusive àqueles que perguntaram incansavelmente se eu só estudava durante esses 4 anos.

- Tenho o prazer de repetir nomes de amigos que agradei em minha dissertação: Josineide, Lúdia, Bruno Tarchetti, Eduardo, Fábio, Renato. Obrigado!!
- Agradeço a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização dessa tese!

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Professora **Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira** e co-orientação da Doutora **Alice Maria Quezado-Duval**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Diagnose molecular e estudos epidemiológicos da mancha-bacteriana do tomateiro

Edivânio Rodrigues de Araújo

TESE APROVADA em __/__/____ por

Professor, Ph.D. Luis Cláudio Vieira da Cunha (Universidade Federal de Viçosa)
Examinador Externo

Pesquisadora, Doutora Abi Soares dos Anjos Marques (Embrapa Quarentena Vegetal)
Examinadora Externa

Pesquisador, Ph.D. Carlos Alberto Lopes (Embrapa Hortaliças)
Examinador Externo

Professor, Ph.D. Adalberto Corrêa Café-Filho (Universidade de Brasília)
Examinador Interno

Professor, Doutor Carlos Hidemi Uesugi (Universidade de Brasília)
Suplente

Professora, Doutora Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira (Universidade de Brasília)
Orientadora (Presidente)

Brasília – Distrito Federal
Brasil
2014

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Resumo Geral.....	iv
General Abstract.....	vi
Introdução Geral e Revisão de Literatura.....	1
O tomateiro.....	1
Histórico da etiologia da mancha-bacteriana do tomateiro.....	1
Mancha-bacteriana do tomateiro.....	3
Justificativas e Hipóteses.....	6
Objetivos: geral e específicos.....	7
Referências.....	8
Capítulo 1. Prevalência, distribuição e caracterização de <i>Xanthomonas perforans</i>, principal agente causal da mancha-bacteriana do tomateiro no Brasil.....	13
Resumo.....	14
Abstract.....	15
Introdução.....	16
Material e Métodos.....	17
Resultados.....	21
Discussão.....	33
Referências.....	39
Capítulo 2. Detecção e identificação simultâneas do complexo de espécies de <i>Xanthomonas</i> associado à mancha-bacteriana do tomateiro utilizando iniciadores específicos e PCR <i>multiplex</i>.....	44
Resumo.....	45
Abstract.....	46
Introdução.....	47
Material e Métodos.....	48
Resultados.....	53
Discussão.....	57
Referências.....	63
Capítulo 3. Severidade da mancha-bacteriana do tomateiro, causada por <i>Xanthomonas perforans</i> e <i>X. gardneri</i>, difere entre as espécies em função da temperatura e molhamento foliar.....	69
Resumo.....	70
Abstract.....	71
Introdução.....	72
Material e Métodos.....	73
Resultados.....	74

Discussão.....	81
Referências.....	85

Capítulo 4. Caracterização parcial da comunidade bacteriana associada a sementes e mudas assintomáticas de variedades comerciais de tomateiro.....	88
Resumo.....	89
Abstract.....	90
Introdução.....	91
Material e Métodos.....	92
Resultados.....	94
Discussão.....	98
Referências.....	101
Conclusões Gerais.....	105
Perspectivas Futuras.....	106
Anexos.....	107

LISTA DE TABELAS

Introdução Geral e Revisão de Literatura

Tabela 1. Distribuição das espécies de <i>Xanthomonas</i> causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro, segundo registros publicados até o ano de 2013.....	3
--	---

Capítulo 1

Tabela 1. Código, ano de isolamento, procedência, segmento, identificação molecular e determinação da raça de 204 isolados de <i>Xanthomonas</i> causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro.....	19
Tabela 2. Identificação de raças de <i>Xanthomonas</i> a partir da reação de resistência ou suscetibilidade em genótipos diferenciadores do tomateiro.....	25

Capítulo 2

Tabela 1. Isolados de <i>Xanthomonas</i> spp. causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro utilizados para validação dos iniciadores específicos previamente desenhados por Koenraad <i>et al.</i> (2009).....	49
Tabela 2. Especificidade dos iniciadores específicos para <i>Xanthomonas</i> spp. causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro.....	54
Tabela 3. Sensibilidade dos iniciadores específicos de <i>Xanthomonas</i> spp. causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro e pimentão utilizando diferentes métodos de PCR	61

Capítulo 4

Tabela 1. Caracterização bioquímica e molecular de isolados associados a sementes e mudas de tomateiro utilizados no estudo.....	95
Tabela 2. Resposta de isolados de <i>Xanthomonas</i> causadores da mancha-bacteriana do tomateiro e isolados associados a sementes e mudas a diferentes antibióticos.....	97

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral e Revisão de Literatura

Figura 1. Sintomas de mancha-bacteriana, causada por <i>Xanthomonas</i> spp., em folhas e frutos de tomateiro. A – sintomas iniciais caracterizados por lesões encharcadas e pequenas; B – lesões levemente elevadas em frutos; C – lesões com aspecto mais seco e queima das folhas; D – lesões circulares com centro deprimido, nos frutos.....	4
--	---

Capítulo 1

Figura 1. Ocorrência das espécies de <i>Xanthomonas</i> causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro nos estados brasileiros, segundo levantamento realizado nesse estudo.....	27
Figura 2. Dendrograma gerado a partir da comparação dos perfis genômicos obtidos por BOX-PCR de 204 isolados de <i>Xanthomonas</i> causadores da mancha-bacteriana do tomateiro e isolados de referência IBSBF.....	29
Figura 3. Inoculação por aspersão da raça T4 de <i>Xanthomonas perforans</i> (isolado EH 2011-103) em genótipos diferenciadores de tomateiro. A – Sintomas no genótipo Bonny Best; B – Sintomas no genótipo CNPH 1500 = Hawaii 7981; C – Sintomas no genótipo CNPH 1255 = Hawaii 7981. Sintomas observados 10 dias após a inoculação de uma suspensão bacteriana com concentração aproximada de 5×10^8 UFC ml ⁻¹	33
Figura 4. Gel de agarose com fragmentos de DNA amplificados e alinhamento das sequências de isolados da raça T3 e T4 de <i>X. perforans</i> , agente causal da mancha-bacteriana do tomateiro. As setas indicam o <i>gap</i> que se forma no alinhamento entre isolados da raça T4 (EH 2011-105; EH 2011-107; EH 2011-130; EH 2011-132) com um isolado da raça T3 (IBSBF 2370).....	36
Figura 5. Alinhamento realizado com auxílio da ferramenta BLAST - <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> entre a inserção encontrada no gene <i>avrXv3</i> (Inserção T4) e o fragmento de DNA (transposon relacionado à família de proteínas YscJ/HrcJ) do genoma completo de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (PXO99A), depositado no GenBank com o número de acesso CP000967.1. A cobertura foi de 100% e identidade 92%.....	37

Capítulo 2

Figura 1. Fragmentos de DNA amplificados de diferentes espécies de <i>Xanthomonas</i> causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro obtidos com iniciadores específicos.....	54
Figura 2. Fragmentos de DNA amplificados de diferentes espécies de <i>Xanthomonas</i> por PCR <i>multiplex</i> . a - diferentes combinações de DNA purificado (50 ng ml^{-1}) das quatro espécies; b – fragmentos obtidos usando suspensões bacterianas (5×10^8 UFC ml ⁻¹).....	57
Figura 3. Sensibilidade dos iniciadores específicos de <i>Xanthomonas</i> spp. causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro em PCR convencional e PCR <i>multiplex</i>	60
Figura 4. Detecção de espécies de <i>Xanthomonas</i> em folhas sintomáticas de tomateiro 8 dias após a inoculação.....	62

Capítulo 3

Figura 1. Efeito da temperatura (15; 20; 25; 30 e 35°C) e do molhamento foliar (0; 6; 12; 24 e 48 horas) sobre a severidade (% de área foliar lesionada) da mancha-bacteriana do tomateiro ocasionada por <i>Xanthomonas perforans</i> (EH 2012-22), 10 dias após a inoculação de uma suspensão bacteriana (5×10^8 UFC ml ⁻¹).....	76
---	----

Figura 2. Severidade da mancha-bacteriana do tomateiro causada por <i>Xanthomonas perforans</i> (EH 2012-22), dez dias após a inoculação, em resposta a diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. A - valores observados; B – valores estimados pela análise de regressão múltipla.....	77
Figura 3. Efeito da temperatura (15; 20; 25; 30 e 35°C) e do molhamento foliar (0; 6; 12; 24 e 48 horas) sobre a severidade (% de área foliar lesionada) da mancha-bacteriana do tomateiro ocasionada por <i>Xanthomonas gardneri</i> (EH 2011-37), 10 dias após a inoculação de uma suspensão bacteriana (5×10^8 UFC ml ⁻¹).....	78
Figura 4. Severidade da mancha-bacteriana do tomateiro causada por <i>Xanthomonas gardneri</i> (EH 2011-37), dez dias após a inoculação, em resposta a diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. A - valores observados; B – valores estimados pela análise de regressão múltipla.....	79
Figura 5. Efeito da temperatura na taxa de crescimento populacional de <i>Xanthomonas perforans</i> , agente causal da mancha-bacteriana do tomateiro, avaliada 16 e 24 horas após a incubação da bactéria nas respectivas temperaturas. A medição da concentração foi realizada com espectrofotômetro (600nm). Os valores da concentração são absolutos.....	80
Figura 6. Efeito da temperatura na taxa de crescimento populacional de <i>Xanthomonas gardneri</i> , agente causal da mancha-bacteriana do tomateiro, avaliada 16 e 24 horas após a incubação da bactéria nas respectivas temperaturas. A medição da concentração foi realizada com espectrofotômetro (600nm). Os valores da concentração são absolutos.....	81
 Capítulo 4	
Figura 1. Procedimentos para identificação do isolado EH 2012-36 (<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>) presente no filoplano de mudas assintomáticas de tomateiro.....	96
Figura 2. Sensibilidade in vitro de isolados de <i>Xanthomonas</i> associadas à mancha-bacteriana do tomateiro a diferentes antibióticos. A – reação de sensibilidade de <i>X. perforans</i> (EH 2012-22); B – reação de sensibilidade de <i>X. vesicatoria</i> (EH 2010-41).....	98

Resumo Geral

Araújo, Edivânio Rodrigues. **Diagnose molecular e estudos epidemiológicos da mancha-bacteriana do tomateiro**. 2014. 107p. Doutorado em Fitopatologia – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A mancha-bacteriana está entre os fatores que prejudicam a produção de tomate no Brasil. A doença é causada por um complexo de espécies do gênero *Xanthomonas*: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*. Os objetivos dessa tese são: i) realizar um levantamento da frequência de ocorrência de espécies e raças causadoras da doença em lavouras brasileiras de tomate, tanto destinadas ao consumo *in natura* quanto ao processamento industrial; ii) estabelecer protocolos de detecção e identificação simultânea das espécies causadoras da doença; iii) compreender o efeito da temperatura e molhamento foliar no monociclo da doença; iv) identificar possíveis agentes causadores da mancha-bacteriana e a comunidade bacteriana presente em mudas assintomáticas cultivadas em viveiro comercial e sementes comerciais de tomateiro. Para alcance desses objetivos, testes de patogenicidade, técnicas moleculares baseadas na PCR (BOX-PCR, iniciadores específicos), além de sequenciamento do gene de avirulência *avrXv3* foram utilizados. O efeito da temperatura (15; 20; 25; 30 e 35°C) e molhamento foliar (0; 6; 12; 24 e 48 horas) na severidade da doença foi avaliado para as duas espécies de maior ocorrência: *X. perforans* e *X. gardneri*. Da mesma forma, foi verificado o efeito *in vitro* da temperatura na taxa de multiplicação em meio de cultura dessas espécies. Por fim, por meio de coletas de água superficial no filoplano de mudas assintomáticas e maceração de sementes, buscou-se identificar possíveis agentes patogênicos, tentando identificá-los por isolamento direto, uso de iniciadores específicos e sequenciamento do rRNA de 16S. Com base nos resultados obtidos, verificou-se que *X. perforans* é a espécie predominante ($\approx 92\%$ dos isolados) nos campos brasileiros de produção de tomate, em ambos os segmentos produtivos: consumo *in natura* e processamento industrial. Entre os isolados de *X. perforans*, a raça T3 predomina, representando 97,3% desses isolados. Cinco isolados foram identificados como raça T4. Esses isolados apresentaram uma inserção de 858 pb no gene *avrXv3*, relacionada à família de proteínas YscJ/HrcJ. Por meio dos protocolos estabelecidos foi possível identificar as quatro espécies causadoras da doença com iniciadores específicos tanto utilizando PCR convencional como PCR *multiplex*. As espécies *X. perforans* e *X. gardneri* apresentaram comportamento distinto com relação ao ótimo de temperatura para seu desenvolvimento. Enquanto *X. perforans* incitou maior porcentagem de área foliar lesionada quando exposta a temperaturas acima de

25°C, com agressividade crescente até o limite superior testado (35°C), observou-se para *X. gardneri* uma redução da agressividade nos limites inferior (15°C) e superior de temperatura. Essas espécies só incitaram doença quando o período de molhamento foliar foi igual ou maior que 12 horas. Do mesmo modo, a temperatura teve efeito direto na taxa de crescimento *in vitro* de *X. perforans*. Por fim, foi possível identificar um isolado de *X. euvesicatoria* associado a mudas assintomáticas de tomateiro, além dos gêneros *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Sphingobium* e *Sphingomonas*. Com isso, estratégias de manejo da doença devem focalizar *X. perforans*, já que é a espécie predominante. No mesmo sentido, estratégias de controle denominadas evasivas devem ser adotadas, uma vez que a doença apresenta faixas limítrofes para as variáveis temperatura e molhamento foliar. Este é o primeiro registro da ocorrência da raça T4 no país. Os isolados bacterianos dos demais gêneros encontrados em sementes e mudas devem ser avaliados quanto ao seu potencial como agentes de controle biológico. Levantamentos sistemáticos das espécies/raças causadoras da doença devem ser continuados para o auxílio nas tomadas de decisão.

Palavras-chave: detecção, iniciadores específicos, molhamento foliar, PCR, PCR *multiplex*, *Solanum lycopersicum*, temperatura, *Xanthomonas perforans*

General Abstract

Araújo, Edivânio Rodrigues. **Molecular diagnosis and epidemiological studies of tomato bacterial spot**. 2014. 107p. Doctorate in Plant Pathology – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Bacterial spot is among the limiting factors in tomato production in Brazil. The disease is caused by a species complex of the genus *Xanthomonas*: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* and *X. gardneri*. The aims of this thesis were: i) to perform a survey the frequency of occurrence of species and races causing bacterial spot on Brazilian tomato crops; ii) to establish protocols for simultaneous detection and identification of the species causing disease; iii) to understand the effect of temperature and leaf wetness on the monocycle of tomato bacterial spot; iv) to identify possible causal agents of tomato bacterial spot and bacterial community present in asymptomatic seedlings and seeds. For achieving these objectives, pathogenicity tests, molecular techniques based on PCR (BOX-PCR, specific primers) and sequencing of avirulence gene *avrXv3* were used. The effect of temperature (15, 20, 25, 30, and 35°C) and leaf wetness (0, 6, 12, 24, and 48 hours) on disease severity was assessed. Likewise, the *in vitro* effect of temperature on the population growth rate of *X. perforans* and *X. gardneri* was checked. Finally, by collecting surface water on the phylloplane of asymptomatic seedlings and soaking commercial seeds, the presence of potential pathogens were surveyed. Direct isolation, using PCR with specific primers and sequencing of 16S rRNA were the tempted methods applied. Based on the results, we found that *X. perforans* is the predominant species ($\approx 92\%$ of isolates) in Brazilian tomato fields, in both production segments: fresh market and processing. Among strains of *X. perforans*, the T3 race was predominant, representing 97.3% of these isolates. Five isolates were identified as T4 race. These isolates had an insertion of 858 bp in *avrXv3* gene related to a protein YscJ/HrcJ family. The protocols enabled the identification of the four species causing the disease with specific primers using both conventional PCR and multiplex PCR. The species *X. perforans* and *X. gardneri* showed different behaviors with respect to the optimum temperature for development. *Xanthomonas perforans* caused more disease at temperatures above 25°C, with increasing aggressiveness up to the upper limit tested (35°C). On the other hand, *X. gardneri* decreased the disease severity from the optimal temperature for both lower and upper limit of temperature. Both species only incited disease

when leaf wetness periods were longer than six hours. In the same way, the temperature had a direct effect on the in vitro growth rate of *X. perforans*. Finally, it was possible to identify an isolate of *X. euvesicatoria* associated with asymptomatic tomato seedlings in a commercial nursery production, besides the genus *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Sphingomonas* and *Sphingobium*. Thus, disease management strategies should focus on the species *X. perforans*, since it is the predominant species. Similarly, control strategies based on evasion should be applied, since the disease has a borderline range for the temperature and leaf wetness. This is the first report of occurrence of race T4 in Brazil. Bacterial isolates from other genus found in seeds and seedlings should be evaluated to assess their biological control potential. Systematic surveys of species/races causing the disease should be continued to aid in the control decision taking.

Keywords: detection, leaf wetness, PCR, multiplex PCR, specific primers, *Solanum lycopersicum*, temperature, *Xanthomonas perforans*

Guidance Committee: Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira – Universidade de Brasília (Advisor); Alice Maria Quezado-Duval – Embrapa Hortaliças (Co-advisor)

Introdução Geral e Revisão de Literatura

O tomateiro

O tomate (*Solanum lycopersicum*, sin.: *Lycopersicon esculentum* Mill) ocupa atualmente, a segunda posição no Brasil, em área cultivada, entre as hortaliças. A batata ocupa a primeira posição (IBGE, 2013; FAOSTAT, 2012). Em se tratando de produção, o tomateiro está na liderança com uma produção de 3.873.985 toneladas no ano de 2013. No mesmo sentido, com relação ao rendimento médio, o tomateiro é a hortaliça com maior produtividade no país, com uma colheita média de 65.747 Kg/ha na safra de 2013 (IBGE, 2013).

O fruto do tomateiro pode ser produzido para duas finalidades: i) para o consumo *in natura*, também denominado tomate de mesa; ii) para o processamento industrial, também chamado de tomate indústria, o qual se destina a produção de molhos, pastas, sucos e desidratados. A região Centro-Oeste é responsável por 27,9% da produção total do país, sendo que, no estado de Goiás está concentrada a maior produção nacional de tomate para processamento industrial. Por sua vez, a região Sudeste é a que comporta a maior parcela na produção dessa hortaliça, com 37,7% da produção nacional (IBGE, 2013) e é nessa região que se concentra a maior parte da produção de tomate destinada ao consumo *in natura*.

Dentre as diversas doenças que prejudicam a produção de tomate no Brasil, a mancha-bacteriana tem grande importância pela frequência de ocorrência, causando grandes prejuízos aos produtores e processadoras. Seu manejo tem sido difícil devido à diversidade dos patógenos associados à doença, ausência de cultivares resistentes ou com tolerância elevada e pouca eficiência no controle químico convencional, baseado, principalmente, no uso intensivo de produtos cúpricos (Quezado-Duval e Lopes, 2010).

Histórico da etiologia da mancha-bacteriana do tomateiro

Segue, de forma breve, uma descrição da complexa etiologia da mancha-bacteriana desde os primeiros relatos da doença até a classificação majoritariamente aceita.

A doença foi primeiramente observada em plantas de tomate na África do Sul em 1914 e posteriormente descrita como “tomato canker” em 1920, por Ethel Doidge, que observou uma fraca atividade amilolítica dos organismos patogênicos associados à doença e nomeou a bactéria como *Bacterium vesicatorium*. Concomitantemente foi descrita uma doença similar nos Estados Unidos, que foi denominada como “bacterial spot”, ou mancha-bacteriana e seu agente causal apresentava forte atividade amilolítica, sendo nomeado como *Bacterium exitiosa* (Gardner e Kendrick, 1921). Na mesma época, Sherbakoff descreveu a doença em pimentão (Sherbakoff,

1918). Posteriormente, o agente causal foi classificado como *Pseudomonas vesicatoria* em 1925; *Phytomonas vesicatoria* em 1930; e *Xanthomonas vesicatoria* em 1939 (Jones e Stall, 1998).

Alguns anos depois, foi caracterizada uma variante da bactéria denominada *Pseudomonas gardneri*, identificada por Sutic na Iugoslávia e Costa Rica (Sutic, 1957), que posteriormente foi colocada em sinonímia com *Xanthomonas vesicatoria*. A colocação de *P. gardneri* no gênero *Xanthomonas* foi sustentada por estudos de hibridização DNA:rRNA (Deley, 1979). Entretanto, Hildebrand *et al.* (1990) verificaram que *X. gardneri* estava mais relacionada a outras espécies do gênero, tais como *X. hortorum* pv. *carotae*, sendo considerada como um grupo a parte.

A variabilidade do patógeno começou a ser melhor esclarecida quando se observou que os isolados provenientes de tomate hidrolisavam amido e os de pimentão não (Burkholder & Li, 1941). Posteriormente, Dye (1966) confirmou que isolados oriundos de pimentão hidrolisavam amido mais fracamente que aqueles de tomate. Logo, estabeleceram-se dois diferentes grupos causadores da mancha-bacteriana (Vauterin *et al.* 1995; 2000): *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A, sem atividade amilolítica) e *X. vesicatoria* (grupo B, amilolítico positivo).

Estudos posteriores, incluindo testes de patogenicidade, bioquímicos, atividade enzimática, marcadores genéticos e hibridização DNA-DNA, concluíram que dentro do grupo das *Xanthomonas* patogênicas ao tomate e ao pimentão existiam quatro grupos fenotípicos diferentes, que foram classificados como três espécies distintas, a saber: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupos A e C), *X. vesicatoria* (grupo B) e *X. gardneri* (Jones *et al.* 2000). Jones *et al.* (2004) propuseram uma reclassificação dos grupos A e C, propondo sua nomenclatura como *Xanthomonas euvesicatoria* e *X. perforans*, respectivamente, sendo este último inserido como um novo táxon entre os agentes causadores da mancha-bacteriana. Além disso, isolados de cada espécie podem ser caracterizados quanto a raças, de acordo com a capacidade de causar ou não reação de hipersensibilidade em variedades diferenciais de tomate e pimentão (Stall *et al.* 2009).

A posição taxonômica desses organismos ainda é discutida, porém, nesta tese, será adotada a proposta de classificação feita por Jones *et al.* (2004) e sustentada por Potnis *et al.* (2012) após comparação do genoma completo das espécies (Tabela 1), e validadas pelo Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (Bull *et al.* 2010). Nessa classificação, consideram-se quatro espécies como agentes causais da mancha-bacteriana do tomateiro: *X. euvesicatoria*

(grupo A, raça T1); *X. vesicatoria* (grupo B, raça T2); *X. perforans* (grupo C, raças T3, T4 e T5) e *X. gardneri* (grupo D, raça T2).

Tabela 1. Distribuição das espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro, segundo registros publicados até o ano de 2013.

Espécies	Grupo fenotípico/ genotípico	Locais de Ocorrência
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	A	Mundialmente
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	B	Mundialmente
<i>Xanthomonas perforans</i>	C	Comores, Coréia do Sul, Brasil, Estados Unidos, Ilhas Maurício, Itália, México, Tailândia, Tanzânia, República das Seicheles
<i>Xanthomonas gardneri</i>	D	Brasil, Bulgária, Costa Rica, Estados Unidos, Ilha Reunião, Iugoslávia, Rússia

Mancha-bacteriana do tomateiro

A mancha-bacteriana foi relatada em praticamente todas as regiões produtoras de tomate no mundo (Jones e Stall, 1998). Após a proposta de reclassificação do grupo realizada por Jones *et al.* (2004), a distribuição/ocorrência das espécies até o ano de 2013 está descrita na Tabela 1. A doença também é importante para a cultura do pimentão (Kousik e Ritchie, 1998). No Brasil, foi relatada primeiramente por Batista em 1947 na região Nordeste, causando prejuízos em mudas e plantações de pimentão e, um pouco mais tarde, no estado do Rio de Janeiro (Robbs, 1953).

A doença é causada por até quatro espécies de *Xanthomonas*, a saber, *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (Jones *et al.* 2004). Contudo, trabalhos mais recentes de caracterização dos agentes causais da mancha-bacteriana, relataram a ocorrência de *X. arboricola* ocasionando a doença em campo (Mbega *et al.* 2012a). No mesmo sentido, *X. campestris* pv. *raphani* (Vicente *et al.* 2006) e as espécies *X. campestris* pv. *begoniae* e *X. campestris* pv. *poisentiicola* (Mbega 2012b) foram capazes de ocasionar manchas foliares em tomateiro, por meio de inoculações artificiais. A importância econômica e epidemiológica da doença causada por essas espécies ainda precisa ser esclarecida. A maioria dos trabalhos

realizados até o presente momento, indica as quatro espécies reclassificadas por Jones *et al.* (2004) como o complexo bacteriano causador da doença.

A mancha-bacteriana atinge toda a parte aérea da planta, comprometendo a produtividade da cultura devido à redução da área foliar fotossintetizante, queda de flores em formação e perda do valor comercial dos frutos (Jones *et al.* 1991; Quezado-Duval e Lopes, 2010). Nas folhas, os primeiros sintomas aparecem como pequenas áreas encharcadas com formato irregular (Figura 1A). Posteriormente, formam-se lesões necróticas maiores com aspecto seco, podendo apresentar halos amarelados (Figura 1C). Em ataques severos, as lesões podem coalescer e provocar amarelecimento e morte das folhas. Normalmente, esses sintomas são primeiramente observados nas folhas baixeras. A morte das folhas expõem os frutos à radiação solar, ocasionando escaldadura dos mesmos. Nas peças florais, usualmente, o ataque resulta em sérios declínios de frutificação. Em frutos, aparecem manchas levemente elevadas (Figura 1B), primeiramente esbranquiçadas e posteriormente de coloração marrom escura, que evoluem entre 2 a 10 mm de diâmetro (Figura 1D), com centro deprimido (Kurozawa e Pavan, 1997; Quezado-Duval e Lopes, 2010).



Figura 1. Sintomas de mancha-bacteriana, causada por *Xanthomonas* spp., em folhas e frutos de tomateiro. A – sintomas iniciais caracterizados por lesões encharcadas e pequenas; B – lesões levemente elevadas em frutos; C – lesões com aspecto mais seco e queima das folhas; D – lesões circulares com centro deprimido, nos frutos.

O problema é caracterizado como de grande importância em plantações de tomate com temperaturas entre 20°C e 30°C (Lopes & Quezado-Duval, 2005). Essa amplitude térmica favorável à doença, aparentemente, deve-se à adaptabilidade dos seus diferentes agentes causais a temperaturas divergentes (Araújo *et al.* 2011).

A mancha-bacteriana foi relatada em uma gama de hospedeiras bastante diversificada dentro da família Solanaceae. Espécies como *Capsicum frutescens*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger*, *H. aureus*, *Lycium chinense*, *L. halimifolium*, *Nicotiana rustica*, *Physalis minima*, *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *S. rostratum*, *S. tuberosum*, *S. melongena* e *Nicandra physaloides*, foram relatadas verificadas como espécies hospedeiras por incidência natural ou artificial da bactéria (Jones e Stall, 1998), mesmo não havendo determinação da espécie bacteriana em questão.

A presença das fitobactérias causadoras da mancha-bacteriana em plantas voluntárias de tomate (tigueras) e hospedeiras alternativas parece exercer papel importante na epidemiologia da doença, servindo como fonte de inóculo para possíveis epidemias em lavouras brasileiras (Quezado-Duval e Lopes, 2010). Além disso, as sementes são uma importante fonte de disseminação da bactéria a longas distâncias e o uso de sementes saudáveis pode ser a melhor opção para um manejo preventivo da doença (Goode e Sasser, 1980).

A identificação das espécies causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro inicialmente era realizada com base em diferenças fenotípicas dos patógenos, como a capacidade de hidrolisar amido (Jones e Stall, 1998). Porém, essas características podem causar confusão. *Xanthomonas euvesicatoria*, por exemplo, é considerada fracamente amilolítica, não apresentando uma resposta nítida para esse teste. Entretanto, para essa mesma espécie, já foram descritos isolados com forte atividade amilolítica (Hamza *et al.* 2010).

Com o advento e a disseminação das técnicas moleculares, a utilização de marcadores tipo rep-PCR (Louws *et al.* 1995; Bouzar *et al.* 1999), sequenciamento de genes específicos (Young *et al.* 2008) e o desenvolvimento de iniciadores específicos para cada espécie (Koenraad *et al.* 2009; Moretti *et al.* 2009; Araújo *et al.* 2013; Beran e Mráz, 2013) são as técnicas mais utilizadas para diagnose da doença e detecção dos patógenos.

O controle químico da doença tem sido realizado com uso de produtos cúpricos. Não existe atualmente nenhum antibiótico registrado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, específico para o controle da mancha-bacteriana do tomateiro (MAPA, 2014), apesar de estreptomicina e oxitetraciclina serem princípios ativos presentes em agrotóxicos registrados e utilizados no passado (Quezado-Duval *et al.* 2003). O manejo eficiente da doença

está diretamente relacionado à diversidade de seus agentes causais, uma vez que as diferentes espécies podem apresentar sensibilidades distintas a antibióticos ou produtos cúpricos (Araújo *et al.* 2012). Estudos mais recentes demonstraram que outras moléculas, como o indutor de resistência acibenzolar-S-metil, componente de um agrotóxico registrado para a mancha-bacteriana do tomateiro, podem ter alguma eficiência no controle, desde que respeitados dosagem, volume e intervalos de aplicação adequados (Huang *et al.* 2012; Pontes, 2012).

Justificativas e Hipóteses

O complexo dos agentes causais da mancha-bacteriana em tomateiro (*Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*) está presente no país tanto em lavouras para mesa (Pereira *et al.* 2011), como em lavouras destinadas à indústria (Quezado-Duval *et al.*, 2005), logo a identificação destas espécies e conhecimento de seus aspectos biológicos são fundamentais para o entendimento dos patossistemas.

O estudo da competitividade/adaptabilidade entre as espécies pode auxiliar no entendimento da prevalência de uma delas numa certa área ou na sua presença concomitante. Foi observado que *X. perforans* apresenta vantagem competitiva sobre *X. euvesicatoria*, tornando-se dessa forma a espécie prevalecente na Flórida (Jones *et al.*, 1998). Porém, como *X. perforans* e *X. gardneri* são as espécies mais recentemente alocadas dentro do complexo bacteriano causador da doença, há poucos estudos epidemiológicos sobre elas. A adaptabilidade intrínseca dessas duas espécies em resposta ao efeito combinado de temperatura e molhamento foliar não foi avaliada em estudo realizado com isolados brasileiros (Araújo *et al.* 2011). Dessa forma, é interessante avaliar como essas duas espécies reagem aos fatores ambientais e suas consequentes respostas no desenvolvimento da doença.

A identificação rápida, precisa e eficiente, por meio de técnicas moleculares, das diferentes espécies de *Xanthomonas* que ocasionam a mancha-bacteriana, bem como a de populações epifíticas em plantas de tomate ou sementes, pode se tornar uma eficiente metodologia para o entendimento de aspectos epidemiológicos da doença e para auxílio de trabalhos quarentenários, no intuito de evitar a disseminação do(s) patógeno(s) para áreas livres dos mesmos.

Considerando o exposto, as hipóteses testadas neste estudo foram as seguintes:

- É possível distinguir as diferentes espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha-bacteriana do tomateiro por meio da técnica de PCR com iniciadores específicos;

- No Brasil, no complexo da mancha-bacteriana do tomateiro, *Xanthomonas perforans* é a espécie predominante nas lavouras;
- Há diferenças de adaptabilidade entre *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri* sob diferentes regimes de temperatura e molhamento foliar;
- Populações epifíticas de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha-bacteriana ocorrem no filoplano de mudas assintomáticas de tomateiros produzidas em viveiros comerciais e em sementes comercializadas no país.

Objetivos

Objetivo Geral: Estabelecer protocolos de detecção do complexo de *Xanthomonas* causador da mancha-bacteriana do tomateiro e aprimorar o conhecimento de aspectos epidemiológicos envolvidos na ocorrência da doença.

Objetivos Específicos:

- Identificar a espécie predominante, entre aquelas causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro, em lavouras brasileiras, por meio dos dados de perfis genômicos gerados por BOX-PCR e iniciadores específicos;
- Desenvolver protocolo de PCR *multiplex* para rápida e eficiente detecção do complexo causador da mancha-bacteriana.
- Determinar e comparar possíveis diferenças na severidade da doença ocasionada pelas espécies *X. perforans* e *X. gardneri* sob diferentes temperaturas e molhamentos foliares;
- Determinar o efeito *in vitro* da temperatura na taxa de crescimento populacional de *X. perforans* e *X. gardneri*;
- Detectar populações epifíticas de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha-bacteriana e realizar levantamento da ocorrência de populações bacterianas em mudas assintomáticas e sementes de variedades comerciais.

Referências

- Araújo, E.R., Ferreira, M.A.S.V., Quezado-Duval, A.M. 2013. Specific primers for *Xanthomonas vesicatoria*, a tomato bacterial spot causal agente. *European Journal of Plant Pathology* 137:5-9.
- Araújo, E.R., Pereira, R.C., Ferreira, M.A.S.V., Café-Filho, A.C., Moita, A.W., Quezado-Duval, A.M. 2011. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. *Acta Horticulturae* 914:39-42.
- Araújo, E.R., Pereira, R.C., Ferreira, M.A.S.V., Quezado-Duval, A.M., Café-Filho, A.C. 2012. Sensitivity of xanthomonads causing tomato bacterial spot to copper and streptomycin and in vivo infra-specific competitive ability in *Xanthomonas perforans* resistant and sensitive to copper. *Journal of Plant Pathology* 94:79-87.
- Beran, P., Mráz, I. 2013. Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. *Crop Protection* 43:213-215.
- Bouzar, H., Jones, J.B., Stall, R.E., Louws, F.J., Schneider, M., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J., Jackson, L.E. 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.
- Bull, C.T., De Boer, S.H., Denny, T.P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G.S., Scortichini, M., Stead, D.E., Takikawa, Y. 2010. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. *Journal of Plant Pathology* 92:551-592.
- Burkholder, W.H., LI, C.C. 1941. Variation in *Phytomonas vesicatoria*. *Phytopathology* 31:753-755.
- Deley, J. 1979. Modern molecular methods in bacterial taxonomy: evaluation, application, prospects. In: *International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, 4, Angers. *Proceedings ... Angers*. 347-357.
- Dye, D.W. 1966. Cultural and biochemical reaction of additional *Xanthomonas* species. *New Zealand Journal of Science* 9:913-919.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>>. Acesso em 10/01/2014.

- Gardner, M.W., Kendrick, J.B. 1921. Bacterial spot of tomato. *Journal of Agricultural Research* 21:123–156.
- Goode, M.J., Sasser, M. 1980. Prevention - the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. *Plant Disease* 64:831-834.
- Hamza, A.A., Robène-Soustrade, I., Boyer, C., Laurent, A., Jouen, E., Wicker, E., Prior, P., Pruvost, O., Dottin, M. 2010. A new type of strain of *Xanthomonas euvesicatoria* causing bacterial spot of tomato and pepper in Grenada. *Plant Disease* 94:1264.
- Hildebrand, D.C., Palleroni, N.J., Schroth, M.N. 1990. Deoxyribonucleic acid relatedness of 24 xanthomonads strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*. *Journal of Applied Bacteriology* 8:263-269.
- Huang, C.-H., Vallad, G.E., Zhang, S., Wen, A., Balogh, B., Figueiredo, J.F.L., Behlau, F., Jones, J.B., Momol, M.T., Olson, S.M. 2012. Effect of application frequency and reduced rates of acibenzolar-S-methyl on the field efficacy of induced resistance against bacterial spot on tomato. *Plant Disease* 96:221-227.
- IBGE. 2013. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro, outubro 26:1-80.
- Jones, J.B., Bouzar, H., Somodi, G.C., Stall, R.E., Pernezny, K., El-Morsy, G., Scott, J.W. 1998. Evidence for the preemptive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. *Phytopathology* 88:33-38.
- Jones, J.B., Bouzar, H., Stall, R.E., Almira, E.C., Roberts, P.D., Bowen, B.W., Sudberry, J., Strickler, P.M., Chun, J. 2000. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic Bacteriology* 50:1211-1219.
- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., Zitter, T.A. 1991. *Compendium of tomato diseases*. St Paul: APS Press. 73 p.
- Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., Schaad, N.W. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27:755-762.

Jones, J.B., Stall, R.E. 1998. Diversity among xanthomonads pathogenics on pepper and tomato. Annual Review of Phytopathology 36:41-58

Koenraadt, H., van Betteray, B., Germain, R., Hiddink, G., Jones, J.B., 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.

Kousik, C.S., Ritchie, D.F. 1998. Response of bell pepper cultivars to bacterial spot pathogen races that individually overcome major resistance genes. Plant Disease 82: 181-186.

Kurozawa, C., Pavan, M.A. 1997. Doenças do Tomateiro. In: Hiroshi Kimati *et al.* Manual de Fitopatologia. Vol. II. São Paulo:Ceres:614-615.

Lopes, C.A., Quezado-Duval, A.M. 2005. Doenças bacterianas. In: Lopes, C.A., Ávila, A.C. Doenças do Tomateiro. Brasília: EMBRAPA-CNPq, p.62-64.

Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., de Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology 85:528–536.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT. Disponível em <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 10/01/2014.

Mbega, E.R., Mabagala, R.B., Adriko, J., Lund, O.S., Wulff, E.G., Mortensen, C.N. 2012a. Five species of xanthomonads associated with bacterial leaf spot symptoms in tomato from Tanzania. Plant Disease 96:760.

Mbega, E.R., Wulff, E.G., Mabagala, R.B., Adriko, J., Lund, O.S., Mortensen, C.N. 2012b. Xanthomonads and other yellow-pigmented *Xanthomonas*-like bacteria associated with tomato seeds in Tanzania. African Journal of Biotechnology 11:14303-14312.

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

Pereira, R.C., Araújo, E.R., Ferreira, M.A.S.V., Quezado-Duval, A.M. 2011. Occurrence of *Xanthomonas* species causing bacterial spot in fresh market tomato fields in Brazil. *Acta Horticulturae* 914:61–64.

Pontes, N.C. 2012. Mancha-bacteriana em tomate industrial: métodos de inoculação, quantificação da doença e otimização do controle com acibenzolar-S-metil. Universidade Federal de Viçosa, Tese de Doutorado, 86p.

Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N.F., Patil, P.B., Ryan, R.P., Sharlach, M., Behlau, F., Dow, J.M., Momol, M.T., White, F.F., Preston, J.F., Vinatzer, B.A., Koebnik, R., Setubal, J.C., Norman, D.J., Staskawicz, B.J., Jones, J.B. 2011. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics* 12:146.

Quezado-Duval, A.M., Gazzoto Filho, A., Leite Júnior, R.P., Camargo, L.E.A. 2003. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira* 21: 670-675.

Quezado-Duval, A.M., Lopes, C.A. 2010. Mancha-bacteriana: Uma Atualização Para o Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. 28p. Brasília: Embrapa Hortaliças, (Circular Técnica 84).

Quezado-Duval, A.M., Lopes, C.A., Leite Junior, R.P., Lima, M.F., Camargo, L.E.A. 2005. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. *Acta Horticulturae* 695:101-108.

Robbs, C.F.A. 1953. “Mancha-bacteriana” do pimentão (*Capsicum annuum* L.). *Agricultura e Pecuária*. Rio de Janeiro. Editora Terra. p. 25-32.

Sherbakoff, C.D. 1918. Report of the associate plant pathologist. Florida Agriculture Experiment Station Report 1916-1917:66R-86R.

Stall, R.E., Jones, J.B., Minsavage, G.V. 2009. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. *Annual Review of Phytopathology* 47:265-284.

Sutic, D. 1957. Bakterioze crvenog patlidzana (tomato bacteriosis). Posebna Izd. Inst. Zasht. Bilja Beograd (Spec. Edit. Inst. Plant Prot. Beograd) 6:1–65. English summary: *Review of Applied Mycology* 36:734–35.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology 45:472-489.

Vauterin, L., Rademaker, J., Swings, J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genera *Xanthomonas*. Phytopathology 90:677-682.

Vicente, J.G., Everett, B., Roberts, S.J. 2006. Identification of isolates that cause a leaf spot disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. Phytopathology 96:735-745.

Young, J.M., Park, D.C., Shearman, H.M., Fargier, E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. Systematic and Applied Microbiology 31:366–377.

CAPÍTULO 1

Prevalência, distribuição e caracterização de *Xanthomonas perforans*, principal agente causal da mancha-bacteriana do tomateiro no Brasil

Prevalência, distribuição e caracterização de *Xanthomonas perforans*, principal agente causal da mancha-bacteriana do tomateiro no Brasil

Resumo

A mancha-bacteriana do tomateiro pode ser causada por até quatro espécies do gênero *Xanthomonas*: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*. Com o objetivo de determinar a distribuição, frequência de ocorrência e diversidade dessas espécies em campos brasileiros de produção comercial de tomate, de ambos os segmentos, mesa e processamento industrial, realizou-se levantamento durante os anos de 2009-2012. Nesse período obteve-se 204 isolados provenientes de sete unidades da Federação. Para a identificação das espécies e raças dos isolados foram realizados testes de patogenicidade, BOX-PCR, uso de iniciadores específicos, além de análise de sequenciamento do gene de avirulência *avrXv3*. Do total de isolados, 188 (92%) foram identificados como *X. perforans*, sendo a espécie predominante no país [1]. Quinze isolados foram identificados como *X. gardneri* e um isolado como *X. euvesicatoria*. Dentro da espécie *X. perforans*, foi observada elevada diversidade com base nos iniciadores BOX (136 haplótipos). A raça predominante de *X. perforans* foi T3 (97,5%). Adicionalmente, este trabalho traz o primeiro registro da raça T4 no Brasil, resultante da presença de uma inserção de 858 pb dentro do gene *avrXv3*, relacionada à família de proteínas YscJ/HrcJ.

Palavras-chave: BOX-PCR; diversidade; *Solanum lycopersicum*; raça T3; raça T4

Prevalence, distribution and characterization of *Xanthomonas perforans*, the main causal agent of tomato bacterial spot in Brazil

Abstract

Tomato bacterial spot can be caused by up to four species of the genus *Xanthomonas*: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* and *X. gardneri*. In order to determine the distribution, frequency of occurrence, and diversity of these species in Brazilian tomato commercial fields, both for fresh-market and processing tomatoes, we carried out a survey during the years 2009-2012. During this period we obtained 204 isolates from seven states. For the identification of their species and races, pathogenicity tests, BOX-PCR, using species-specific primers were performed, and sequencing analysis of the avirulence gene *avrXv3*. In total of isolates, 188 (92%) were identified as *X. perforans*, which is the predominant species in the country. Fifteen isolates were *X. gardneri* and one isolate was identified as *X. euvesicatoria*. Within the species *X. perforans* had high diversity based on BOX primers (136 haplotypes). The predominant race of *X. perforans* was T3 (97.5%). However, here we report for the first time the race T4 in Brazil, São Paulo state, resulting from the presence an 858 bp insertion within the avirulence gene *avrXv3*. This insertion is related to family of proteins YscJ/HrcJ.

Keywords: BOX-PCR; diversity; *Solanum lycopersicum*, race T3; race T4

Introdução

Sabe-se, atualmente, que diversas doenças de plantas são causadas por um complexo de agentes patogênicos e não por uma única espécie (Bottalico, 1998; Moriones e Navas-Castillo, 2000; Castillo e Greenberg, 2007). Este também é o caso da mancha-bacteriana do tomateiro, doença que pode ser causada por até quatro espécies do gênero *Xanthomonas*, a saber, *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (Jones *et al.* 2004).

A doença ocorre mundialmente e pode atacar toda a parte aérea da planta (Jones *et al.* 1991). As perdas decorrem das manchas necróticas nos frutos, reduzindo seu valor comercial e da redução na capacidade fotossintética da planta devido à queima das folhas, o que também expõe os frutos diretamente ao sol (Quezado-Duval e Lopes, 2010).

Xanthomonas perforans foi a última espécie a ser alocada dentro do complexo causador da mancha-bacteriana. Primeiramente tratada como uma raça de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Jones *et al.* 1995), foi elevada ao taxon espécie devido à sua distinção fenotípica e genotípica em relação às demais espécies (Jones *et al.* 2004). Estudos mais recentes sobre esse patossistema tem demonstrado que esta espécie ocorre mundialmente (Myung *et al.* 2009; Hamza *et al.* 2010; Ma *et al.* 2011; Kizheva *et al.* 2013). No Brasil, levantamentos anteriores identificaram a ocorrência das quatro espécies tanto em lavouras de tomate para *consumo in natura* (Pereira *et al.* 2011) quanto para aquelas destinadas ao processamento industrial (Quezado-Duval *et al.* 2005).

O complexo bacteriano associado à mancha-bacteriana do tomateiro apresenta ainda uma subdivisão em raças, demonstrando a diversidade do grupo. Desta forma, de acordo com a reação de hipersensibilidade aos genótipos diferenciadores de tomateiro, *X. euvesicatoria* corresponde a apenas uma raça (T1), *X. vesicatoria* e *X. gardneri* também correspondem à uma única raça, T2 para ambas. Por sua vez, *X. perforans* é classificada infraespecificamente em duas raças: T3 e T4 (Stall *et al.* 2009). A hipotética raça T5 de *X. perforans*, mencionada por Jones *et al.* (2005), ainda não foi confirmada em nenhum estudo publicado até o presente momento.

Diante desse quadro de doenças com etiologia complexa, o conhecimento da prevalência e distribuição de uma espécie e/ou raça de um complexo causador de doenças de plantas é fundamental para o estabelecimento de estratégias de controle.

Para a identificação de fitobactérias, diferentes técnicas podem ser utilizadas. A caracterização patogênica, bioquímica, sorológica e, com maior frequência, técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase – *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

(Park *et al.* 2006; Beran e Mráz, 2013) são utilizadas para a determinação de espécies. Dentre as técnicas moleculares, marcadores tipo rep-PCR (Lema *et al.* 2012) e iniciadores específicos (Kizheva *et al.* 2013) são comumente usados para caracterização de coleções de fitobactérias em nível específico e infra-específico. Koenrardt *et al.* (2009), baseando-se nos perfis genômicos gerados por marcadores tipo AFLP, desenharam iniciadores específicos para as quatro espécies causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro. Além destes, os iniciadores RST 88/89 (Astua-Monge *et al.* 2000) são capazes de identificar indiretamente *X. perforans* pela amplificação parcial do gene *avrXv3*, presente apenas nesta espécie. Da mesma forma, os iniciadores RST 27/28 (Bouzar *et al.* 1994) identificam indiretamente *X. euvesicatoria*, amplificando o gene *avrRxv*, característico da espécie. Marcadores tipo BOX são bastante eficientes para identificação de isolados pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, mostrando-se mais robustos que REP e ERIC-PCR para caracterização deste gênero (Rademaker *et al.* 2000). Desta forma, a técnica de BOX-PCR tem sido utilizada para caracterização e identificação dos agentes fitopatogênicos deste complexo (Bouzar *et al.* 1999; Costa *et al.* 2012).

Considerando o exposto acima, o objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento da ocorrência e prevalência das espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha-bacteriana em lavouras de tomate para mesa e indústria no Brasil, entre os anos de 2009-12, através da identificação dos isolados e caracterização da diversidade em nível infraespecífico.

Material e Métodos

Obtenção dos isolados e coleção de trabalho

Amostras de folhas e frutos de tomate com sintomas de lesões necróticas foram coletadas em seis estados brasileiros (Bahia, Goiás, Espírito Santo, Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo) e no Distrito Federal, durante os anos de 2009 a 2012. Segundo dados do IBGE (2013), essas Unidades da Federação são responsáveis por 79,1% da produção brasileira de tomate.

O isolamento das bactérias ocorreu em meio ágar nutriente – AN (Schaad *et al.* 2001). Após observação de colônias amarelas típicas do gênero *Xanthomonas* (4 a 5 dias após o isolamento), transferiu-se colônias puras e isoladas para novas placas do mesmo meio de cultura. Dois dias após, procedeu-se a preservação dos isolados em tampão fosfato (8,5 mmol l⁻¹ K₂HPO₄; 7,5 mmol l⁻¹ KH₂PO₄, pH 7,0) sob temperatura ambiente e/ou caldo nutriente com 30% de glicerol a – 80°C.

No total, foram obtidos 204 isolados, dos quais, 41 são provenientes de 11 municípios que produzem tomate para mesa e 163 são oriundos de 21 municípios que produzem tomate para processamento industrial (Tabela 1). Esses isolados estão mantidos na coleção de trabalho de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brasil.

Os isolados de referência: *X. euvesicatoria*, IBSBF 2363 (Instituto Biológico de Campinas, São Paulo = Xvp197, originário dos Estado Unidos); *X. vesicatoria*, IBSBF 2364 (Instituto Biológico de Campinas, São Paulo = XV1111, originário da Nova Zelândia); *X. perforans*, IBSBF 2370 (Instituto Biológico de Campinas, São Paulo = ATCC BAA-983, originário dos Estados Unidos); e *X. gardneri*, IBSBF 2373 (Instituto Biológico de Campinas, São Paulo = XCGA2, originário da Iugoslávia) foram utilizados como controles nos testes moleculares.

Extração de DNA e iniciadores específicos

O DNA dos isolados foi extraído de acordo com protocolo de Mahuku (2004) e/ou Wilson (1999) e foi quantificado visualmente, por eletroforese em gel de agarose (1,5%), comparativamente utilizando o marcador DNA High Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA). Em seguida, as amostras foram diluídas para aproximadamente 50 ng μl^{-1} e armazenadas a -20°C até o momento de sua utilização.

Para a identificação das espécies, primeiramente foram utilizados os iniciadores específicos desenhados por Koenraadt *et al.* (2009) e validados para as quatro espécies por Araújo *et al.* (2012): para *Xanthomonas euvesicatoria* os iniciadores são BS-XeF (5'-CATGAAGAAGCTCGGCGTATCG-3') e BS-XeR (5' GTCGGACATAGTGGACACATAC-3'), amplificando um fragmento de DNA de 173 pb; para *X. vesicatoria* são BS-XvF (5'-CCATGTGCCGTTGAAATACTTG-3') e BS-XvR (5'ACAAGAGATGTTGCTATGATTTG C-3'), amplificando um fragmento de 138 pb; para *X. perforans* são BS-XpF (5' GTCGTGTTGATGGAGCGTTC-3') e BS-XpR (5'-GTGCGAGTCAATTATCAGAATGTG G-3') amplificando um fragmento de 197 pb; e para *X. gardneri* são BS-XgF (5'-TCAGTGCTTAGTTCCTCATTGTC-3') e BS-XgR (5'-TGACCGATAAAGACTGCGAAA G-3'), amplificando um fragmento de 154 pb. A PCR foi realizada em termociclador (My Cycler, Bio-Rad) de acordo com o seguinte programa para todos os iniciadores: um ciclo de 94°C por 5 min para desnaturamento inicial, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s para desnaturamento, 66°C por 1 min para anelamento e 72°C por 1 min para extensão. Por fim, um

ciclo de 72°C por 7 min para extensão final. As reações continham 1,5 mmol l⁻¹ de MgCl₂; 0,2 mmol l⁻¹ de cada dNTP; 2 µmol l⁻¹ para todos os iniciadores utilizados; 1,26 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); aproximadamente 50 ng µl⁻¹ de DNA; e água Milli-Q[®] autoclavada para um volume final de 12 µl. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose (1,5%) após eletroforese em tampão TBE (0,05 mol l⁻¹ de Tris; 0,045 mol l⁻¹ de ácido bórico; 0,0005 mol l⁻¹ de EDTA) ou 0,5 X, conduzida a 100 V por 2 horas, e registrados em fotodocumentador L-PIX ST (Loccus Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil). Para cada isolado, cada reação foi repetida pelo menos duas vezes.

Tabela 1. Código, ano de isolamento, procedência, segmento, identificação molecular e determinação da raça de 204 isolados de *Xanthomonas* causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro.

Isolados	Ano de isolamento	Procedência	Segmento	Iniciadores específicos	Haplótipos BOX-PCR ^a	Raça ^b	Espécies <i>Xanthomonas</i>
EH 2009-11	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	7G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-19	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	5H	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-104	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	7F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-105	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	7E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-106	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	7E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-107	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	7I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-109	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	7J	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-110	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	7D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-111	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	2D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-112	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	5G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-114	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	5J	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-115	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	1J	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-118	2009	Guaíra - SP	Indústria	+	4A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-122	2009	Guaíra - SP	Indústria	+	1F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-125	2009	Cafelândia - SP	Indústria	+	9G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-130	2009	Cafelândia - SP	Indústria	+	único	T1	<i>X. euvesicatoria</i>
EH 2009-133	2009	Cafelândia - SP	Indústria	+	9F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-134	2009	Cafelândia - SP	Indústria	+	9F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-135	2009	Cafelândia - SP	Indústria	+	9G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-136	2009	Cafelândia - SP	Indústria	+	9F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-137	2009	Cafelândia - SP	Indústria	+	11C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-140	2009	Borborema - SP	Indústria	+	11A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-141	2009	Borborema - SP	Indústria	+	11A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-144	2009	Potirendaba - SP	Indústria	+	1G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-148	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	9D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-149	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	9M	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-150	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	9A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-151	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	9N	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-152	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	9A	T3	<i>X. perforans</i>

EH 2009-156	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	9B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-157	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	3A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-158	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	3A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-159	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	3D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-162	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	3D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-165	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	3B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-166	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	8A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-168	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	8D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-171	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	8D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-187	2009	Vicentinópolis - GO	Indústria	+	7A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-188	2009	Rio Verde - GO	Indústria	+	6C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-190	2009	Rio Verde - GO	Indústria	+	1O	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-192	2009	Rio Verde - GO	Indústria	+	1N	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-201	2009	Rio Verde - GO	Indústria	+	11B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-210	2009	Montividiu - GO	Indústria	+	11D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-212	2009	Montividiu - GO	Indústria	+	11D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-214	2009	Montividiu - GO	Indústria	+	11E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-225	2009	Montividiu - GO	Indústria	+	5M	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-226	2009	Montividiu - GO	Indústria	+	5K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-229	2009	Montividiu - GO	Indústria	+	5L	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-233	2009	Montividiu - GO	Indústria	+	9L	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-236	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	12K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-237	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	5I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-238	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	5I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-241	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	5K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-242	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	5Q	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-243	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	5R	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-244	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	7H	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-245	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	5I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-250	2009	Morrinhos - GO	Indústria	+	9K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-256	2009	Gameleira de Goiás - GO	Indústria	+	9J	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-257	2009	Gameleira de Goiás - GO	Indústria	+	9J	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-274	2009	Gameleira de Goiás - GO	Indústria	+	7B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-275	2009	Gameleira de Goiás - GO	Indústria	+	5I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-277	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	5N	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-278	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	5P	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-281	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	5I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-282	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	5O	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-283	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	5O	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-286	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	3G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-287	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	3G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-288	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	3G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-289	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	3G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-290	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	3G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-292	2009	Itaberaí - GO	Indústria	+	3E	T3	<i>X. perforans</i>

EH 2009-300	2009	Goiânia - GO	Indústria	+	3C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-311	2009	Jaíba - MG	Indústria	+	3H	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-312	2009	Jaíba - MG	Indústria	+	10E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-313	2009	Jaíba - MG	Indústria	+	4B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-315	2009	Jaíba - MG	Indústria	+	3F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-316	2009	Jaíba - MG	Indústria	+	3F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-318	2009	Jaíba - MG	Indústria	+	5M	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2009-319	2009	Jaíba - MG	Indústria	+	3K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-02	2010	Lebon Régis - SC	Mesa	+	IC	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2010-06	2010	Lebon Régis - SC	Mesa	+	ID	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2010-10	2010	Lebon Régis - SC	Mesa	+	IE	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2010-60	2010	Caçador - SC	Mesa	+	1H	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-61	2010	Caçador - SC	Mesa	+	1I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-62	2010	Caçador - SC	Mesa	+	IID	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2010-64	2010	Caçador - SC	Mesa	+	IIA	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2010-65	2010	Caçador - SC	Mesa	+	IIA	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2010-67	2010	Caçador - SC	Mesa	+	IIB	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2010-68	2010	Caçador - SC	Mesa	+	IIA	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2010-70	2010	Caçador - SC	Mesa	+	IIC	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2010-72	2010	Caçador - SC	Mesa	+	IIC	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2010-73	2010	Caçador - SC	Mesa	+	IIC	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2010-74	2010	Caçador - SC	Mesa	+	IIC	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2010-82	2010	Lagoa Grande - MG	Indústria	+	12D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-84	2010	Lagoa Grande - MG	Indústria	+	12C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-85	2010	Lagoa Grande - MG	Indústria	+	12B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-86	2010	Lagoa Grande - MG	Indústria	+	12B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-87	2010	Paracatu - MG	Indústria	+	12A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-88	2010	Paracatu - MG	Indústria	+	12A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-89	2010	Paracatu - MG	Indústria	+	12A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-92	2010	Paracatu - MG	Indústria	+	10M	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-93	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	10G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-94	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	10F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-96	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	10L	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-109	2010	Brazabranes - GO	Indústria	+	10K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-127	2010	Anápolis - GO	Indústria	+	10I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-128	2010	Anápolis - GO	Indústria	+	10J	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-129	2010	Anápolis - GO	Indústria	+	4E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-130	2010	Anápolis - GO	Indústria	+	2H	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-133	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	2I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-134	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	2J	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-135	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	1K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-136	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	1L	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-137	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	1M	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-140	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	1N	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-141	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	1P	T3	<i>X. perforans</i>

EH 2010-150	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	8K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-152	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	2G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-153	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	10F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-156	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	4C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-158	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	4D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-160	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	10H	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2010-161	2010	Morrinhos - GO	Indústria	+	5B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-08	2011	Irecê - BA	Mesa	+	2F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-09	2011	Irecê - BA	Mesa	+	2E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-10	2011	Irecê - BA	Mesa	+	2E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-21	2011	Jaguaquara - BA	Mesa	+	2A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-22	2011	Jaguaquara - BA	Mesa	+	4F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-23	2011	Jaguaquara - BA	Mesa	+	2C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-24	2011	Jaguaquara - BA	Mesa	+	2B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-25	2011	Jaguaquara - BA	Mesa	+	3I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-26	2011	Jaguaquara - BA	Mesa	+	3J	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-27	2011	Jaguaquara - BA	Mesa	+	3I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-32	2011	Núcleo Rural São José - DF	Mesa	+	6B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-37	2011	Alto Caxixe - ES	Mesa	+	IA	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2011-47	2011	Santa Cruz de Goiás - GO	Indústria	+	2K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-48	2011	Santa Cruz de Goiás - GO	Indústria	+	2J	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-49	2011	Santa Cruz de Goiás - GO	Indústria	+	2K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-50	2011	Santa Cruz de Goiás - GO	Indústria	+	2K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-51	2011	Santa Cruz de Goiás - GO	Indústria	+	2N	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-52	2011	Santa Cruz de Goiás - GO	Indústria	+	13B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-53	2011	Santa Cruz de Goiás - GO	Indústria	+	7C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-56	2011	Luziânia - GO	Indústria	+	IIB	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2011-67	2011	Capão Bonito - SP	Mesa	+	IB	T2	<i>X. gardneri</i>
EH 2011-71	2011	Capão Bonito - SP	Mesa	+	12E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-82	2011	Mogi Guaçu - SP	Mesa	+	12E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-84	2011	Mogi Guaçu - SP	Mesa	+	12E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-85	2011	Mogi Guaçu - SP	Mesa	+	12E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-103	2011	Sumaré - SP	Mesa	+	5C	T4	<i>X. perforans</i>
EH 2011-105	2011	Sumaré - SP	Mesa	+	6A	T4	<i>X. perforans</i>
EH 2011-107	2011	Sumaré - SP	Mesa	+	6D	T4	<i>X. perforans</i>
EH 2011-120	2011	Planaltina - DF	Mesa	+	9C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-121	2011	Sumaré - SP	Mesa	+	9E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-125	2011	Conchal - SP	Mesa	+	9I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-129	2011	Sumaré - SP	Mesa	+	9C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-130	2011	Sumaré - SP	Mesa	+	9H	T4	<i>X. perforans</i>
EH 2011-132	2011	Sumaré - SP	Mesa	+	9H	T4	<i>X. perforans</i>
EH 2011-133	2011	Sumaré - SP	Mesa	+	10A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-135	2011	Itaberaí - GO	Indústria	+	10C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-136	2011	Itaberaí - GO	Indústria	+	10C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-137	2011	Itaberaí - GO	Indústria	+	10D	T3	<i>X. perforans</i>

EH 2011-138	2011	Itaberaí - GO	Indústria	+	10B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-139	2011	Itaberaí - GO	Indústria	+	9O	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-140	2011	PAD - DF	Indústria	+	13C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-142	2011	Morrinhos - GO	Indústria	+	5A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-145	2011	PAD - DF	Indústria	+	13C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-149	2011	PAD - DF	Indústria	+	13A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-150	2011	Morrinhos - GO	Indústria	+	5A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-151	2011	Morrinhos - GO	Indústria	+	13C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-152	2011	Itaberaí - GO	Indústria	+	13D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-156	2011	Itaberaí - GO	Indústria	+	9P	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-157	2011	Itaberaí - GO	Indústria	+	8E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-158	2011	Itaberaí - GO	Indústria	+	5D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-159	2011	Itaberaí - GO	Indústria	+	8F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2011-160	2011	Itaberaí - GO	Indústria	+	5E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-01	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	1E	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-02	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	1D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-03	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	1D	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-04	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	1C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-05	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	1A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-06	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	2L	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-07	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	1C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-08	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	1A	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-09	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	1B	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-10	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	2Q	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-11	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	2O	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-12	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	2P	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-13	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	2M	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-15	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	8K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-16	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	5F	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-17	2012	Firminópolis - GO	Indústria	+	8G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-18	2012	Firminópolis - GO	Indústria	+	8G	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-19	2012	Indiara - GO	Indústria	+	2P	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-20	2012	Indiara - GO	Indústria	+	2Q	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-21	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	8K	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-22	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	8I	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-23	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	8J	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-24	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	2C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-25	2012	Morrinhos - GO	Indústria	+	8H	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-26	2012	Joviânia - GO	Indústria	+	8C	T3	<i>X. perforans</i>
EH 2012-28	2012	Joviânia - GO	Indústria	+	8B	T3	<i>X. perforans</i>

^a Isolados que apresentam mesmo número e letra são considerados idênticos. Isolados idênticos de *X. perforans* apresentam valor de similaridade igual ou maior que 86,3%. Isolados idênticos de *X. gardneri* apresentam valor de similaridade igual ou maior que 89,9%. Valores definidos pelo programa GelCompar II versão 6.5 (Applied Maths, EUA).

^b Raças identificadas pela reação em genótipos diferenciadores e/ou utilização dos iniciadores específicos para o genes de avirulência *avrRxv* de *X. euvesicatoria* e *avrXv3* de *X. perforans*.

BOX-PCR e definição de haplótipos

Para as reações de BOX-PCR utilizou-se iniciador BOX 1AR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') correspondente à sequência repetitiva BOX (Versalovic *et al.*, 1991). A reação foi composta de: 1,5 mmol l⁻¹ de MgCl₂; 0,2 mmol l⁻¹ de cada dNTP; 2 μmol l⁻¹ do iniciador; 1,26 U de *Taq* DNA polimerase; aproximadamente 50 ng μl⁻¹ de DNA; e água Milli-Q[®] autoclavada para um volume final de 12 μL. A amplificação dos fragmentos de DNA ocorreu em termociclador My Cycler[™] (BIO RAD). O programa utilizado para amplificação foi 95°C por 7 minutos, seguido de 30 ciclos de: 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 53°C por 1 minuto 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 (1,5%) em tampão TBE 0,5X, por eletroforese conduzida a 100 V durante 3 horas.

Para cada isolado, a PCR foi realizada por três vezes. Desta forma, para definir os haplótipos, comparou-se os perfis genômicos de um mesmo isolado por meio do programa GelCompar II versão 6.5 (Applied Maths, EUA), utilizando-se o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages). Observando-se a similaridade existente entre os três perfis genômicos de um mesmo isolado, definiu-se um valor mínimo de similaridade que poderia ser utilizado como limiar para definição dos haplótipos, uma vez que as variações nos valores de similaridade de um mesmo isolado representariam os possíveis erros inerentes à própria técnica e ao programa utilizado para a análise dos géis. A partir desses valores, foram realizadas análises de frequências independentes, segundo regra de Sturges, para *X. perforans* e *X. gardneri*, com o intuito de identificar os valores de similaridade onde a maioria (mais que 50%) dos isolados se agrupavam.

Testes de patogenicidade e identificação das raças

Suspensões bacterianas foram preparadas em sulfato de magnésio (10 mmol l⁻¹) a partir de colônias puras crescidas em meio AN. A concentração das suspensões foi ajustada com auxílio de espectrofotômetro (OD₆₀₀ = 0.3) para aproximadamente 5 × 10⁸ UFC ml⁻¹ (Jones *et al.* 2000). Plantas de tomate da variedade BonnyBest (1 planta por isolado) foram borrifadas homogeneamente com as suspensões até o ponto de escorrimento foliar. Em seguida, as plantas foram mantidas em câmara úmida (cobertura com sacos plásticos umedecidos) por um período de 48 horas. Sete a dez dias depois, foi verificado o resultado das inoculações.

Os genótipos diferenciadores utilizados para determinação das raças foram: Bonny Best; Hawaii 7998; CNPH 1500 e CNPH 1255 = Hawaii 7981; CNPH 409 = LA716. As reações que determinam as diferentes raças estão ilustradas na Tabela 2. Para os testes com os genótipos diferenciadores, suspensões bacterianas foram preparadas da mesma forma citada acima. A infiltração das suspensões na parte abaxial das folhas foi realizada com auxílio de uma seringa hipodérmica sem agulha. Vinte e quatro horas após a infiltração observou-se as reações apresentadas pelos diferentes genótipos.

Tabela 2. Identificação de raças de *Xanthomonas* a partir da reação de resistência ou suscetibilidade de genótipos diferenciadores de tomateiro.

S = suscetibilidade

RH = reação de hipersensibilidade

- = genes não encontrados

Espécies	Raças (genes de avirulência)	Genótipos de tomateiro (genes de resistência)			
		Bonny Best (-)	Hawaii 7998 (<i>rx1</i> ; <i>rx2</i> ; <i>rx3</i>)	Hawaii 7981 (<i>Xv3</i>)	LA716 (<i>Xv4</i>)
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	T1 (<i>avrRxv</i>)	S	RH	S	S
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	T2 (ainda não caracterizado)	S	S	S	S
<i>Xanthomonas perforans</i>	T3 (<i>avrXv3</i> ; <i>avrXv4</i>)	S	S	RH	RH
	T4 (<i>avrXv3</i> ; <i>avrXv4</i>)	S	S	S	RH
<i>Xanthomonas gardneri</i>	T2 (ainda não caracterizado)	S	S	S	S

Complementarmente aos testes com genótipos diferenciadores, iniciadores específicos foram utilizados para confirmação da presença dos genes de avirulência *avrRxv* e *avrXv3* das espécies *X. euvesicatoria* e *X. perforans*, respectivamente, que são as duas espécies com genes de avirulência já caracterizados. Para amplificação dos gene *avrRxv* foram utilizados os iniciadores RST 27 (5'-AGTCGCGCGGACATTTAGCCCCGCC-3') e RST 28 (5'-CGTCGATGGTGCGCCTGGAATGCGC-3'), desenvolvidos por Bouzar *et al.* (1994). A reação foi composta por 1,5 mmol l⁻¹ de MgCl₂, 0,1 mmol l⁻¹ de cada DNTP, 1 μmol l⁻¹ de cada iniciador, 0,025 U de *Taq* DNA polimerase, aproximadamente 50 ng μl⁻¹ de DNA e água Milli-Q autoclavada para um volume final de 25 μl. O programa utilizado no termociclador foi de: um ciclo de 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 95° por 30 segundos, 64°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos. Por fim, um ciclo de 72°C por 5 minutos. Para amplificação do gene *avrXv3*,

foram utilizados os iniciadores RST 88 (5'-CCGCTCGAGATGACAAGTAGTATCAATC-3') e RST 89 (5'-CCGCTCGAGCTACTTAACGAGATTTGTTAC-3'), desenvolvidos por Astua-Monge *et al.* (2000). A composição da reação foi semelhante a dos iniciadores RST27/28. O programa utilizado foi: um ciclo de 95°C por 30 segundos, um ciclo de 48°C por 30 segundos, um ciclo de 72°C por 1 minuto; seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Por fim, um ciclo de 72°C por 5 minutos. A eletroforese ocorreu como descrito para os iniciadores específicos.

Sequenciamento do gene *avrXv3*

Produtos de PCR de quatro isolados (EH 2011-105; EH 2011-107; EH 2011-130 e EH 2011-132), dos cinco que apresentaram tamanho de fragmento de DNA atípico com os iniciadores RST88/89, mais o isolado de referência IBSBF 2370, que apresentou tamanho de fragmento esperado, foram purificados com auxílio do “Purelink PCR purification kit” (Invitrogen) e enviados para sequenciamento na empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul). A montagem e edição das sequências foi realizada por meio do programa BioEdit (Hall, 1999). Já para os alinhamentos das mesmas, foi utilizado o programa MEGA 5.2 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*).

Resultados

Prevalência de *Xanthomonas perforans* no Brasil

Dos 204 isolados obtidos (Tabela 2), 188 foram identificados como *X. perforans* de acordo com os iniciadores específicos, presença do gene *avrXv3*, testes de patogenicidade, resposta nos genótipos diferenciadores e BOX-PCR. Isso corresponde a aproximadamente 92% do total de isolados. Nota-se também que, à exceção do estado do Espírito Santo, que só possui um isolado representante e originado de tomateiro para consumo *in natura*, *X. perforans* está distribuída em todos os estados de onde foram obtidas as amostras (Figura 1), independentemente do segmento produtivo. Dessa forma, fica caracterizada a prevalência dessa espécie sobre as demais.



Figura 1. Ocorrência das espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro em seis estados brasileiros e no Distrito Federal.

Por sua vez, foram identificados 15 isolados de *X. gardneri* (7,5% das amostras), sendo 14 originados do segmento mesa. Apenas um isolado (EH 2009-130), proveniente do estado de São Paulo, lavoura para indústria, foi identificado como *X. euvesicatoria* ($\approx 0,5\%$). Nenhum isolado foi identificado como *X. vesicatoria*.

***Xanthomonas perforans* apresenta uma alta diversidade genética baseada em BOX-PCR**

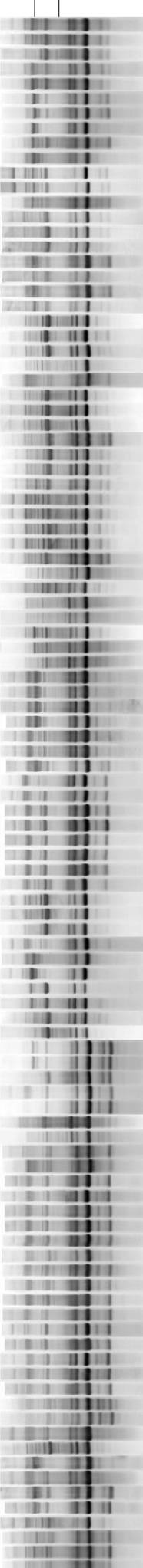
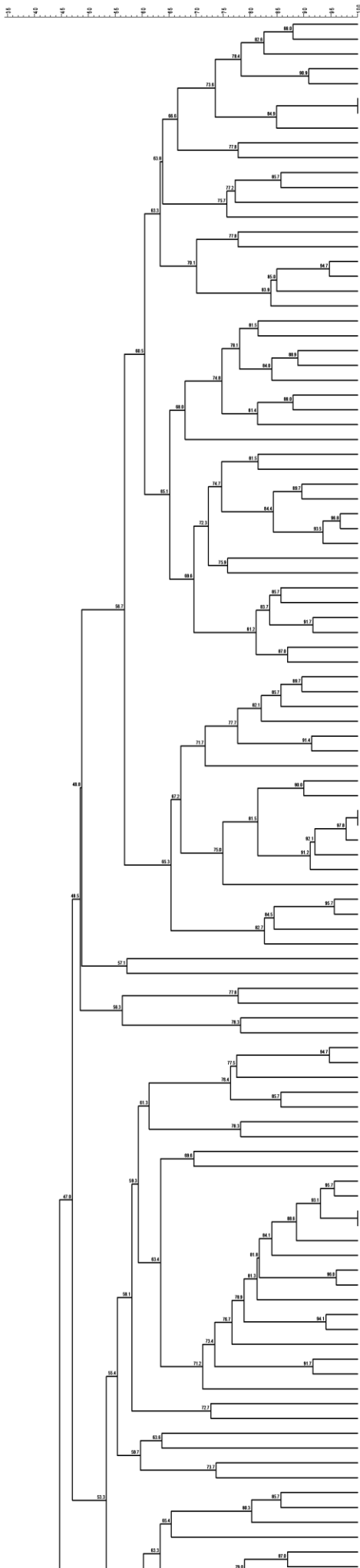
Quando foi realizada a análise de frequência de similaridade dos três perfis genômicos gerados por um mesmo isolado, foi possível definir nove intervalos de classes para *X. perforans*, com amplitude de 4,5. Mais de 50% dos isolados se agruparam a partir de 86,3% de similaridade, sendo este o valor utilizado no presente estudo para determinação de haplótipos dentro dessa espécie. Para *X. gardneri*, definiram-se cinco classes, com amplitude de 2,9. A maioria dos isolados desta espécie se concentrou a partir de 89,9% de similaridade, sendo este, por sua vez, o valor limítrofe para identificação de haplótipos.

No dendrograma construído com base nos perfis genômicos gerados por BOX-PCR, não foi possível separar claramente as espécies *X. perforans* e *X. euvesicatoria*. Utilizando os isolados de referência no dendrograma, as similaridades máximas que estes se posicionaram aos isolados brasileiros foram de 78,6% entre IBSBF 2363 para o único isolado de *X. euvesicatoria*; 61,1% entre IBSBF 2373 para os isolados de *X. gardneri*; e de 76,2% entre

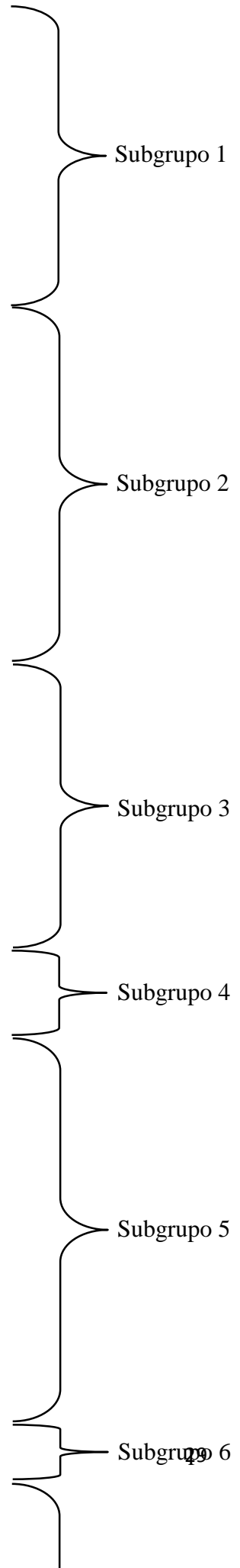
IBSBF 2370 para os isolados de *X. perforans*. O isolado de referência de *X. vesicatoria*, IBSBF 2364, foi o que se posicionou mais distante (38,8%) de todos os demais isolados do dendrograma.

Como *X. perforans* apresentou uma grande diversidade com base no marcador BOX-PCR, decidiu-se subdividir a espécie em 13 subgrupos dentro do dendrograma (Tabela 2; Figura 2), assim como realizado por Bouzar *et al.* (1999) quando eles constataram uma alta diversidade genética entre isolados do grupo A, atualmente *X. euvesicatoria*. Desta forma, foi realizada a identificação dos haplótipos, de acordo com os critérios pré-estabelecidos, dentro de cada subgrupo. Estes foram identificados pelo respectivo número do subgrupo e uma letra. Assim, para o subgrupo 1, foram identificados dezesseis haplótipos (1A – 1P); dentro do subgrupo 2 foram identificados 17 haplótipos (2A – 2Q), no subgrupo 3, 11 haplótipos (3A – 3K), no subgrupo 4, seis haplótipos (4A – 4F); no subgrupo 5, 18 haplótipos (5A – 5R); no subgrupo 6, quatro haplótipos (6A – 6D). No subgrupo 6 ficaram as espécies de referência de *X. euvesicatoria* e *X. perforans*, IBSBF 2363 e IBSBF 2370 respectivamente. No subgrupo 7 foram identificados dez haplótipos (7A – 7J), no subgrupo 8, 11 haplótipos (8A – 8K); no subgrupo 9, 16 haplótipos (9A – 9P); no subgrupo 10, treze haplótipos (10A – 10M); no subgrupo 11, cinco haplótipos (11A – 11E); no subgrupo 12, cinco haplótipos (12A – 12E); no subgrupo 13, quatro haplótipos (13A – 13D). No total de isolados, foram obtidos 136 haplótipos dentro da espécie *X. perforans*. Dentre os 16 isolados de *X. gardneri*, foram obtidos nove haplótipos. A espécie foi subdividida em dois subgrupos, subgrupo 1 (IA – IE) e subgrupo 2 (IIA – IID).

Os isolados provenientes do estado de Goiás ficaram dispersos em todos os subgrupos, à exceção do grupo 11, que apresentou isolados apenas dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Em especial, isolados originados do município de Morrinhos – GO ficaram dispersos nos subgrupos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 12.



- EH 2012-05
- EH 2012-08
- EH 2012-09
- EH 2012-04
- EH 2012-07
- EH 2012-02
- EH 2012-03
- EH 2012-01
- EH 2009-122
- EH 2009-144
- EH 2010-60
- EH 2010-61
- EH 2009-115
- EH 2010-135
- EH 2010-136
- EH 2010-137
- EH 2009-192
- EH 2010-140
- EH 2009-190
- EH 2010-141
- EH 2011-21
- EH 2011-24
- EH 2011-23
- EH 2012-24
- EH 2009-111
- EH 2011-09
- EH 2011-10
- EH 2011-08
- EH 2010-152
- EH 2010-130
- EH 2010-133
- EH 2010-134
- EH 2011-48
- EH 2011-47
- EH 2011-50
- EH 2011-49
- EH 2012-06
- EH 2012-13
- EH 2011-51
- EH 2012-11
- EH 2012-12
- EH 2012-19
- EH 2012-10
- EH 2012-20
- EH 2009-157
- EH 2009-158
- EH 2009-165
- EH 2009-300
- EH 2009-159
- EH 2009-162
- EH 2009-292
- EH 2009-315
- EH 2009-316
- EH 2009-286
- EH 2009-287
- EH 2009-290
- EH 2009-289
- EH 2009-288
- EH 2009-311
- EH 2011-25
- EH 2011-27
- EH 2011-26
- EH 2009-319
- EH 2009-118
- EH 2009-313
- EH 2010-156
- EH 2010-158
- EH 2010-129
- EH 2011-22
- EH 2011-142
- EH 2011-150
- EH 2010-161
- EH 2011-103
- EH 2011-158
- EH 2011-160
- EH 2012-16
- EH 2009-112
- EH 2009-19
- EH 2009-275
- EH 2009-281
- EH 2009-237
- EH 2009-238
- EH 2009-245
- EH 2009-114
- EH 2009-226
- EH 2009-241
- EH 2009-229
- EH 2009-225
- EH 2009-318
- EH 2009-277
- EH 2009-262
- EH 2009-283
- EH 2009-278
- EH 2009-242
- EH 2009-243
- EH 2011-105
- EH 2011-32
- EH 2009-188
- EH 2011-107
- EH 2009-187
- EH 2009-274
- EH 2011-53
- EH 2009-110
- EH 2009-105
- EH 2009-106



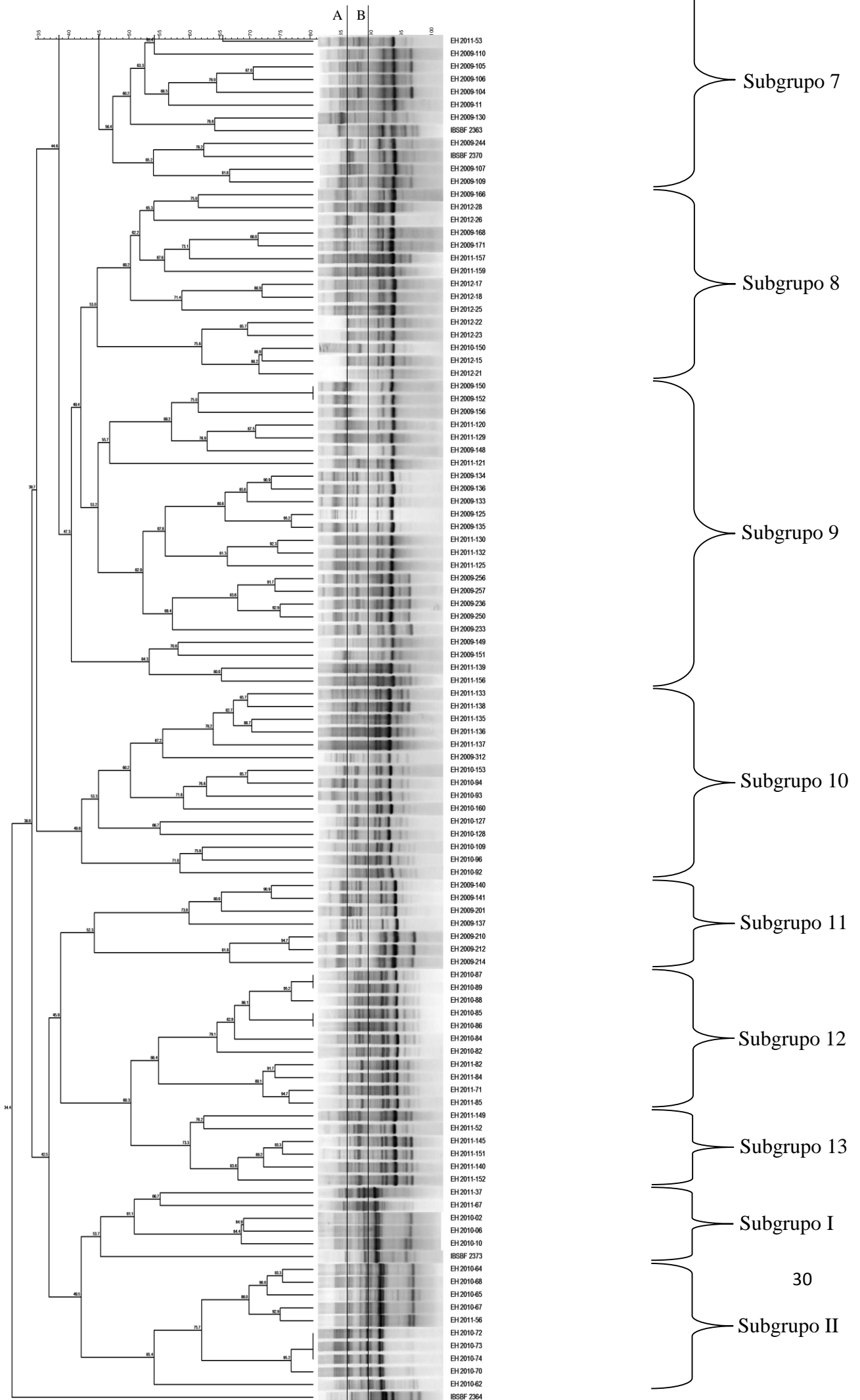


Figura 2. Dendrograma gerado a partir da comparação dos perfis genômicos obtidos por BOX-PCR de 204 isolados de *Xanthomonas* causadores da mancha-bacteriana do tomateiro e isolados de referência IBSBF. A análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA e o coeficiente de Dice usado para cálculo de similaridade. IBSBF 2363 = isolado referência de *Xanthomonas euvesicatoria*; IBSBF 2364 = isolado referência de *X. vesicatoria*; IBSBF 2370 = isolado referência de *X. perforans*; IBSBF 2373 = isolado referência de *X. gardneri*. A – similaridade mínima limítrofe para definição de haplótipos de *X. perforans* (86,3%). B – similaridade mínima limítrofe para definição de haplótipos de *X. gardneri* (89,9%).

De maneira geral, os isolados provenientes de um mesmo estado e de um mesmo segmento produtivo, localizaram-se no mesmo subgrupo ou no subgrupo mais próximo, como é o caso dos isolados originários do estado da Bahia, provenientes de tomateiro de mesa, que se agruparam nos subgrupos 2 e 3 (Tabela 2). Com relação a *X. perforans*, os isolados que apresentaram similaridade maior ou igual a 86,3% e, portanto, considerados idênticos, foram em sua grande maioria originados de um mesmo estado. Os únicos haplótipos dessa espécie, que contrariam essa ideia, foram encontrados entre os isolados: EH 2011-140, EH 2011-145 (Distrito Federal) e 2011-151 (Goiás), todos dentro do subgrupo 13 e originados de tomateiro para indústria; entre EH 2011-120 (Distrito Federal) e EH 2011-129 (São Paulo), ambos do subgrupo nove e originados de tomateiro para mesa; entre EH 2011-23 (Bahia) de tomate de mesa e EH 2012-24 (Goiás) de tomate de indústria, ambos no subgrupo dois; e entre EH 2009-225 (Goiás) e EH 2009-318 (Minas Gerais), ambos do subgrupo cinco e originados de tomate de indústria. Os isolados provenientes de São Paulo localizaram-se nos subgrupos 8, 9, 10 e 11. As exceções para esse estado são três isolados que foram caracterizados como raça T4 (EH 2011-103, do subgrupo cinco; EH 2011-105 e EH 2011-107, ambos no subgrupo seis), os isolados provenientes de municípios com poucos representantes (EH 2009-122, subgrupo um; e EH 2009-118, subgrupo quatro, ambos de Guaíra), além do único representante do município de Potirendaba (EH 2009-144, do subgrupo um). Os isolados EH 2011-130 e EH 2011-132, ambos raça T4 e alocados no subgrupo nove, são idênticos segundo perfil BOX-PCR.

Os isolados de *Xanthomonas gardneri* foram subdivididos em dois subgrupos, com um total de nove haplótipos. Foram eles o subgrupo I (IA – IE) e subgrupo II (IIA – IID). Assim, como ocorrido na maioria dos casos para *X. perforans*, os haplótipos representam isolados de um mesmo estado. Apesar do número reduzido de isolados, o limiar para definição de háplótipos de *X. gardneri* (89,9%) foi maior que *X. perforans* (86,3%), indicando uma menor variabilidade intraespecífica da primeira, com base nos perfis genômicos gerados com iniciadores tipo BOX.

Prevalência da raça T3 e primeiro relato da raça T4 no Brasil

Dentre os 188 isolados de *X. perforans*, pela resposta nos genótipos diferenciadores, 183 foram identificados como raça T3, representando a grande maioria nesta espécie (97,3%) e cinco isolados foram identificados como raça T4 (EH 2011-103; EH 2011-105; EH 2011-107; EH 2011-130 E EH 2011-132). Estes mesmos isolados, quando submetidos a PCR com os iniciadores RST 88/89, que tem como alvo o gene *avrXv3*, amplificaram um fragmento de DNA com aproximadamente 1400 pb, isto é, cerca de 800 pb maior que o tamanho esperado para este gene. Adicionalmente, estes isolados, após inoculação nos genótipos diferenciadores, induziram sintomas em genótipos que possuem o gene de resistência *Xv3* (Figura 3).

Após o sequenciamento, alinhamento das sequências, e utilização da ferramenta BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para análise de similaridade de bases, observou-se que este tamanho diferenciado nos fragmentos amplificados pelos iniciadores RST 88/89, correspondia a uma inserção de 858 pb relacionada à família de proteínas YscJ/HrcJ, caracterizadas em *Yersinia* e *Pseudomonas syringae*, respectivamente. Estas proteínas estão associadas ao sistema secretor tipo III de bactérias patogênicas a plantas e mamíferos (He *et al.* 2004). Esta inserção inicia-se no nucleotídeo 352 da sequência e se encerra no 1210 para os quatro isolados avaliados (Figura 4). Além disso, a inserção apresentou uma cobertura de 100% e identidade de 92% com um transposon encontrado no genoma completo de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (PXO99A), depositado no GenBank com o número de acesso CP000967.1 (Figura 5).

Os isolados de *X. gardneri* foram caracterizados como raça T2 e o isolado de *X. euvesicatoria* como raça T1 de acordo com a resposta nos genótipos diferenciadores.



Figura 3. Inoculação por aspersão da raça T4 de *Xanthomonas perforans* (isolado EH 2011-103) em genótipos diferenciadores de tomateiro. A – Sintomas no genótipo Bonny Best; B – Sintomas no genótipo CNPH 1500 = Hawaii 7981; C – Sintomas no genótipo CNPH 1255 = Hawaii 7981. Sintomas observados 10 dias após a inoculação de uma suspensão bacteriana com concentração aproximada de 5×10^8 UFC ml⁻¹.

Discussão

Xanthomonas perforans já está estabelecida como a espécie predominante nos campos de produção de tomate na Flórida, Estados Unidos (Jones *et al.* 1998). A prevalência desta espécie em campos brasileiros pode estar associada a alguns fatores, tais como: i) a capacidade competitiva da espécie, uma vez que Hert *et al.* (2005) constataram que *X. perforans* possui a capacidade de produzir bacteriocinas (BCN-A e BCN-B), e que estas podem conferir vantagens competitivas à essa espécie, tanto em casa de vegetação como em campo, contra *X. euvesicatoria*. Este fato também pode estar associado à baixa ocorrência de *X. euvesicatoria* em tomateiro no país; ii) *X. perforans* tem uma maior adaptabilidade a temperaturas mais elevadas (Araújo *et al.* 2011), ou seja, esta espécie é mais agressiva e mais destrutiva a temperaturas acima dos 25°C. Assim, como a temperatura média mundial vem aumentando ao longo dos anos (Sheffield *et al.* 2012), este fator favoreceria a predominância da espécie; iii) a entrada continuada da espécie via sementes contaminadas também pode explicar seu estabelecimento nas áreas de produção. Pohronezny *et al.* (1992) consideram a entrada via sementes um dos motivos que levaram a mudança repentina da raça prevalecente em campos de pimentão na Flórida. A raça 2 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* foi rapidamente suplantada pela raça 1 naquele estado americano. Esse meio de transmissão também foi listado como um dos motivos do surgimento da raça 3 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em campos de tomateiro na Flórida (Jones *et al.* 1995). A entrada de *X. perforans* via sementes

também pode ser uma explicação para a predominância dessa espécie neste estudo, uma vez que, em levantamentos realizados por Quezado-Duval *et al.* (2005), nas regiões Nordeste e Centro-Oeste do Brasil, foram registrados relatos mais frequentes, de *X. gardneri* e *X. vesicatoria*, ambas raça T2.

A alta diversidade intraespecífica observada em *X. perforans* pode estar relacionada com uma melhor adaptação dessa espécie às condições brasileiras, uma vez que Quezado-Duval *et al.* (2005), trabalhando com isolados coletados entre 1995 e 2000, observaram uma baixa diversidade do grupo 3, atual *X. perforans*, por meio de eletroforese em campo pulsado. Outro fator que pode estar relacionado à detecção dessa diversidade é a resolução dos métodos empregados. A utilização de um software (Gelcompar) para definição dos tamanhos dos fragmentos, bem como para construção dos dendrogramas, aumenta a capacidade de resolução e robustez. Costa *et al.* (2012), por exemplo, analisando perfis genômicos gerados por BOX-PCR, relataram uma elevada diversidade das espécies *X. perforans* e *X. gardneri* quando analisaram isolados coletados no ano de 2010 e também utilizaram o mesmo programa, substituindo a análise meramente visual.

A diversidade do grupo ainda gera discussões. Young *et al.* (2008), após a análise das sequências dos genes de *housekeeping dnaK, fyuA, gyrB* e *rpoD*, propuseram que *X. perforans* e *X. euvesicatoria* sejam tratadas como espécies sinônimas. No presente trabalho, não foi possível distingui-las utilizando apenas a técnica de BOX-PCR. Recomenda-se então, para uma correta identificação das espécies, a utilização de iniciadores específicos complementarmente. Numa vertente contrária, Potnis *et al.* (2011), ao analisarem o genoma completo das quatro espécies causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro, afirmam que estas são suficientemente distintas para serem tratadas como espécies diferentes. Por sua vez, Hamza *et al.* (2010) observaram uma diversidade patogênica para a espécie *X. euvesicatoria*, onde alguns isolados foram capazes de causar doença na variedade Aiguille de pimentão, enquanto outros não ocasionavam doença nessa variedade. Quezado-Duval e Camargo (2004) observaram que a patogenicidade de isolados de *X. gardneri* em pimentão era variável, isto é, os agentes envolvidos no complexo causador da mancha-bacteriana devem ser analisados com o maior número de técnicas possíveis para um melhor entendimento da sua diversidade. A técnica de BOX-PCR pode auxiliar nesse estudo intraespecífico. A maior frequência de haplótipos representando o mesmo estado ou mesmo município indica que ainda não há um fluxo interestadual dos isolados. Paralelo a isso, a distribuição e diversidade de haplótipos originados do município de Morrinhos-GO, pelos diferentes subgrupos indica uma possível entrada

externa, provavelmente via sementes, da espécie *X. perforans*, nos diferentes campos de produção. Aliado a isso, a presença da espécie em plantas voluntárias (Quezado-Duval e Lopes, 2010), entidades potencialmente bastante diversas geneticamente, por se tratarem de produtos de autofecundações dos diferentes híbridos plantados, podem imprimir distintas pressões de seleção sobre a população bacteriana. Porém, é necessário o emprego de uma combinação de técnicas, tais como PCR-RFLP (Kawaguchi, 2013), AFLP e análises multilocus (Hamza *et al.* 2010) para o melhor entendimento do fluxo genômico de uma espécie, bem como para um estudo mais aprofundado de epidemiologia molecular.

Até o momento, nos levantamentos realizados com isolados brasileiros de *Xanthomonas* spp. associados à mancha-bacteriana do tomateiro (Quezado-Duval e Camargo, 2004; Quezado-Duval *et al.* 2005; Pereira *et al.* 2011), só havia sido constatada a presença da raça T3 de *X. perforans*. Com a identificação de cinco isolados como raça T4, todos originados de tomateiro para mesa no estado de São Paulo, divulga-se neste trabalho, o primeiro registro dessa raça no país.

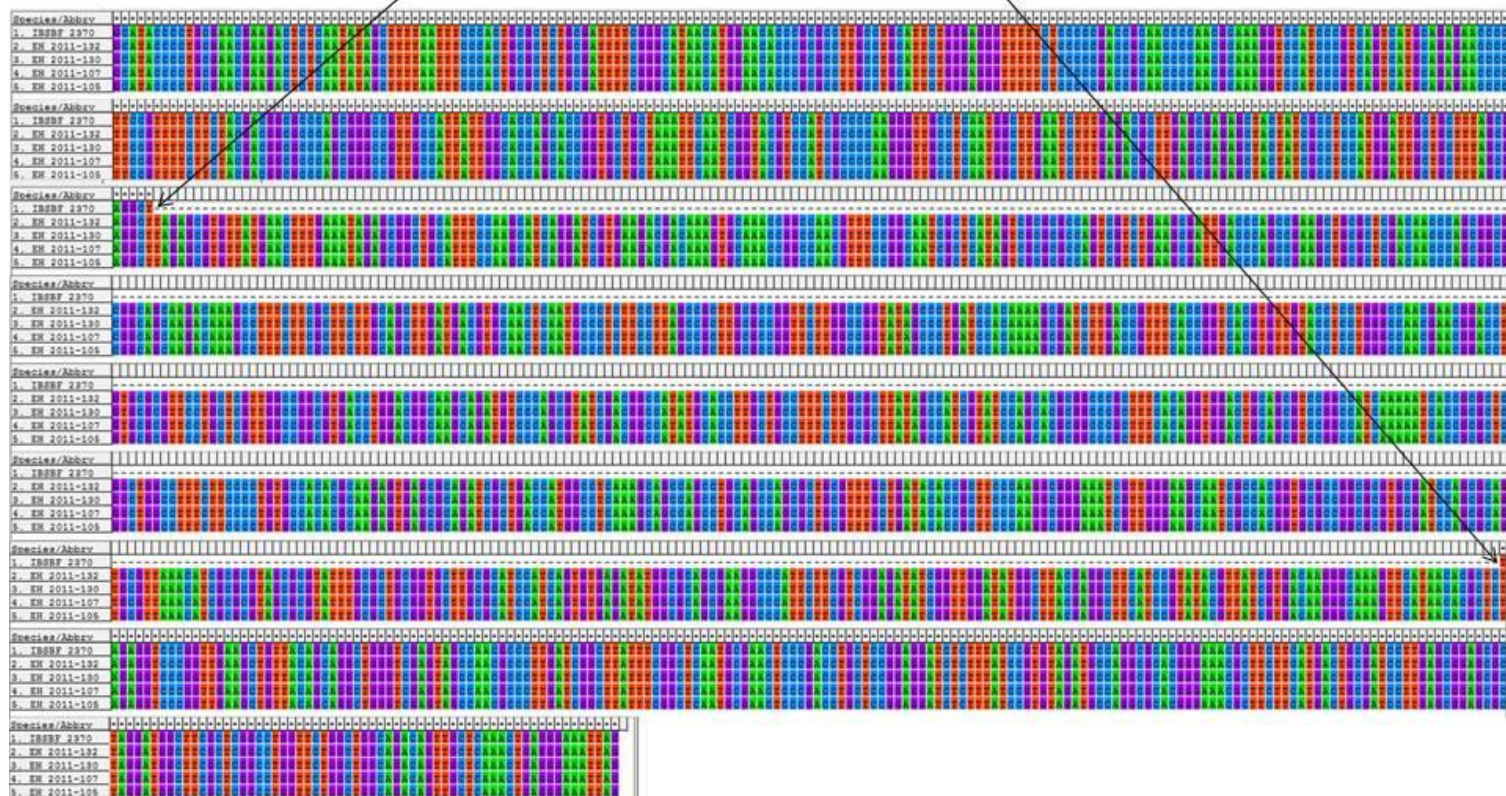
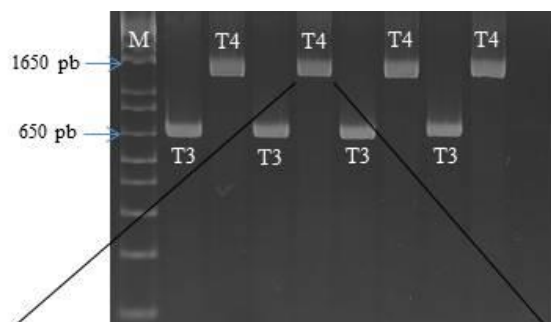


Figura 4. Gel de agarose com fragmentos de DNA amplificados e alinhamento das seqüências de isolados da raça T3 e T4 de *X. perforans*, agente causal da mancha-bacteriana do tomateiro. As setas indicam o *gap* que se forma no alinhamento entre isolados da raça T4 (EH 2011-105; EH 2011-107; EH 2011-130; EH 2011-132) com um isolado da raça T3 (IBSBF 2370). Esse *gap* é resultado da inserção presente apenas nos isolados T4. T3 = amplificação de fragmento de DNA de isolados da raça T3 com os iniciadores RST88/89, que visam o gene *avrXv3* de *X. perforans*. T4 = amplificação de fragmento de DNA de isolados da raça T4 com os iniciadores RST88/89, que visam o gene *avrXv3* de *X. perforans*. M = Marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Inserção T4	1	TAGAGCGTGTATGAACCTTTGAAATAGAGCGGCTGCATTTCCAAGCATCAGGATCGTGAA	60
CP000967.1	5214385	TAGAGCGTGTATGAACCTTTGAAAGAGCGTGGCTGCATTTTCAAGCATCAGAAATCGTGAA	5214444
Inserção T4	61	GACGACAAAGTGCAAACCGGCCAACGTTTCCGGCAATCGCTCATAGTCGCGCGCCAGTCG	120
CP000967.1	5214445	GACAAACAAAGTGCAAACCGGCCAAGGTTTCCGGTAATCGCTCGTAGTCGCGTGCCAGTCG	5214504
Inserção T4	121	TCTGAAGCGATTGACCCAGCCGGAAGCTGCGCTCGACACCCAGCGCGCGGCAGCAAGAC	180
CP000967.1	5214505	CCTGAAACGATTGACCCATCCAAAGCTGCGCTCGACGACCCAGCGCGCGGCAGCAAAAC	5214564
Inserção T4	181	AAAGCCTTTCCTCGCTTCTTGACGCTTGATGACGTGCAACTCAATGCCCTTTCCTTAGC	240
CP000967.1	5214565	AAAGCCTTTCCTCGCTTCTTGACGCTTGATGACGTGCAATTCGATGCCCTTTCCTTAGC	5214624
Inserção T4	241	CGCTTGCAGCGGTTCTTGGCCGGTATAGCCCTGATCCACAAAAGCGATCTTGACCGTTTC	300
CP000967.1	5214625	CGCTTGCAGCGGTTCTTGGCCGGTATAGCCCTGATCCACAAAAGCGATCTTGACCGTTTC	5214684
Inserção T4	301	ACCGGTCACGTGTTGTACCTCCTGGGCCAACGAAACGGACCTGTGCGCGTTCCTGCTCGTT	360
CP000967.1	5214685	ACCGGTCACGTGTTGTACCTCCTGGGCCAACGATCGCACTTGCAGCGCTCCTGCTCATI	5214744
Inserção T4	361	GGCCGCGGTGACCTGGACGGCAAGCAGATGTCCAGCGTATCGACGGCCATATGCACCTT	420
CP000967.1	5214745	GGCTGGCGTGACCTGGACGGCGAGCAGATGTCCAGCGTATCGACCGCCATGTGCACCTT	5214804
Inserção T4	421	GCTGCCTTTCCTGCGCTTATAGCCATCGTATCCAGCACGCGGCCCGCTTTCACAGGTGGA	480
CP000967.1	5214805	GCTGCCTTTCCTGCGCTTATAGCCATCGTATCCAGCACGCGGCCCGCTTTCGCGAGGTGGA	5214864
Inserção T4	481	CTGCAGCGTCCGGCCATCAAAAATCACCGCGCTCGGCTGGCCTTTCCTCCCGTGTGCCAC	540
CP000967.1	5214865	CTGCAGCGTACGGCCATCGAAAATGACCGCACTCGGCTGGCCTTTCCTCCCGTGCGCCAC	5214924
Inserção T4	541	ACGCAAGAGTGAGCGCAGATCGCTGACCATGGCCTCAAAGCAGCCAGCCTTGCAGCCAGCG	600
CP000967.1	5214925	ACGCAAGAGTGAGCGCAGATCGCTGACCATGGCCTCGAAGCAGCCAGCCTTGCAGCCAGCG	5214984
Inserção T4	601	CTGCGTTTGTGATACACCGCTTCCCAAGGCGGAAATCGTTGGGAAGCAATCGCCACGG	660
CP000967.1	5214985	CTGCGTTTGTGATACACCGCTTCCCAAGGCGGAAATCGTTGGTAAGCAATCGCCACGG	5215044
Inserção T4	661	TGCGCCGGCGGTGCGATCCAGCGCAGTGCCTTAAACATCGCGCGTAGCGGTATTTGCG	720
CP000967.1	5215045	TGTGCCGGCGGTGTGATCCAGCGAAGTGCCTTAAACATCGCGCGTAGCTCATACTTGC	5215104
Inserção T4	721	CTGCGGTGCTTGCAGCATCCATCAGTGTGAGATATGGCGCAGCGAAGGCCCATTCCTCGTC	780
CP000967.1	5215105	CTGCGGTGCTTGCAGCATCCATCAGTGTGAGATATGGCGCAGCGAAGGCCCATTCCTCGTC	5215164
Inserção T4	781	GGAGATATCGGTTGGATATGGCTTACGAGGCTTCCATCCGTATACGTTATCGTGACAAAGG	840
CP000967.1	5215165	GAAATATCGGTTGGATATGGCTTACGAGGCTTCCATCCGTATACGTTAGCGTGACAAAGG	5215224
Inserção T4	841	CAAAGTTCATAACACGCTC 859	
CP000967.1	5215225	CAAAGTTCATAACACGCTC 5215243	

Figura 5. Alinhamento realizado com auxílio da ferramenta BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* entre a inserção encontrada no gene *avrXv3* (Inserção T4) e o fragmento de DNA (transposon relacionado à família de proteínas YscJ/HrcJ) do genoma completo de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (PXO99A), depositado no *GenBank* com o número de acesso CP000967.1. A cobertura foi de 100% e identidade 92%.

Na revisão publicada por Stall *et al.* (2009), os autores afirmam que a raça T4 origina-se a partir de uma mutação no gene *avrXv3*, presente em *X. perforans* e que essa alteração é causada por uma inserção dentro do gene. Foi verificado no presente trabalho que esta inserção está relacionada à família de proteínas YscJ/HrcJ. Desta forma, quando da presença dessa inserção, a espécie comporta-se como raça T4, alterando seu fenótipo de virulência aos genótipos diferenciadores atualmente utilizados. Alterações na virulência de isolados já foram verificadas para *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, atual *X. euvesicatoria*, quando na presença da inserção IS476 em isolados com o gene de avirulência *avrBs1* (Kearney e

Staskawicz, 1990). No mesmo sentido, uma pequena inserção de cinco bases (CGCGC) na ORF 1 do gene *avrBs2* foi capaz de ocasionar alterações na virulência de isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Swords *et al.* 1996). Kang *et al.* (2001) verificaram uma modificação na virulência de isolados de *Magnaporthe grisea*, quando estes apresentavam a inserção do transposon Pot3 no gene de avirulência *AVR-Pita*.

A diversidade de um patógeno é fator importante para estabelecimento de estratégias de controle, uma vez que a presença de diferentes raças exige o desenvolvimento de variedades com um espectro maior de genes de resistência. A herança da resistência para a raça T2 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* foi caracterizada como quantitativa em trabalho realizado por Silva-Lobo *et al.* (2005). De acordo com os dados de levantamento da época, essa era a raça predominante nos campos brasileiros de produção de tomate (Quezado-Duval *et al.* 2005).

Em princípio, atualmente, os esforços devem ser direcionados para o desenvolvimento de variedades com resistência ou tolerância à raça T3 de *X. perforans*, uma vez que essas são espécie e raça predominantes no país. Porém, a busca por fontes de resistência mais ampla é recomendada, pois uma nova raça pode vir a se estabelecer. Estudos de levantamento e caracterização devem ser continuados para acompanhamento de possíveis alterações de prevalência.

Referências

- Araújo, E.R., Costa, J.R., Ferreira, M.A.S.V., Quezado-Duval, A.M. 2012. Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology* 113:1479-1490
- Araújo, E.R., Pereira, R.C., Ferreira, M.A.S.V., Café-Filho, A.C., Moita, A.W., Quezado-Duval, A.M. 2011. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. *Acta Horticulturae* 914:39-42.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Davis, M.J., Bonas, U., Jones, J.B. 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.
- Beran, P., Mráz, I. 2013. Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. *Crop Protection* 43:213-215.
- Bottalico, A. 1998. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80:85-103.
- Bouzar, H., Jones, J.B., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Scott, J.W. 1994. Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. *Phytopathology* 84:39-44.
- Bouzar, H., Jones, J.B., Stall, R.E., Louws, F.J., Schneider, M., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J., Jackson, L.E. 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.
- Castillo, J.A., Greenberg, J.T. 2007. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:1225-1238.
- Costa, J.R., Araújo, E.R., Becker, W.F., Ferreira, M.A.S.V., Quezado-Duval, A.M. 2012. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC. *Tropical Plant Pathology* 37:149-154.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98.

Hamza, A.A., Robène-Soustrade, I., Jouen, E., Gagnevin, L., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Pruvost, O. 2010. Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. Plant Disease 94:993-999.

He, S.Y., Nomura, K., Whittam, T.S. 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research 1694:181-206.

Hert, A.P., Roberts, P.D.M., Momol, T., Minsavage, G.V., Tudor-Nelson, S.M., Jones, J.B. 2005. Relative importance of bacteriocin-like genes in antagonism of *Xanthomonas perforans* tomato race 3 to *Xanthomonas euvesicatoria* tomato race 1 strains. Applied and Environmental Microbiology 71:3581–358.

IBGE. 2013. Levantamento Sistemático de Produção Agrícola. Rio de Janeiro, dezembro. 26:1-84.

Jones, J.B., Bouzar, H., Somodi, G.C., Stall, R.E., Pernezny, K., El-Morsy, G., Scott, J.W. 1998. Evidence for the preemptive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. Phytopathology 88:33–38.

Jones, J.B., Bouzar, H., Stall, R.E., Almira, E.C., Roberts, P.D., Bowen, B.W., Sudberry, J, Strickler, P.M., 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, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., Zitter, T.A. 1991. Compendium of tomato diseases. St Paul: APS Press. 73 p.

Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Schaad, N.W. 2005. Bacterial spot - worldwide distribution, importance and review. Acta Horticulturae 695:27-34.

Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., Schaad, N.W. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. Systematic and Applied Microbiology 27:755-762.

- Jones, J.B., Stall, R.E., Scott, J.W., Somodi, G.C., Bouzar, H., Hodge, N.C. 1995. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Disease* 79:395-398.
- Kang, S., Lebrun, M.H., Farrall, L. Valent, B. 2001. Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:671-674.
- Kawaguchi, A. 2013. PCR-RFLP identifies differences in *hrpZ* sequences to distinguish two genetic groups of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from barley and wheat with bacterial black nod. *Journal of General Plant Pathology* 79:51-55.
- Kearney, B., Staskawicz, B.J. 1990. Characterization of IS476 and its role in bacterial spot disease of tomato and pepper. *Journal of Bacteriology* 172:143-148.
- Kizheva, Y., Vancheva, T., Hristova, P., Stoyanova, M., Stojanovska, M., Moncheva, P., Bogatzevska, N. 2013. Identification of *Xanthomonas* strains from tomato and pepper and their sensitivity to antibiotics and copper. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 19:80-82.
- Koenraadt, H., van Betteray, B., Germain, R., Hiddink, G., Jones, J.B., 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.
- Lema, M., Cartea, M.E., Sotelo, T., Velasco, P., Soengas, P. 2012. Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by *Brassica* spp. genotypes and rep-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 133:159-169.
- Ma, X., Lewis Ivey, M.L., Miller, S.A. 2011. First report of *Xanthomonas gardneri* causing bacterial spot of tomato in Ohio and Michigan. *Plant Disease* 95:1584.
- Mahuku, G.S. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:71–81.
- Moriones, E., Navas-Castillo, J. 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71:123-134.
- Myung, I.-S., Moon, S.Y., Jeong, I.H., Lee, Y.-K., Lee, Y.H., Ra, D.S. 2009. Bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas perforans*, a new disease in Korea. *Plant Disease* 93:1349.

- Park, D.S., Hyun, J.W., Park, Y.J., Kim, J.S., Kang, H.W., Hahn, J.H., Go, S.J. 2006. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences. *Microbiological Research* 161:145-149.
- Pereira, R.C., Araújo, E.R., Ferreira, M.A.S.V., Quezado-Duval, A.M. 2011. Occurrence of *Xanthomonas* species causing bacterial spot in fresh market tomato fields in Brazil. *Acta Horticulturae* 914:61-64.
- Pohronezny, K., Stall, R.E., Canteros, B.I., Kegley, M., Datnoff, L.E., Subramanya, R. 1992. Sudden shift in the prevalent race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper fields in Southern Florida. *Plant Disease* 76:118-120.
- Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N.F., Patil, P.B., Ryan, R.P., Sharlach, M., Behlau, F., Dow, J.M., Momol, M.T., White, F.F., Preston, J.F., Vinatzer, B.A., Koebnik, R., Setubal, J.C., Norman, D.J., Staskawicz, B.J., Jones, J.B. 2011. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics* 12:146.
- Quezado-Duval, A.M., Camargo, L.E.A. 2004. Raças de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil. *Horticultura Brasileira* 22:80-86.
- Quezado-Duval, A.M., Lopes, C.A. 2010. Mancha-bacteriana: Uma Atualização Para o Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. 28p. Brasília: Embrapa Hortaliças, (Circular Técnica 84).
- Quezado-Duval, A.M., Lopes, C.A., Leite Junior, R.P., Lima, M.F., Camargo, L.E.A. 2005. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. *Acta Horticulturae* 695:101-108.
- Rademaker, J.L.W., Hoste, B., Louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P., de Bruijin, F.J. 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.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. St Paul: American Phytopathological Society Press.

Sheffield, J., Wood, E.F., Roderick, M.L. 2012. Little change in global drought over the past 60 years. *Nature* 491:435-438.

Silva-Lobo, V.L.S., Giordano, L.B., Lopes, C.A. 2005. Herança da resistência à mancha-bacteriana em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 30:343-349.

Stall, R.E., Jones, J.B., Minsavage, G.V. 2009. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. *Annual Review of Phytopathology* 47:265-284.

Swords, K.M.M., Dahlbeck, D., Kearney B., Roy, M., Staskawicz, B.J. 1996. Spontaneous and induced mutations in a single open reading frame alter both virulence and avirulence in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *avrBs2*. *Journal of Bacteriology* 178:4661-4669.

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

Wilson, K. 1999. Preparation of genomic bacteria. In *Short Protocols in Molecular Biology* ed. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. pp. 2-14. New York: John Wiley.

Young, J.M., Park, D.C., Shearman, H.M., Fargier, E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* 31:366-377.

CAPÍTULO 2

Deteccção e identificação simultâneas do complexo de espécies de *Xanthomonas* associado à mancha-bacteriana do tomateiro utilizando iniciadores específicos e PCR *multiplex**

*Capítulo publicado (Araújo, E.R., Costa, J.R., Ferreira, M.A.S.V., Quezado-Duval, A.M. 2012. Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. Journal of Applied Microbiology 113:1479-1490).

Detecção e identificação simultâneas do complexo de espécies de *Xanthomonas* associado à mancha-bacteriana do tomateiro utilizando iniciadores específicos e PCR *multiplex*

Resumo

Este trabalho teve com objetivo o desenvolvimento de protocolos para detecção e identificação simultâneas das espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro. Para tal, avaliou-se a especificidade e sensibilidade de iniciadores específicos previamente desenhados, com isolados brasileiros das quatro espécies de *Xanthomonas* associadas à doença. Foram utilizados 30 isolados de *X. euvesicatoria*, 30 de *X. vesicatoria*, 50 de *X. perforans* e 50 de *X. gardneri*. Adicionalmente, foi desenvolvido um protocolo de PCR *multiplex* para detecção simultânea a partir de DNA purificado, suspensão bacteriana e folhas sintomáticas de tomateiro. Os iniciadores foram altamente específicos, amplificando apenas suas respectivas espécies alvo. A sensibilidade dos iniciadores específicos, utilizando PCR convencional, foi de 50 pg ml⁻¹ para DNA purificado e variou entre 5 × 10² e 5 × 10⁴ UFC ml⁻¹ para suspensões bacterianas. A técnica de PCR *multiplex* foi capaz de detectar todas as espécies simultaneamente e apresentou sensibilidade similar à PCR convencional, quando DNA purificado foi utilizado. Quando suspensões bacterianas foram utilizadas, a sensibilidade da PCR *multiplex* foi semelhante à da PCR convencional apenas quando um passo de enriquecimento (Bio-PCR) foi incluído. Ambos os métodos foram eficazes em detectar os patógenos em folhas sintomáticas de tomateiro. Portanto, é possível a detecção e diferenciação de todas as espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha-bacteriana que tem ocorrido no Brasil, por meio de PCR convencional e PCR *multiplex*. Estes protocolos podem ser uma ferramenta alternativa viável para a identificação e detecção destes agentes patogênicos em plantas e podem ser utilizados para fim de diagnose de rotina em laboratórios de fitopatologia.

Palavras-chave: PCR *multiplex*; PCR; sensibilidade; especificidade; *Xanthomonas euvesicatoria*; *X. gardneri*; *X. perforans*; *X. vesicatoria*

Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR

Abstract

The aim of this work was to establish protocols for the simultaneous detection and identification of *Xanthomonas* species causing tomato bacterial spot. We verified the specificity and sensitivity of the previously reported sets of primers designed for strains of the four species of Brazilian tomato bacterial spot xanthomonads, consisting of 30 of *Xanthomonas euvesicatoria*, 30 of *X. vesicatoria*, 50 of *X. perforans* and 50 of *X. gardneri*. Furthermore, we tested a multiplex PCR protocol for the purpose of concurrent species identification. The possibility of direct detection of the pathogens in diseased leaf samples was also verified. The primers were highly specific, amplifying only target DNA. The sensitivity of the primers in conventional PCR was 50 pg ml⁻¹ for purified DNA and ranged from 5 × 10² to 5 × 10⁴ CFU ml⁻¹ when bacterial suspensions were analysed. The multiplex PCR was suitable for the detection of all four species and showed similar sensitivity to conventional PCR when tested on purified DNA. When using bacterial suspensions, its sensitivity was similar to conventional PCR only when a biological amplification step (Bio PCR) was included. Both methods were able to detect the pathogens in symptomatic tomato leaves. Brazilian *Xanthomonas* strains causing tomato bacterial spot can be differentiated and identified at species level by a PCR-based method and by a multiplex PCR. This protocol may be a feasible alternative tool for the identification and detection of these pathogens in plant material and may be used for routine diagnostic purposes in plant pathology laboratories.

Keywords: multiplex PCR; PCR; sensitivity; specificity; *Xanthomonas euvesicatoria*; *X. gardneri*; *X. perforans*; *X. vesicatoria*

Introdução

Um complexo de espécies do gênero *Xanthomonas* causa a mancha-bacteriana do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), a saber, *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (Jones *et al.* 2004). A doença ocorre mundialmente e pode atingir toda a parte aérea da planta, comprometendo a produtividade da cultura devido à redução da área foliar fotossintetizante, queda de flores em formação e perda do valor comercial dos frutos (Jones *et al.* 1991). Além disso, aplicações de produtos químicos elevam o custo de produção (Quezado-Duval e Lopes 2010). Sementes contaminadas, plantas voluntárias de tomate (tigueras) e restos culturais podem servir como fonte de inóculo da doença (Jones *et al.* 1991; Quezado-Duval e Lopes 2010). Como forma de disseminação dentro do mesmo campo ou para campos próximos, chuva e irrigação associada a ventos fortes tem um papel importante (Jones *et al.* 1991; Quezado-Duval and Lopes 2010).

As quatro espécies associadas à mancha-bacteriana já foram relatadas em campos brasileiros de produção de tomate, tanto destinados ao processamento industrial como para consumo *in natura* (Quezado-Duval *et al.* 2005; Pereira *et al.* 2011). Logo, o estabelecimento de uma metodologia para a rápida e eficiente diagnose da doença e detecção do(s) patógeno(s) envolvido(s) mostra-se necessária tanto para trabalhos de rotina como de pesquisa relacionados ao patossistema.

Identificação molecular de espécies de *Xanthomonas*, incluindo aquelas causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro, é realizada com base na técnica de reação em cadeia da polimerase – *Polymerase Chain Reaction* (PCR) seguida da utilização de enzimas de restrição (Leite Júnior *et al.* 1994, 1995) e por rep-PCR (Louws *et al.* 1995). Iniciadores específicos foram recentemente desenhados com o intuito de identificar algumas espécies de *Xanthomonas*, mas não todas, envolvidas no complexo da mancha-bacteriana (Cuppels *et al.* 2006; Moretti *et al.* 2009). Por sua vez, Koenraad *et al.* (2009), baseados em perfis genômicos gerados pela técnica *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), desenharam iniciadores para as quatro espécies. Os autores enfatizaram que os iniciadores específicos deveriam ser validados com um número representativo de isolados, principalmente das espécies *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*. Tais iniciadores parecem interessantes para utilização no Brasil, haja visto a presença de todas as espécies no país. Porém, para que possam ser recomendados para utilização em trabalhos de rotina, é necessária a validação desses iniciadores com uma ampla gama de isolados brasileiros, avaliando sua especificidade e sensibilidade.

Além disso, uma alternativa para o emprego dos iniciadores específicos pode ser por meio de PCR *multiplex*, onde as espécies do complexo da mancha-bacteriana são detectadas/identificadas simultaneamente. A detecção de diferentes patógenos associados a doenças de plantas, por PCR *multiplex*, vem sendo uma prática cada vez mais comum nos processos diagnósticos (Pulawska *et al.* 2006; Berg *et al.* 2006; Robène-Soustrade *et al.* 2010). As metodologias ou protocolos até o momento descritos para mancha-bacteriana do tomateiro não foram ainda elaboradas visando à identificação simultânea dos agentes causadores da doença.

Um protocolo de PCR *multiplex* para a detecção simultânea de três fitobactérias transmitidas por sementes de tomate [(*Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* [(atualmente *X. euvesicatoria*)] (Jones *et al.* 2004; Young *et al.* 2008)] foi desenvolvido por Özdemir (2005; 2009). Com o uso da técnica foi possível identificar, simultaneamente, diferentes espécies infectando ou sobrevivendo epifiticamente nos tecidos da hospedeira. Com base no apresentado, notamos o potencial da técnica para a identificação simultânea das espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha-bacteriana do tomateiro.

Este trabalho objetivou validar iniciadores específicos desenvolvidos para as quatro espécies causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro, com isolados brasileiros, verificando sua especificidade e sensibilidade e também estabelecer um protocolo de PCR *multiplex* para detecção simultânea das espécies associadas à doença.

Materiais e Métodos

Isolados utilizados no estudo e extração de DNA

Os isolados utilizados para validação dos iniciadores específicos estão mantidos na coleção de trabalho de bactérias fitopatogênicas do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq – Embrapa Hortaliças), Brasília, DF, Brasil. Esses isolados foram previamente identificados em nível específico por meio de testes de patogenicidade em tomateiro suscetível (variedades Yuba ou Bonny Best), por BOX-PCR e pela presença dos genes de avirulência *avrRxv* em *X. euvesicatoria* e *avrXv3* em *X. perforans*, verificada por PCR com os iniciadores RST 27/28 e RST 88/89, respectivamente (Bouzar *et al.* 1994; Astua-Monge *et al.* 2000). A maioria dos isolados foi obtida a partir de amostras de folhas e frutos de tomateiro apresentando sintomas típicos de mancha-bacteriana, coletadas em 14 estados brasileiros. Parte dos isolados de *X. euvesicatoria* foi obtida de pimentão (*Capsicum* spp.), uma vez que esta espécie não

ocorre com frequência em tomateiro (Tabela 1). O isolamento foi realizado em meio de cultura Ágar Nutriente – AN (Schaad *et al.* 2001) e os isolados preservados em tampão fosfato (8,5 mmol l⁻¹ de K₂HPO₄; 7,5 mmol l⁻¹ de KH₂PO₄, pH 7.0) sob temperatura ambiente e/ou caldo nutriente suplementado com glicerina (30%) a – 80°C.

Os isolados preservados em tampão fosfato são recuperados a cada 6-12 meses. Além disso, os haplótipos definidos por rep-PCR e originários de diferentes regiões geográficas também são mantidos a – 80°C. Trinta isolados de *X. euvesicatoria*, 30 de *X. vesicatoria*, 50 de *X. perforans* e 50 de *X. gardneri* foram utilizados (Tabela 1). Trinta e dois isolados de bactérias e fungos patogênicos ao tomateiro ou outros hospedeiros foram incluídos para verificação da especificidade dos iniciadores. Além disso, foram utilizados 13 isolados representantes de populações epifíticas e/ou endofíticas de amostras foliares de tomate, obtidos por maceração das folhas de plantas de tomate retiradas do campo e isoladas em meio AN. Esses isolados foram selecionados pelas diferenças na morfologia em meio de cultura.

Para todos os ensaios realizados, foram utilizados isolados de referência provenientes da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Instituto Biológico de São Paulo, sendo IBSBF 2363 = Xvp197 (*X. euvesicatoria*); IBSBF 2364 = XV1111 (*X. vesicatoria*); IBSBF 2370 = ATCC BAA-983 (*X. perforans*) e IBSBF 2373 = XCGA2 (*X. gardneri*).

Tabela 1. Isolados de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro utilizados para validação dos iniciadores específicos previamente desenhados por Koenraadt *et al.* (2009).

Espécies/ Isolados	Hospedeiros	Procedência ^a	Ano de Isolamento
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>			
EH 36P; EH 37P; EH 38P; EH 39P; EH 40P; EH 41P; EH 44P; EH 83P; EH 84P; EH 85P; EH 92P; EH 96P; EH 97P; EH 100P; EH 101P; EH 110P; EH 116P; EH 118P; EH 1996-209; EH 1996-210; EH 1996-211; EH 1996-212; EH 1996-213; EH 1996-214; EH 1996-216; EH 1996-217; EH 1996-219; EH 1996-220; EH 2009-46; EH 2009-47; IBSBF 2363*	Tomate/ Pimentão	PE; MG; AM; SP; RR; DF; GO; ES; CE; BA	1996; 1998; 1999; 2002; 2009; 2010; 2011
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>			
EH 1995-95; EH 1995-96; EH 1995-99; EH 1995-101; EH 1995-102; EH 1995-103; 1995-104; 1995-105; EH 1995-107; EH 1995-108; EH 1995-110; EH 1995-111; EH 1995-112; EH 1995-113; EH 1995-122; EH 1996-202; EH 2007-08; EH 2008-32; 2008-167; EH 2008-168; EH 2010-08; EH 2010-24; EH 2010-25; EH 2010-41; EH 2009-42; EH 2010-59; IBSBF 2364*	Tomate	GO; SC; RJ; MG	1995; 1996; 2007; 2008; 2010

Xanthomonas perforans

EH 2005-54; EH 2006-44; EH 2007-26; EH 2008-13;
EH 2008-16; EH 2009-11; EH 2009-12; EH 2009-13;
EH 2009-104; EH 2009-105; EH 2009-106; EH 2009-107;
EH 2009-110; EH 2009-112; EH 2009-133; EH 2009-134;
EH 2009-136; EH 2009-143; EH 2009-148; EH 2009-149;
EH 2009-156; EH 2009-172; EH 2009-212; EH 2009-229;
EH 2010-18; EH 2010-19; EH 2010-20; EH 2010-33;
EH 2010-49; EH 2010-60; EH 2010-61; EH 2010-93;
EH 2010-94; EH 2010-107; EH 2010-111; EH 2010-121;
EH 2010-122; EH 2010-133; EH 2010-134; EH 2010-142;
EH 2010-155; EH 2010-161; EH 2010-162; EH 2010-163;
EH 2010-185; EH 2011-01; EH 2011-02; EH 2011-03;
EH 2011-04; EH 2011-05; IBSBF 2370*

Tomate	GO; BA; MG SC; SP	2005; 2006; 2007; 2008; 2009; 2010; 2011
--------	----------------------	---

Xanthomonas gardneri

EH 2006-17; EH 2006-21; EH 2006-52; EH 2007-12;
EH 2007-13; EH 2007-17; EH 2007-19; EH 2007-20;
EH 2007-22; EH 2007-34; EH 2007-39; EH 2007-41;
EH 2008-22; EH 2009-37; EH 2010-02; EH 2010-03;
EH 2010-04; EH 2010-06; EH 2010-07; EH 2010-09;
EH 2010-10; EH 2010-12; EH 2010-13; EH 2010-14;
EH 2010-15; EH 2010-17; EH 2010-21; EH 2010-22;
EH 2010-23; EH 2010-31; EH 2010-32; EH 2010-37;
EH 2010-38; EH 2010-42; EH 2010-44; EH 2010-45;
EH 2010-46; EH 2010-52; EH 2010-53; EH 2010-56;
EH 2010-57; EH 2010-62; EH 2010-63; EH 2010-64;
EH 2010-65; EH 2010-67; EH 2010-68; EH 2010-70;
EH 2010-73; EH 2010-74; IBSBF 2373*

Tomate	GO; PR; RS; ES; SC; MG	2006; 2007; 2008; 2009; 2010
--------	---------------------------	------------------------------------

*Isolados referência de espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro, IBSBF 2363 obtido dos EUA, IBSBF 2364 da Nova Zelândia, IBSBF 2370, dos EUA e IBSBF 2373 da Iugoslávia.

^a isolados coletados em diferentes estados brasileiros. As siglas indicam os nomes dos estados.

Os isolados foram recuperados a partir do tampão fosfato e cresceram em meio NA a 28°C. Quando necessário, suspensões bacterianas foram preparadas em água destilada esterilizada com concentração ajustada em espectrofotômetro (OD₆₀₀ = 0,3) para aproximadamente 5 × 10⁸ UFC ml⁻¹ (Jones *et al.* 2000).

A extração de DNA dos isolados foi realizada segundo protocolos de Wilson (1999) e/ou Mahuku (2004), os quais não diferiram quanto à qualidade do DNA extraído. O DNA foi quantificado visualmente, em gel de agarose (1,5%), utilizando o marcador DNA High Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA). Em seguida, as amostras foram diluídas para aproximadamente 50 ng µl⁻¹ e armazenadas a – 20°C até o momento de sua utilização.

Protocolo para PCR convencional

Os iniciadores específicos utilizados foram aqueles desenhados por Koenraadt *et al.* (2009). Sequências, espécies alvos e tamanho de fragmento de DNA amplificado foram os seguintes: BS-XeF (5' – CATGAAGAACTCGGCGTATCG – 3') e BS-XeR (5' – GTCGGACATAGTGGACACATAC – 3') para *X. euvesicatoria*, amplificando 173 pb; BS-XvF (5' – CCATGTGCCGTTGAAATACTTG – 3') e BS-XvR (5' – ACAAGAGATGTTGCTATGATTTGC – 3') para *X. vesicatoria*, com fragmento de 138 pb; BS-XpF (5' – GTCGTGTTGATGGAGCGTTC – 3') e BS-XpR (5' – GTGCGAGTCAATTATCAGAATGTGG – 3') para *X. perforans*, com fragmento de 197 pb; BS-XgF (5' – TCAGTGCTTAGTTCCTCATTGTC – 3') e BS-XgR (5' – TGACCGATAAAGACTGCGAAAG – 3') para *X. gardneri*, com fragmento de 154 pb.

A PCR foi realizada em termociclador (My Cycler, Bio-Rad) de acordo com o programa a seguir para todos os iniciadores: um ciclo de 94°C por 5 min para desnaturamento inicial, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s para desnaturamento, 66°C por 1 min para anelamento e 72°C por 1 min para extensão. Por fim, um ciclo de 72°C por 7 min para extensão final. As reações continham 1,5 mmol l⁻¹ de MgCl₂; 0,2 mmol l⁻¹ de cada dNTP; 2 μmol l⁻¹ para todos os iniciadores utilizados; 1,26 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); aproximadamente 50 ng μl⁻¹ de DNA; e água Milli-Q[®] autoclavada para um volume final de 12 μl. Nas reações em que se utilizaram suspensões bacterianas (2 μl com concentração aproximada de 5 × 10⁸ UFC ml⁻¹), foram mantidas as mesmas concentrações dos reagentes e mesmo volume final. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose (1,5%) após eletroforese em tampão TBE (Tris – Ácido Bórico – EDTA) a 0,5 X, conduzida a 100 V por 2 horas, e registrados em fotodocumentador L-PIX ST (Loccus Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil). Para cada isolado, cada reação foi repetida pelo menos duas vezes.

Especificidade dos iniciadores em PCR convencional

Os ensaios foram realizados utilizando-se 209 isolados (Tabelas 1 e 2). Para verificar a especificidade, os iniciadores foram testados para suas respectivas espécies, bem como para isolados de outras bactérias e fungos fitopatogênicos ao tomateiro e outros hospedeiros (Tabela 2). No caso das espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha-bacteriana, cada par de iniciadores foi testado com 10 isolados das outras três espécies não correspondentes ao iniciador específico. Os iniciadores também foram testados com DNA de bactérias epífitas e/ou endofíticas provenientes de folhas de tomate cultivado em campo. Finalmente, todos os

iniciadores foram avaliados com DNA extraído de folhas de tomateiro não inoculado cultivado em casa de vegetação. (variedades Yuba, Floradade e Ponderosa).

Sensibilidade dos iniciadores específicos em PCR convencional

Para a determinação da sensibilidade dos iniciadores, foram utilizados os seguintes isolados: *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2363, EH 2009-46), *X. vesicatoria* (IBSBF 2364, EH 2010-41), *X. perforans* (IBSBF 2370, EH 2008-13) e *X. gardneri* (IBSBF 2373, EH 2010-42). A sensibilidade de cada par de iniciadores foi avaliada utilizando DNA purificado e suspensões bacterianas (2 µl). Gradientes de concentração entre 50 ng µl⁻¹ e 0,5 pg µl⁻¹ para DNA purificado e entre 5 × 10⁸ UFC ml⁻¹ e 5 UFC ml⁻¹ para suspensão bacteriana, obtidos por meio de diluições seriadas na ordem de 10 vezes, foram utilizados. Cada diluição foi testada em três sub-amostras por isolado (dois de cada espécie). A PCR foi repetida duas vezes.

Protocolo para PCR multiplex

Tal como aplicado para a PCR convencional, gradientes de concentração de DNA purificado e suspensões bacterianas foram utilizados nos testes de PCR *multiplex*.

Os volumes finais das reações variaram de acordo com a combinação iniciadores/DNA das diferentes espécies, variando de 46 a 52 µl. Assim, as reações utilizadas na PCR *multiplex* continham 4,8 µl de tampão 1 X; 1,44 µl de MgCl₂ (1,5 – 1,33 mmol l⁻¹); 3,84 µl de dNTPs (0,2 – 0,18 mmol l⁻¹ de cada dNTP); 19,2 µl de uma combinação dos quatro pares de iniciadores específicos (2,0 – 1,77 µmol l⁻¹ de cada iniciador); 1 µl de *Taq* DNA Polimerase (1,26 – 1,11 U); 13,72 µl de água Milli-Q[®] autoclavada; e alíquotas de 2 µl de DNA ou suspensão bacteriana.

A Bio-PCR (Schaad *et al.* 1995) foi utilizada na tentativa de aumentar a sensibilidade do método (Guo *et al.* 2000). O enriquecimento foi realizado em meio AN a partir de diferentes concentrações das suspensões bacterianas de cada uma das quatro espécies. As placas foram incubadas a 28°C durante 48 horas e as colônias foram lavadas com 1 ml de água esterilizada. Uma amostra de 2 µl do líquido resultante da lavagem das placas foi utilizada para a PCR. Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose (3,0%) por eletroforese em tampão TBE 0.5X, conduzida a 100 V durante 2 horas e 30 minutos. A captura das imagens ocorreu como descrita anteriormente.

Detecção de *Xanthomonas* spp. em folhas sintomáticas

O potencial diagnóstico dos diferentes métodos de PCR (convencional e *multiplex*) para detectar diretamente as espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha-bacteriana foi avaliado em plantas de tomate com 4 a 5 folhas verdadeiras (variedade Yuba) inoculadas artificialmente. Os seguintes isolados foram utilizados: *X. euvesicatoria*, EH 2009-46; *X. vesicatoria*, EH 2010-41; *X. perforans*, EH 2008-13 e *X. gardneri*, EH 2010-42. Suspensões bacterianas (5×10^8 UFC ml⁻¹) foram preparadas em solução de sulfato de magnésio (10 mmol l⁻¹) e homogeneamente pulverizadas na superfície das folhas (duas plantas para cada isolado) até o início do escorrimento. Em seguida, as plantas foram incubadas, durante 48 horas, em sacos plásticos previamente umedecidos com água para simulação de câmara úmida. O aparecimento de sintomas ocorreu entre 7 e 10 dias após a inoculação, momento no qual folíolos sintomáticos foram coletados para os procedimentos da PCR.

Lesões individuais foram maceradas em 200 µl de água destilada esterilizada. O extrato bruto e suas diluições em 1:10, 1:100 e 1:1000 foram utilizados tanto no protocolo de PCR convencional como no *multiplex*. Os fragmentos de DNA foram separados em géis de agarose a 1,5% (PCR convencional) ou 3,0% (PCR *multiplex*). Para cada amostra, cada reação foi repetida pelo menos duas vezes.

Resultados

Especificidade dos iniciadores específicos em PCR convencional

Os quatro pares de iniciadores testados amplificaram fragmentos de DNA apenas de suas respectivas espécies alvo. Um total de 164 isolados (31 de *Xanthomonas euvesicatoria*; 31 de *X. vesicatoria*; 51 de *X. perforans* e 51 de *X. gardneri*), incluindo isolados brasileiros e referências (Tabela 1; Figura 1), foram testados. Não houve amplificação para nenhum outro fitopatógeno testado nem para nenhum isolado representante das populações endofíticas/epifíticas do tomateiro (Tabela 2). Da mesma forma, as amostras de DNA e extratos de folhas de tomate não inoculado não foram amplificados pelos iniciadores específicos.

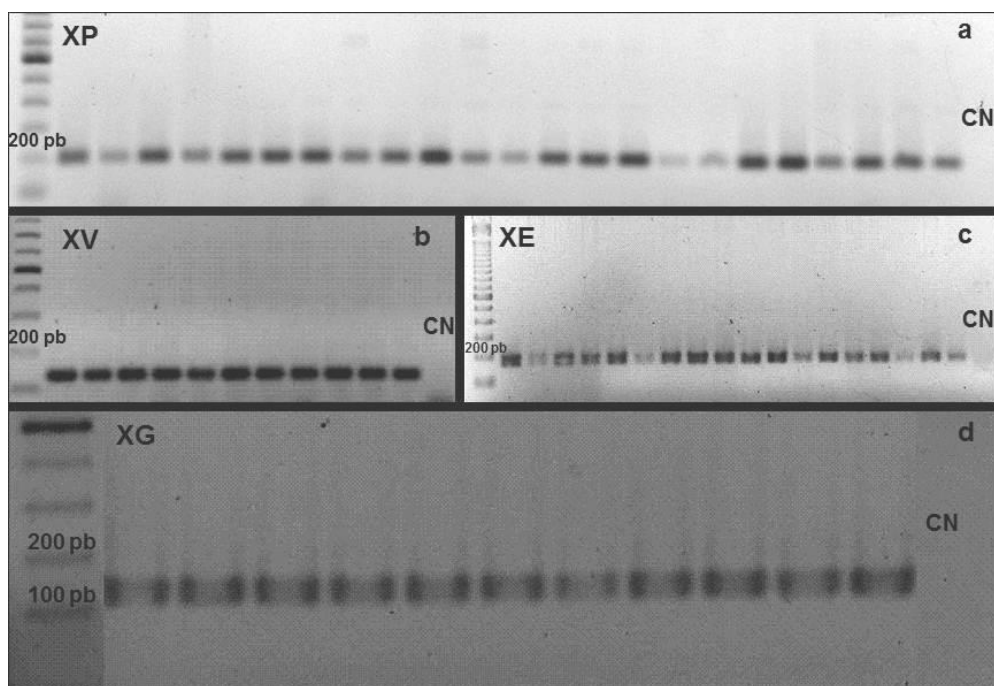


Figura 1. Fragmentos de DNA amplificados de diferentes espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro obtidos com iniciadores específicos. a - *X. perforans* com o par de iniciadores Bs-XpF/Bs-XpR; b - *X. vesicatoria* com o par de iniciadores Bs-XvF/Bs-XvR; c - *X. euvesicatoria* com o par de iniciadores Bs-XeF/Bs-XeR; d - *X. gardneri* com o par de iniciadores Bs-XgF/Bs-XgR. CN – controle negativo; Marcadores moleculares (100 pb DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA) em b e d; 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, em a e c).

Tabela 2. Especificidade dos iniciadores específicos (Koenraad *et al.* 2009) desenvolvidos para *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro.

Amostras de DNA	Iniciadores Específicos				
	Hospedeiro	Bs-XeF/ XeR	Bs-XvF/ XvR	Bs-XpF/ XpR	Bs-XgF/ XgR
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>					
EH 36P; EH 37P; EH 38P; EH 1996-210; EH 1996-211; EH 1996-212; EH 1996-213; EH 1996-220; EH 2009-46; EH 2009-47; IBSBF 2363	Tomate/Pimentão	+	-	-	-
<i>X. vesicatoria</i>					
EH 1995-95; EH 1995-96; EH 1995-99; EH 1995-101; EH 2008-169; EH 2008-170; EH 2010-01; EH 2010-41; EH 2009-42; EH 2010-59; IBSBF 2364	Tomate	-	+	-	-
<i>X. perforans</i>					
EH 2005-54; EH 2006-44; EH 2009-136; EH 2009-143; EH 2009-148; EH 2009-149; EH 2010-49; EH 2010-60; EH 2010-61; EH 2010-93; IBSBF 2370	Tomate	-	-	+	-

<i>X. gardneri</i> EH 2006-17; EH 2006-21; EH 2006-52; EH 2010-38; EH 2010-42; EH 2010-44; EH 2010-65; EH 2010-67; EH 2010-73; EH 2010-74; IBSBF 2373	Tomate	-	-	-	+
<i>X. raphani</i> , IAPAR 11300; IBSBF 1590	<i>Brassica</i> sp.				
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> , UnB 828	<i>Brassica</i> sp.				
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> , UnB 1159	Mandioca				
<i>X. campestris</i> pv. <i>vitians</i> , UnB 1079; UnB 110; UnB 830	Alface				
<i>X. citri</i> pv. <i>anacardiü</i> , IBSBF 2579	Caju				
<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i> , UnB 1318	Uva				
<i>X. citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> , IBSBF 2586	Manga				
<i>Pseudomonas marginalis</i> , IBSBF 1240	Tomate				
<i>P. cichorii</i> , IBSBF 402; IBSBF 1748; UnB 1142	Tomate				
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , IBSBF 451; IBSBF 375; IBSBF 281	Tomate/Lilás				
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> , IBSBF 836; IBSBF 432; EH 75	Tomate			Não	
<i>Pseudomonas viridiflava</i> , IBSBF 1464	Tomate			Amplificaram	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , UnB 1138	Tomate				
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> , UnB 1151	Tomate				
<i>Ralstonia solanacearum</i> , UnB 1273	Tomate				
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> , 646-2	Melão				
<i>Erwinia chrysanthemi</i> , UnB 336	Acelga				
<i>Erwinia psidii</i> , IBSBF 1347; IBSBF 453	Goiaba				
<i>Pectobacterium carotovorum</i> , UnB 1036	Nabo				
<i>Alternaria solani</i> , IBSBF 1940	Tomate				
<i>Corynespora cassiicola</i> , IBSBF 1828	Tomate				
<i>Stemphylium</i> sp., EH 502	Tomate				
Unknown epiphytic and/or endophytic bacteria (13) DNA tomate	Tomate				
					-

+ = amplificaram; - = não amplificaram

Sensibilidade dos iniciadores específicos em PCR convencional

Quando os iniciadores foram testados individualmente com o DNA purificado de suas respectivas espécies alvo, o limiar de detecção foi de 50 pg μl^{-1} para os quatro pares de iniciadores (Tabela 3). No entanto, quando suspensões bacterianas foram utilizadas na composição da reação, observaram-se diferenças de sensibilidade entre os iniciadores. Os iniciadores Bs-XeF/Bs-XeR específicos para *X. euvesicatoria* e Bs-XpF/Bs-XpR para *X. perforans* detectaram suas respectivas espécies alvo numa suspensão bacteriana com concentração de até 5×10^2 UFC ml^{-1} , o que corresponde a uma célula bacteriana por reação. Os iniciadores específicos de *X. vesicatoria* e *X. gardneri*, Bs-XvF/Bs-XvR e Bs-XgF/Bs-XgR, respectivamente, foram menos sensíveis, amplificando o DNA alvo de suspensões bacterianas

com o mínimo de 5×10^4 UFC ml⁻¹, ou o equivalente a 100 células bacterianas por reação (Figura 2).

Protocolo para PCR multiplex

Foi possível realizar a detecção e identificação individual das espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha-bacteriana utilizando PCR *multiplex*, aplicando as mesmas condições utilizadas para a PCR convencional (Figura 3). De acordo com as combinações de espécies utilizadas, foram obtidos os fragmentos de DNA esperados tanto quando utilizou-se DNA purificado como para suspensões bacterianas por meio de PCR *multiplex*.

Quanto à sensibilidade da PCR *multiplex*, o limiar de detecção utilizando DNA purificado de única espécie foi de 50 pg µl⁻¹. No entanto, ao usar suspensões bacterianas, constataram-se menores níveis de sensibilidade. Para superar esta sensibilidade reduzida, uma etapa de enriquecimento (Bio-PCR) foi utilizada e os limiares de detecção para cada uma das quatro espécies foram similares aos encontrados na PCR convencional (Tabela 3). Foi possível detectar os quatro patógenos em suspensões bacterianas com concentrações entre 5×10^2 a 5×10^4 UFC ml⁻¹, dependendo da espécie, 48 horas após a etapa de enriquecimento. Quando foram testadas todas as espécies em um único PCR *multiplex*, foi observada uma menor sensibilidade na detecção simultânea dos patógenos tanto para DNA purificado como para suspensões bacterianas.

Detecção de *Xanthomonas* spp. em folhas sintomáticas

Foi possível detectar e identificar as espécies de *Xanthomonas* inoculadas em plantas de tomateiro usando a PCR convencional e a PCR *multiplex* (Figura 4). Em geral, os extratos brutos das folhas sintomáticas inibiram a PCR, dificultando a detecção, mas a partir da primeira diluição (1:10) até a diluição de 1:1000 foi possível fazer a detecção desses patógenos utilizando os dois métodos aqui propostos.

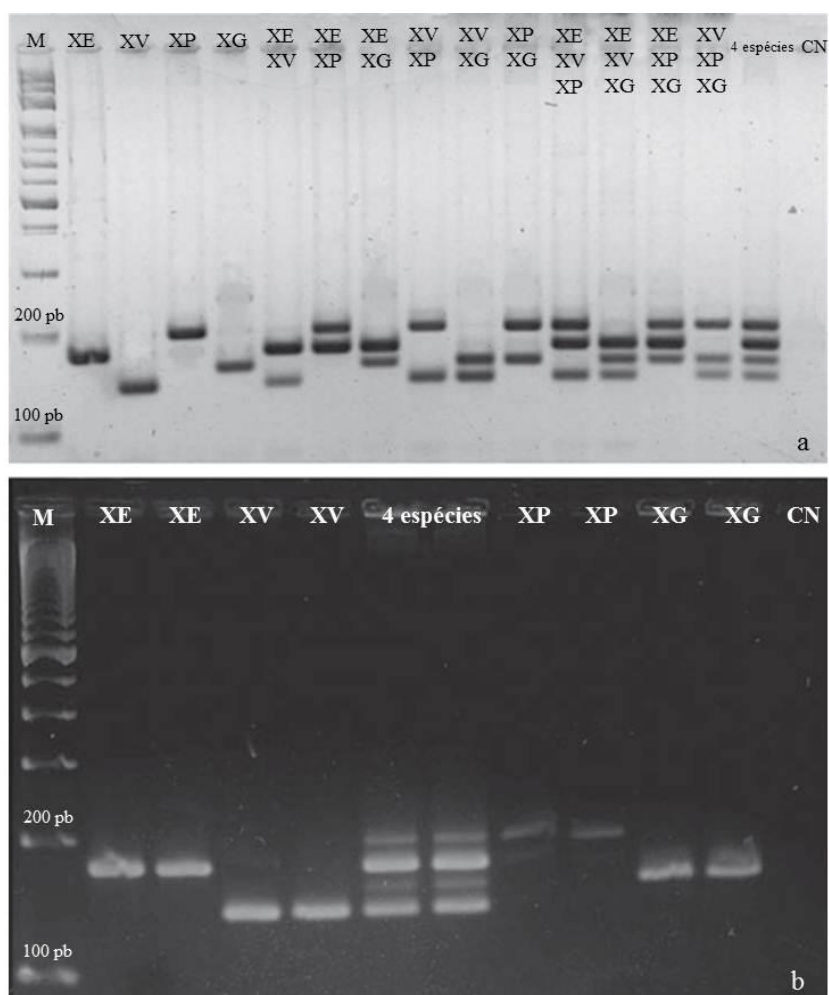


Figura 2. Fragmentos de DNA amplificados de diferentes espécies de *Xanthomonas* por PCR *multiplex*. a - diferentes combinações de DNA purificado (50 ng ml^{-1}) das quatro espécies; b - fragmentos obtidos usando suspensões bacterianas ($5 \times 10^8 \text{ UFC ml}^{-1}$). XE - *Xanthomonas euvesicatoria*; XV - *X. vesicatoria*; XP - *X. perforans*; XG - *X. gardneri*; CN - Controle negativo; M - marcadores moleculares (a - 100 pb DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA; b - 1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Discussão

Desde o reconhecimento da diversidade genética entre as espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha-bacteriana do tomateiro (Lazo e Gabriel, 1987; Vauterin *et al.* 2000), ferramentas bioquímicas e moleculares foram desenvolvidas para diferenciar corretamente as espécies. A diferenciação baseada em métodos bioquímicos foi proposta por Jones *et al.* (1998), mas o aparecimento de novas estirpes distintas podem impedir a adequada identificação em nível de espécie. Recentemente, por exemplo, Hamza *et al.* (2010) relataram um novo tipo de *X. euvesicatoria* fortemente amilolítica, característica anteriormente atribuída apenas a *X. vesicatoria* e *X. perforans*.

Análises de restrição enzimática (Leite Júnior *et al.* 1994, 1995) e de rep-PCR (Bouzar *et al.* 1994, 1999; Pereira *et al.* 2011) foram utilizadas para caracterizar *Xanthomonas* spp. que causam a mancha-bacteriana, mas esses métodos normalmente requerem DNA purificado de boa qualidade e eletroforese em gel para obtenção de perfis genômicos (*fingerprints*) com alta resolução e reprodutibilidade (Ishii e Sadowsky 2009). Young *et al.* (2008), utilizando análise por sequências multilocus – *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA), propuseram que as espécies *X. perforans* e *X. euvesicatoria* fossem tratadas como sinônimos. MLSA associada a rep-PCR parecem ser interessantes técnicas para estudos epidemiológicos (López *et al.* 2006; Feng *et al.* 2009). Mais recentemente, Potnis *et al.* (2011) apresentaram e compararam as sequências genômicas completas das quatro espécies que causam a mancha-bacteriana do tomateiro e afirmaram se tratarem de quatro agentes realmente distintos. O sequenciamento de DNA é uma técnica poderosa para descrição e propostas de reclassificação de espécies bacterianas, mas ainda está associada a um alto custo e equipamentos especializados quando comparada às demais técnicas moleculares. Além disso, a técnica não é sempre adequada para diagnóstico de rotina.

Iniciadores específicos foram utilizados com sucesso para diagnose de doenças bacterianas de plantas causadas por *Xanthomonas* spp. (Pan *et al.* 1999; Park *et al.* 2006). Os iniciadores RST 65/69 desenvolvidos por Leite Júnior *et al.* (1995) amplificam o DNA das quatro espécies (correspondentes aos grupos genéticos A, B, C e D) associadas à mancha-bacteriana. Porém, um fragmento de DNA de mesmo tamanho (420 pb) é amplificado não só para as espécies causadoras da mancha-bacteriana, mas também para outras espécies de *Xanthomonas*. Logo, uma análise de restrição enzimática, como etapa adicional à PCR, deve ser realizada com um conjunto de enzimas (*CfoI*, *HaeIII* ou *TaqI*) para a diferenciação das espécies, o que torna a identificação mais onerosa e demorada.

Os iniciadores específicos desenvolvidos por Cuppels *et al.* (2006), nomeados como BSX 1/2, permitiram detectar três das quatro espécies envolvidas no complexo, produzindo fragmentos de 579 pb, mas não o grupo C, atualmente *X. perforans*. Vale mencionar aqui os iniciadores desenhados por Moretti *et al.* (2009), específicos para *X. euvesicatoria* e aqueles desenhados por Astua-Monge *et al.* (2000), específicos para *X. perforans*, que são altamente específicos para suas respectivas espécies alvo.

Os iniciadores específicos desenvolvidos por Koenraadt *et al.* (2009) e utilizados no presente estudo, foram validados pelos autores com isolados de *X. euvesicatoria*, uma vez que essa era a espécie predominante nos Estados Unidos (Jones *et al.* 1998). No presente trabalho,

os quatro pares de iniciadores (BS-XeF/R, BS-XvF/R, BS-XpF/R e BS-XgF/R) foram validados com êxito com 164 representantes de isolados brasileiros de *Xanthomonas* associados à mancha-bacteriana, provenientes de diferentes estados do país. *Xanthomonas gardneri* e *X. perforans* foram representadas por um maior número de isolados neste estudo devido à sua maior frequência de ocorrência em campos de tomate no Brasil (Quezado-Duval *et al.* 2004; Araújo *et al.* 2011; Pereira *et al.* 2011).

A utilização desses iniciadores permitiu o estabelecimento de um protocolo adicional, como o PCR *multiplex*, que pode ser empregado em procedimentos diagnósticos da mancha-bacteriana. No entanto, é importante salientar a necessidade de otimização da PCR *multiplex* para uma melhor eficiência do método. A correta identificação das espécies a partir de amostras sintomáticas provenientes do campo devem acelerar o processo diagnóstico e com isso, permitir a aplicação de medidas de controle mais eficientes.

O limiar de detecção de cada par de iniciadores em PCR convencional foi equivalente a alguns limiares já relatados para detecção de outras fitobactérias. Exemplos são os iniciadores desenhados para outras espécies de *Xanthomonas* (Hartung *et al.* 1993; Manulis *et al.* 1994; Pothier *et al.* 2011), com sensibilidade para detecção em suspensões bacterianas, semelhante ou melhor à encontrada aqui. Por outro lado, quando se utiliza o DNA purificado, a sensibilidade de outros iniciadores específicos já publicados (TXT/TXT4R ; RST2/Xcv3R) para *Xanthomonas* spp. (Sakthivel *et al.* 2001; Trindade *et al.* 2007) foi maior, com limites de até 55 fg.

Usando PCR *multiplex* seguida por separação dos fragmentos de DNA em gel de agarose 3,0%, com isolados de referência como controles positivos, foi possível identificar quando as quatro espécies de *Xanthomonas* estavam presentes na mesma amostra. O principal objetivo do método *multiplex* é a detecção e identificação, em uma única etapa, de um ou mais dos agentes causadores da mancha-bacteriana, conferindo agilidade ao diagnóstico. Além disso, dependendo da presença ou prevalência de uma ou mais espécies em uma região ou campo específico, o protocolo pode ser ajustado para diferentes formatos, tais como um *duplex* ou *triplex* PCR.

A sensibilidade da PCR *multiplex* foi reduzida quando se usou uma combinação das espécies em comparação a sensibilidade observada para uma única espécie. Sabe-se que fatores como a concentração de reagentes da PCR podem favorecer a amplificação de uma espécie em prejuízo de outra (Henegariu *et al.* 1997). No presente trabalho, as concentrações dos reagentes da PCR variaram ligeiramente, dependendo das combinações de espécies. Assim, testes

adicionais são recomendados para definir as concentrações ideais que levem a um limite de sensibilidade similar para as quatro espécies neste formato de PCR. No entanto, quando houve uma etapa de enriquecimento em meio AN, o limiar de detecção foi reduzido. Sabe-se que a Bio-PCR pode melhorar o limiar de detecção de iniciadores específicos, como descrito por Wang *et al.* (1999) para *Xanthomonas albilineans*. Assim, a Bio-PCR *multiplex* poderia ser utilizada como um método para a detecção de células bacterianas viáveis e simultaneamente identificar as espécies causadoras da mancha-bacteriana, até o momento descritas, em mudas assintomáticas de viveiros ou extratos de sementes. O método pode ainda ser útil, uma vez que esses tipos de amostras estão normalmente associados a baixas concentrações de células bacterianas. Além disso, dependendo da origem, outras espécies de *Xanthomonas* podem estar presentes nas amostras (Pernezny e Collins, 1997), o que dificulta o diagnóstico apenas com base na morfologia das colônias.

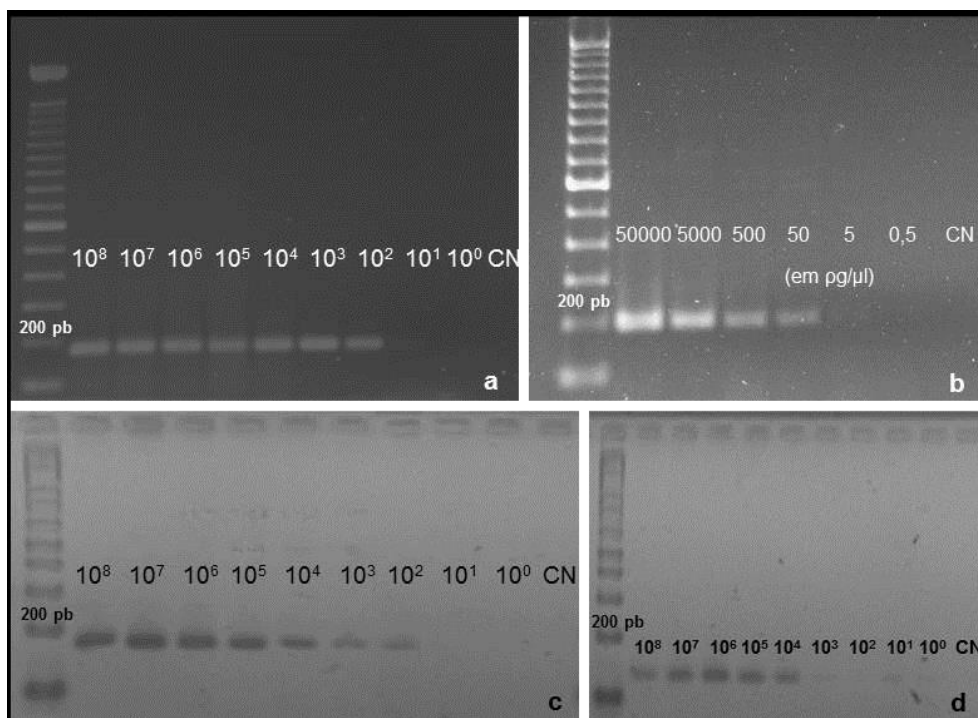


Figura 3. Sensibilidade dos iniciadores específicos de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro em PCR convencional e PCR *multiplex*. a – sensibilidade dos iniciadores Bs-XeF/Bs-XeR para *X. euvesicatoria* utilizando suspensões bacterianas em PCR *multiplex*; b – sensibilidade dos iniciadores Bs-XpF/Bs-XpR para *X. perforans* utilizando DNA purificado em PCR convencional; c – sensibilidade dos iniciadores Bs-XeF/Bs-XeR para *X. euvesicatoria* utilizando suspensões bacterianas em PCR convencional; d – sensibilidade dos iniciadores Bs-XvF/Bs-XvR para *X. vesicatoria* utilizando suspensões bacterianas em PCR convencional. CN – controle negativo.

A sensibilidade da PCR *multiplex* na presença das quatro espécies foi considerada baixa. O uso de PCR com um *hot start* (Chou *et al.* 1992) ou o uso de *nested*-PCR (Robène- Soustrade *et al.* 2010) aumentou a eficiência e sensibilidade da técnica de PCR *multiplex* nos respectivos relatos. Esses processos tem sido eficazes na redução de fatores de inibição da PCR, como a formação de *primer dimers* (ligações entre os próprios iniciadores), que podem ocorrer antes do início dos ciclos de temperatura do termociclador (4-25°C). Ajustes relacionados às concentrações de reagentes, tais como iniciadores, cloreto de magnésio e *Taq* DNA polimerase devem ser otimizados, uma vez que eles tem uma forte influência sobre a qualidade e reprodutibilidade da PCR *multiplex* (Henegariu *et al.* 1997). No entanto, a ocorrência natural das quatro espécies em uma única amostra ou campo não parece ser uma situação comum (Quezado-Duval *et al.* 2004, 2005).

Tabela 3. Sensibilidade dos iniciadores específicos de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro e pimentão utilizando dois métodos de PCR.

Método	Limiar de Detecção				
	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>X. perforans</i>	<i>X. gardneri</i>	Todas Espécies
	Suspensão Bacteriana (UFC ml ⁻¹)				
PCR convencional	5 × 10 ²	5 × 10 ⁴	5 × 10 ²	5 × 10 ⁴	-
PCR <i>Multiplex</i> *	5 × 10 ²	5 × 10 ⁴	5 × 10 ²	5 × 10 ⁴	5 × 10 ⁷
	DNA Purificado (µg µl ⁻¹)				
PCR convencional	50	50	50	50	-
PCR <i>Multiplex</i>	50	50	50	50	50000

*Concentração inicial de suspensões bacterianas que foram detectados depois de uma etapa de enriquecimento em meio AN para 48h (Bio-PCR).

- = não se aplica.

O protocolo *multiplex* ainda parece ser adequado para a detecção de uma única espécie bacteriana em uma amostra, situação essa a mais corriqueira. Além disso, a detecção direta em folhas sintomáticas foi realizada com sucesso na primeira diluição do extrato bruto das folhas (1:10), tanto por PCR convencional como por *multiplex*, mesmo na presença de inibidores da PCR nesse tipo de amostra (Xin *et al.* 2003). No entanto, o protocolo de PCR *multiplex* aqui apresentado necessita ser otimizado para obtenção de melhores resultados de sensibilidade.

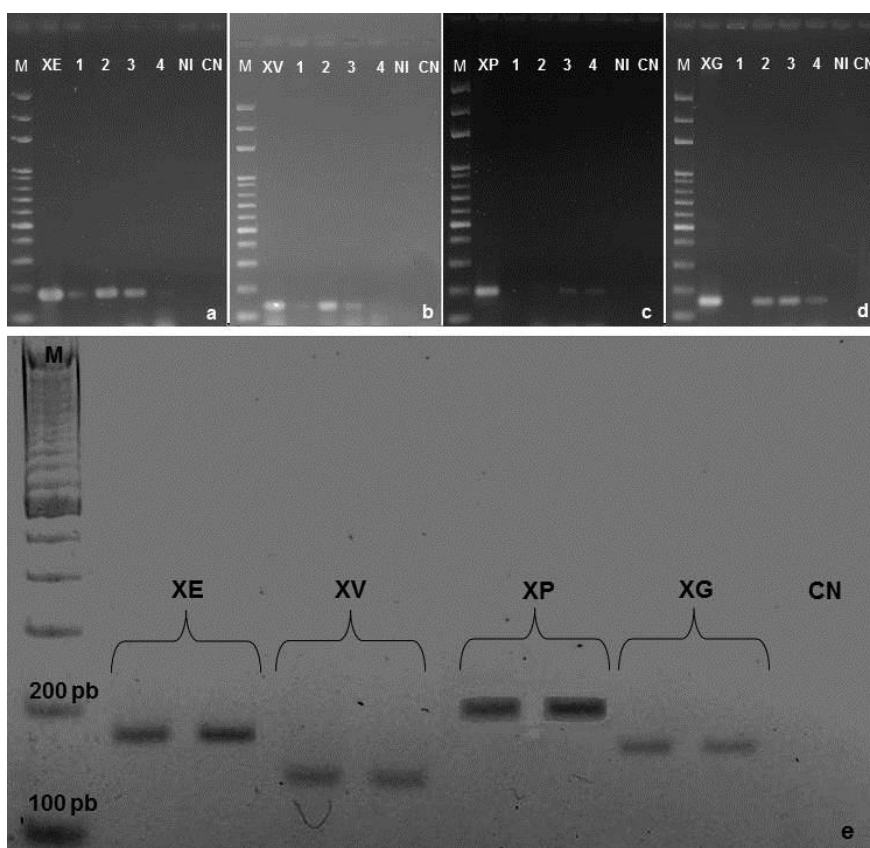


Figura 4 Detecção de espécies de *Xanthomonas* em folhas sintomáticas de tomateiro 8 dias após a inoculação. a, b, c, d – PCR convencional utilizando iniciadores específicos para *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*, respectivamente. 1 – extrato bruto de folhas sintomáticas de tomate; 2 – diluição (1: 10) do extrato bruto de folhas sintomáticas; 3 – diluição (1: 100) do extrato bruto de folhas sintomáticas; 4 – diluição (1: 1000) do extrato bruto de folhas sintomáticas; e – PCR *multiplex* a partir da diluição do extrato bruto (1: 10) de folhas sintomáticas de tomate; NI – tomate não inoculado; CN – controle negativo; XE – *Xanthomonas euvesicatoria*; XV – *X. vesicatoria*; XP – *X. perforans*; XG – *X. gardneri*; M – marcador molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen).

Neste capítulo, descreveu-se um método para ser testado e aplicado em diagnoses laboratoriais de rotina, podendo posteriormente ser comparada sua eficiência com métodos já estabelecidos, tais como isolamento em meios seletivos/semi-seletivos como Tween B e CKTM (McGuire *et al.* 1986; Sijam *et al.* 1991), testes bioquímicos e/ou métodos moleculares que geram *fingerprints*. Além disso, a técnica de PCR *multiplex* poderá ser utilizada para investigar a ocorrência de *Xanthomonas* spp. que sobrevivem epifiticamente em mudas assintomáticas, que por sua vez, podem servir como fontes de inóculo primário para infecções de campo.

Referências

- Araújo, E.R., Costa, J.R., Pontes, N.C., Mazutti, J., Ferreira, M.A.S.V., Quezado-Duval, A.M. 2011. Prevalence of *Xanthomonas perforans* associated with bacterial spot in processing tomato crops in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 36 (Suppl.):697.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Davis, M.J., Bonas, U., Jones, J.B. 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.
- Berg, T., Tesoriero, L., Hailstones, D.L. 2006. A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. *Letters in Applied Microbiology* 42:624–630.
- Bouzar, H., Jones, J.B., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Scott, J.W. 1994. Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. *Phytopathology* 84:39–44.
- Bouzar, H., Jones, J.B., Stall, R.E., Louws, F.J., Schneider, M., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J., Jackson, L.E. 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.
- Chou, Q., Russel, M., Birch, D.E., Raymond, J., Bloch, W. 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves lowcopy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* 11:1717–1723.
- Cuppels, D.A., Louws, F.J., Ainsworth, T. 2006. Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Disease* 4:451–458.
- Feng, J., Schuenzel, E.L., Li, J., Schaad, N.W. 2009. Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 99:913–920.
- Guo, X., Chen, J., Beuchat, L.R., Brackett, R.E. 2000. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hila*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:5248–5252.

- Hamza, A.A., Robène-Soustrade, I., Boyer, C., Laurent, A., Jouen, E., Wicker, E., Prior, P., Pruvost, O., Dottin, M. 2010. A new type of strain of *Xanthomonas euvesicatoria* causing bacterial spot of tomato and pepper in Grenada. *Plant Disease* 94:1264.
- Hartung, J.S., Daniel, J.F., Pruvost, O.P. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the Polymerase Chain Reaction Method. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1143–1148.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23:504–511.
- Ishii, S., Sadowsky, M.J. 2009. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental Microbiology* 11:733–740.
- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., Zitter, T.A. 1991. *Compendium of Tomato Diseases*. 73 p. St Paul: APS Press.
- Jones, J.B., Stall, R.E., Bouzar, H. 1998. Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annual Review of Phytopathology* 36:41–58.
- Jones, J.B., Bouzar, H., Stall, R.E., Almira, E.C., Roberts, P.D., Bowen, B.W., Sudberry, J, Strickler, P.M., 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, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., Schaad, N.W. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27:755–762.
- Koenraad, H., van Betteray, B., Germain, R., Hiddink, G., Jones, J.B., 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.
- Lazo, G.R., Gabriel, D.W. 1987. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology* 77:448–453.

- Leite Júnior, R.P., Minsavage, G.V., Bonas, U., Stall, R.E. 1994. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Applied and Environmental Microbiology 60:1068–1077.
- Leite Júnior, R.P., Jones, J.B., Somodi, G.C., Minsavage, G.V., Stall, R.E. 1995. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. Plant Disease 79:917–922.
- López, R., Asensio, C., Gilbertson, R.L. 2006. Phenotypic and genetic diversity in strains of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) in a secondary center of diversity of the common bean host suggests multiple introduction events. Phytopathology 96:1204–1213.
- Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., de Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology 85:528–536.
- Mahuku, G.S. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. Plant Molecular Biology Reporter 22:71–81.
- Manulis, S., Valinsky, L., Lichter, A., Gabriel, D.W. 1994. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. Applied and Environmental Microbiology 60:4094–4099.
- McGuire, R.G., Jones, J.B., Sasser, M. 1986. Tween media for semi-selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. Plant Disease 70:887–891.
- Moretti, C., Amatulli, M.T., Buonauro, R. 2009. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. Letters in Applied Microbiology 49:466–471.
- Özdemir, Z. 2005. Development of a multiplex PCR assay for concurrent detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. Plant Pathology Journal 4:133–137.

- Özdemir, Z. 2009. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* using pure cultures. *Journal of Plant Pathology* 91:495–497.
- Pan, Y.-B., Grisham, M.P., Burner, D.M., Legendre, B.L., Wei, Q. 1999. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. *Plant Disease* 83:218–222.
- Park, D.S., Hyun, J.W., Park, Y.J., Kim, J.S., Kang, H.W., Hahn, J.H., Go, S.J. 2006. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences. *Microbiological Research* 161:145–149.
- Pereira, R.C., Araújo, E.R., Ferreira, M.A.S.V., Quezado-Duval, A.M. 2011. Occurrence of *Xanthomonas* species causing bacterial spot in fresh market tomato fields in Brazil. *Acta Horticulturae* 914:61–64.
- Pernezny, K., Collins, J. 1997. Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper: relationships to host-plant resistance and exposure to copper sprays. *Plant Disease* 81:791–794.
- Pothier, J.F., Pagani, M.C., Pelludat, C., Ritchie, D.F., Duffy, B. 2011. A duplex PCR method for species- and pathovar-level identification and detection of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Journal of Microbiological Methods* 86:16–24.
- Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N.F., Patil, P.B., Ryan, R.P., Sharlach, M., Behlau, F., Dow, J.M., Momol, M.T., White, F.F., Preston, J.F., Vinatzer, B.A., Koebnik, R., Setubal, J.C., Norman, D.J., Staskawicz, B.J., Jones, J.B. 2011. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics* 12:146.
- Pulawska, J., Willems, A., Sobicsewski, P. 2006. Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Systematic and Applied Microbiology* 29:470–479.
- Quezado-Duval, A.M., Lopes, C.A. 2010. Mancha-bacteriana: Uma Atualização Para o Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. 28p. Brasília: Embrapa Hortaliças, (Circular Técnica 84).

Quezado-Duval, A.M., Leite Júnior, R.P., Truffi, D., Camargo, L.E.A. 2004. Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in Central-West Brazil. *Plant Disease* 88:157–161.

Quezado-Duval, A.M., Lopes, C.A., Leite Júnior, R.P., Lima, M.F., Camargo, L.E.A. 2005. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. *Acta Horticulturae* 695:101–108.

Robène-Soustrade, I., Legrand, D., Gagnevin, L., Chiroleu, F., Laurent, A., Pruvost, O. 2010. Multiplex nested PCR for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* from onion seeds. *Applied and Environmental Microbiology* 76:2697–2703.

Sakthivel, N., Mortensen, C.N., Mathur, S.B. 2001. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56:435–441.

Schaad, N.W., Cheong, S.S., Tamaki, S., Hatziloukas, E., Panopoulos, N.J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85:243–248.

Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. St Paul: American Phytopathological Society Press.

Sijam, K., Chang, C.J., Gitaitis, R.D. 1991. An agar medium for isolation and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from seed. *Phytopathology* 81:831–834.

Trindade, L.C., Marques, E., Lopes, D.B., Ferreira, M.A.S.V. 2007. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Summa Phytopathologica* 33:16–23.

Vauterin, L., Rademaker, J., Swings, J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genera *Xanthomonas*. *Phytopathology* 90:677–682.

Wang, Z.K., Comstock, J.C., Hatziloukas, E., Schaad, N.W. 1999. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. *Plant Pathology* 48:245–252.

Wilson, K. 1999. Preparation of genomic bacteria. In *Short Protocols in Molecular Biology* ed. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. pp. 2–14. New York: John Wiley.

Xin, Z., Velten, J.P., Oliver, M.J., Burke, J.J. 2003. Highthroughput DNA extraction method suitable for PCR. *Biotechniques* 34:820–826.

Young, J.M., Park, D.C., Shearman, H.M., Fargier, E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* 31:366–377.

CAPÍTULO 3

Severidade da mancha-bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*, difere entre as espécies em função da temperatura e molhamento foliar

Severidade da mancha-bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*, difere entre as espécies em função da temperatura e molhamento foliar

Resumo

A temperatura e o molhamento foliar são componentes ambientais que interferem no estabelecimento de doenças foliares de plantas. O efeito desses elementos na severidade da mancha-bacteriana do tomateiro, ocasionada por *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri* ainda não foi investigado. Para estudar esse efeito, quantificou-se a severidade da mancha-bacteriana causada por essas espécies, separadamente. Paralelamente, verificou-se o efeito *in vitro* da temperatura na taxa de crescimento desses patógenos. Plantas de tomateiro suscetível foram inoculadas com *X. perforans* ou *X. gardneri* e submetidas aos seguintes regimes de temperatura e molhamento foliar respectivamente: 15; 20; 25; 30; 35°C e 0; 6; 12; 24; 48 horas. Dez dias após a inoculação, a doença foi quantificada. Para estimar a severidade da doença, foi utilizado o modelo de regressão múltipla. A temperatura e o molhamento foliar, bem como a interação entre ambos tiveram efeito significativo sobre a severidade da doença causada por *Xanthomonas perforans*, que incrementou os valores de severidade em função da elevação da temperatura. Por sua vez, para *X. gardneri*, limites máximos (30°C) e mínimos de temperatura (15°C) delimitaram a faixa térmica de incidência da doença. De acordo com a análise de regressão múltipla, para representar a relação entre a severidade estimada (S) e as variáveis temperatura (T) e molhamento foliar (M), foram obtidas as seguintes equações para *X. perforans* e *X. gardneri* respectivamente: $S = 4,46 - 0,36*T - 0,1*M + 0,007*T^2 + 0,0056*TM$ ($R^2 = 0,83$; $P \leq 0,05$) e $S = 3,61 + 0,31*T + 0,02*M - 0,006*T^2$ ($R^2 = 0,54$; $P \leq 0,05$). Foi necessário um período mínimo de 12 horas de molhamento foliar para incitação da doença para ambas as espécies, sendo que, quanto maior o período de molhamento, maior foi a severidade. Nenhuma das duas espécies ocasionou doença a 15°C. A temperatura exerceu efeito significativo na taxa de multiplicação de *X. perforans*, que é favorecida por temperaturas iguais ou superiores a 25°C. Para *X. gardneri* não foi observado esse efeito nos períodos avaliados. Conhecer o comportamento dessas espécies em diferentes condições climáticas pode auxiliar nas tomadas de decisão para o manejo da doença.

Palavras-chave: crescimento populacional; molhamento foliar; *Solanum lycopersicum*; temperatura

Severity of tomato bacterial spot caused by *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*, differs between species as a function of temperature and leaf wetness

Abstract

Temperature and leaf wetness are environmental components that affect the establishment of plant foliar diseases. The effect of these factors on the severity of tomato bacterial spot caused by *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* have not yet been investigated. To study this effect, we quantified the severity of bacterial spot caused by these species, separately. Additionally, we evaluated the in vitro effect of temperature on the growth rate of these pathogens. Susceptible tomato plants were inoculated with *X. perforans* or *X. gardneri* and subjected to the following temperature and leaf wetness regimes respectively: 15; 20; 25; 30; 35°C and 0; 6; 12; 24; 48 hours. Ten days after the inoculation, the disease was measured. To estimate the severity of the disease, multiple regression model was used. The temperature and leaf wetness, as well as their interactions, had significant effects on the disease severity caused by *Xanthomonas perforans*, which increased the severity values as a function of temperature rise. In turn, to *X. gardneri*, a maximum (30°C) and minimum (15°C) temperature range delimited the disease incidence. According to multiple regression analysis, to represent the relationship between estimating disease severity (S) and the variables temperature (T) and leaf wetness (L), the following equations were obtained for *X. perforans* and *X. gardneri* respectively: $S = 4,46 - 0,36*T - 0,1*L + 0,007*T^2 + 0,0056*TL$ ($R^2 = 0,83$; $P \leq 0,05$) and $S = 3,61 + 0,31*T + 0,02*L - 0,006*T^2$ ($R^2 = 0,54$; $P \leq 0,05$). A minimum of 12 hours of leaf wetness was necessary for inciting the disease for both species, and the longer the leaf wetness period, the bigger the severity. Either species caused disease to 15°C. The temperature had a significant effect on the rate of growth of *X. perforans*, which is favored by temperatures equal or higher than 25°C. To *X. gardneri* no such effect was observed in the evaluated periods. The behavior of these species in different environmental conditions enhances the biological knowledge about these pathogens, and can assist in decision taking for the management of the disease.

Keywords: leaf wetness; population growth; *Solanum lycopersicum*; temperature

Introdução

As condições climáticas são fundamentais no processo de desenvolvimento de doenças em plantas (Rosenzweig *et al.* 2001). A temperatura e o molhamento foliar são essenciais para o desenvolvimento e progresso de diversas doenças de etiologia bacteriana (Zehr *et al.* 1996; Dalla Pria *et al.* 2006; Vu Thanh *et al.* 2012). A mancha-bacteriana do tomateiro não foge a este princípio. Porém, por se tratar de uma doença causada por um complexo de espécies do gênero *Xanthomonas* (Jones *et al.* 2004), esta interação com as condições ambientais deve ser tratada de forma isolada para cada agente patogênico.

Para as condições brasileiras, trabalhos para verificação da interação entre temperatura e molhamento foliar sobre a mancha-bacteriana do tomateiro foram realizados por Marcuzzo *et al.* (2009b). Porém, esses trabalhos trataram as bactérias causadoras da doença como se fossem uma única espécie, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, conforme a compreensão à época. Após a constatação de que um complexo bacteriano causava a mancha-bacteriana, Araújo *et al.* (2011) avaliaram a interação entre temperatura e a severidade da doença. Nesse trabalho observou-se que havia uma interação significativa das espécies *X. perforans* e *X. gardneri* com a temperatura, quando se observou que *X. perforans* ocasionava significativamente mais doença, a 30°C, que *X. gardneri*. No sentido inverso, *X. gardneri* ocasionou mais doença que *X. perforans* a 20°C. Não foi observada interação significativa para *X. euvesicatoria* e *X. vesicatoria* naquele trabalho. O efeito do molhamento foliar associado à temperatura ainda não foi relatado para as espécies *X. perforans* e *X. gardneri*.

A temperatura ainda pode influenciar diretamente na taxa de multiplicação populacional de um patógeno ou no estabelecimento do processo infeccioso (Feil e Purcell, 2001). Deste modo, o estudo do monociclo dessas espécies pode auxiliar na compreensão das razões de seu estabelecimento e/ou predominância nos locais de produção, bem como em um melhor entendimento da biologia do patógeno.

Os objetivos deste trabalho foram: i) determinar a severidade da mancha-bacteriana do tomateiro, causada por *X. perforans* e *X. gardneri*, em função da temperatura e do molhamento foliar; ii) avaliar o efeito da temperatura na taxa de multiplicação populacional *in vitro* de cada um desses patógenos.

Material e Métodos

Isolados utilizados e preparo de inóculo

Para os testes *in planta* e *in vitro* foram utilizados os isolados EH 2012-22 de *X. perforans* e EH 2011-37 de *X. gardneri*, pertencentes à coleção de trabalho de bactérias fitopatogênicas da Embrapa Hortaliças. Os isolados foram recuperados em meio AN (Schaad *et al.* 2001), a partir do tampão fosfato onde estavam preservados. Para as inoculações, após obtenção de massa bacteriana pura, prepararam-se suspensões bacterianas em sulfato de magnésio (10 mmol l⁻¹), ajustando a concentração em espectrofotômetro (OD₆₀₀ = 0,3) para aproximadamente 5 × 10⁸ UFC ml⁻¹. Com auxílio de borrifadores manuais, aspergiu-se a suspensão bacteriana sobre toda a superfície foliar das plantas de tomate, até o ponto de escorrimento.

Efeito da temperatura e molhamento foliar na severidade da mancha-bacteriana do tomateiro

Foram utilizadas plantas de tomate (cv. *Bonny Best*), suscetível à *X. perforans* e *X. gardneri* (Horvath *et al.* 2012). Após as inoculações, as plantas foram submetidas a diferentes regimes de temperatura e molhamento foliar. O ensaio foi conduzido em câmara climatizada (12 horas de fotoperíodo) e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 × 5, com seis repetições. As temperaturas contínuas utilizadas foram de 15°C; 20°C; 25°C; 30°C e 35°C (± 2°C) e o molhamento foliar de 0; 6; 12; 24 e 48 horas. A parcela foi composta pelos dois folíolos mais atacados, representando duas plantas (um folíolo de cada planta) que permaneceram dentro do mesmo saco plástico durante o respectivo período de molhamento foliar. A simulação do tempo de molhamento foliar foi realizada com o uso de sacos plásticos previamente umedecidos que cobriam o conjunto vaso-planta durante o período de molhamento estabelecido. Para 0 hora de molhamento, as plantas foram acondicionadas dentro da câmara diretamente após a inoculação, sem o uso de saco plástico. Utilizou-se um termohigrógrafo durante todo o período do experimento para monitorar a manutenção de temperatura constante. Duas plantas de tomate da mesma cultivar foram mantidas em casa de vegetação como controle, após cada etapa de inoculação, para verificar que a ausência de sintomas seria efeito direto da temperatura e/ou molhamento foliar, e não do próprio isolado.

A avaliação foi realizada dez dias após a inoculação e a porcentagem de área foliar lesionada foi quantificada por meio do programa APS Assess 2.0 (Image Analysis Software for Plant Disease Quantification).

A análise de variância dos dados foi processada pelo software SAS System (SAS Institute, 2002) e os gráficos gerados pelos programas R (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria) e Sigmaplot (Systat Software, Point Richmond, CA). Para gerar a equação de severidade estimada em função da temperatura e molhamento foliar, aplicou-se o modelo de regressão múltipla, utilizando nas equações geradas apenas os parâmetros que tiveram significância, ao nível de 5%, por meio do teste F.

Efeito da temperatura no crescimento populacional *in vitro* de *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*

Para verificação do efeito da temperatura, suspensões bacterianas de *X. perforans* e *X. gardneri* foram preparadas e ajustadas à concentração aproximada de 5×10^2 UFC ml⁻¹. Quinhentos microlitros de suspensão a essa concentração foram depositados em 5 ml de meio líquido caldo nutriente (Schaad *et al.* 2001), e incubado sob agitação nas temperaturas em estudo. Para esse ensaio, aplicaram-se as mesmas temperaturas, em câmara incubadora, do ensaio *in planta* (15; 20; 25; 30 e 35°C). O delineamento do ensaio foi inteiramente casualizado, com três repetições. A avaliação do crescimento bacteriano (turbidez) foi medida pelo valor de transmitância, com auxílio de um espectrofotômetro. Foi utilizado como controle, o meio de cultura caldo nutriente sem nenhuma suspensão bacteriana, que também foi mantido nas mesmas condições do estudo. Foram realizados dois momentos de medição após o acondicionamento dos tubos nas temperaturas de teste: 16 e 24 horas. A análise estatística foi processada pelo software SAS System (SAS Institute, 2002).

Resultados

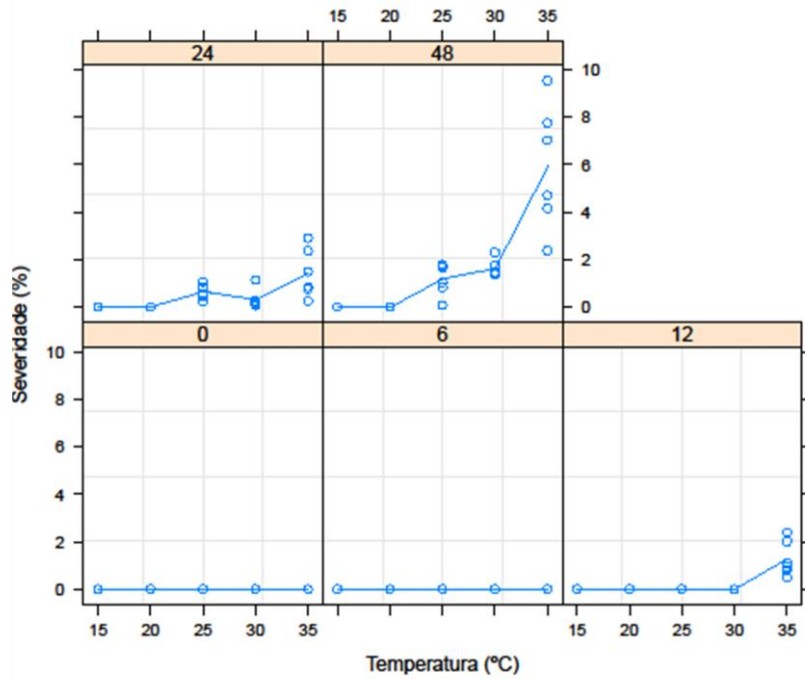
Temperatura e molhamento foliar apresentam interação significativa na severidade da mancha-bacteriana causada por *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*

Os testes *in planta* indicaram que é necessário um período de molhamento foliar mínimo de 12 horas para que a doença comece a se desenvolver, para ambas as espécies, independentemente da temperatura, e considerando a avaliação no período de dez dias após a inoculação (Figuras 1 e 3).

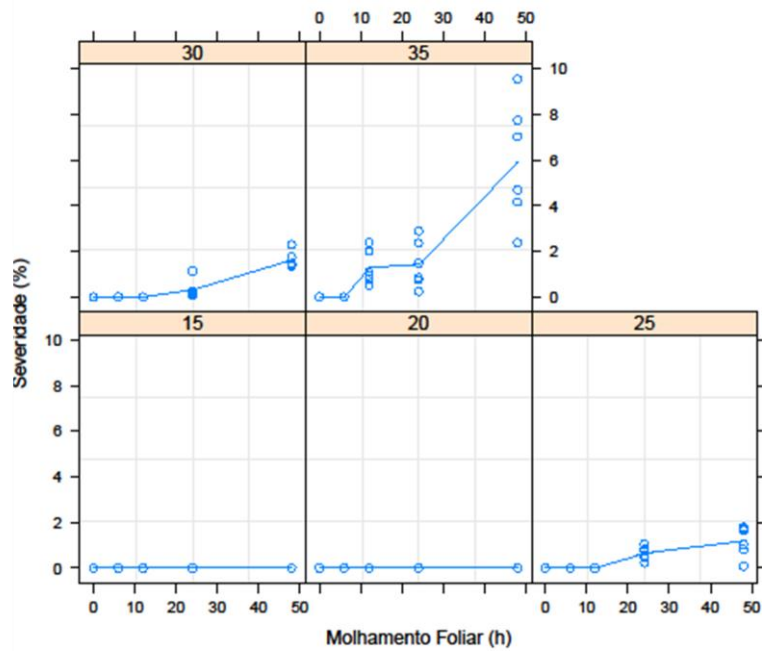
Xanthomonas perforans induziu maior severidade na temperatura mais alta testada (35°C). Observou-se efeito significativo, ao nível de 5%, da temperatura, do molhamento foliar e da interação de ambos, na severidade da mancha-bacteriana causada por *X. perforans* (Figura 2). Dessa forma, a análise de regressão múltipla gerou a seguinte equação para a espécie: $S = 4,46 - 0,36*T - 0,1*M + 0,007*T^2 + 0,0056*TM$ ($R^2 = 0,83$; $P \leq 0,05$), onde T = temperatura e M = molhamento foliar. A espécie causou uma crescente na severidade da doença em função do aumento da temperatura (Figura 1). A 20°C, a espécie não ocasionou nenhuma lesão no período de 10 dias. Não foi possível identificar uma temperatura máxima para a qual se iniciasse o decréscimo de severidade para *X. perforans*, nas temperaturas avaliadas.

Por sua vez, *X. gardneri*, incitou sintomas a partir dos 20°C. Efeito significativo da temperatura ou do molhamento foliar sobre a severidade, ao nível de 5%, foram observados para essa espécie. Já a interação entre temperatura e molhamento foliar na severidade da doença não foi significativa (Figura 4). A equação gerada para essa espécie pela análise de regressão múltipla foi: $S = 3,61 + 0,31*T + 0,02*M - 0,006*T^2$ ($R^2 = 0,54$; $P \leq 0,05$). Foi possível identificar para essa espécie um limiar mínimo (15°C) e máximo (35°C) para o desenvolvimento de sintomas (Figura 3), ou seja, *X. gardneri* é capaz de ocasionar sintomas iniciais em folhas de tomateiro suscetível, dentro dessa faixa térmica (Figura 3).

Nenhuma das duas espécies foi capaz de causar doença à temperatura de 15°C. Por sua vez, quanto maior foi o período de molhamento foliar, maior foi a severidade quantificada para ambas as espécies.



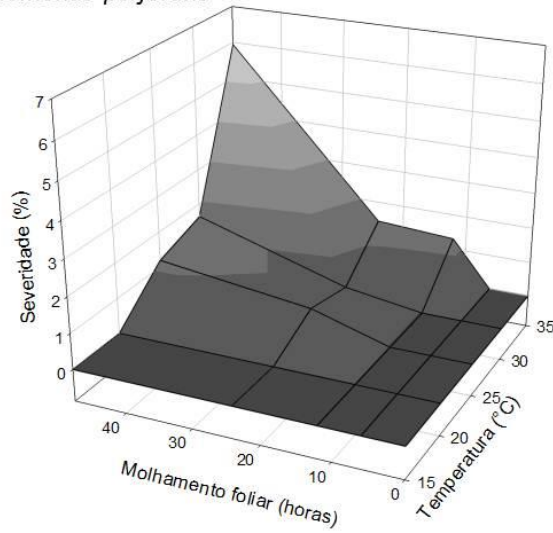
A



B

Figura 1. Efeito da temperatura (15; 20; 25; 30 e 35°C) e do molhamento foliar (0; 6; 12; 24 e 48 horas) sobre a severidade (porcentagem de área foliar lesionada) da mancha-bacteriana do tomateiro ocasionada por *Xanthomonas perforans* (EH 2012-22), 10 dias após a inoculação de uma suspensão bacteriana (5×10^8 UFC ml⁻¹). A – temperatura no eixo x do gráfico; B – molhamento foliar no eixo x do gráfico.

Xanthomonas perforans



$$S = 4,46 - 0,36*T - 0,1*M + 0,007*T^2 + 0,0056*TM$$
$$R^2 = 0,83$$

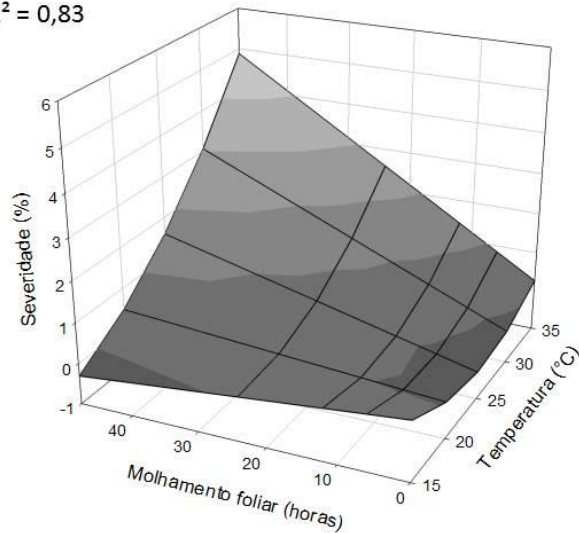
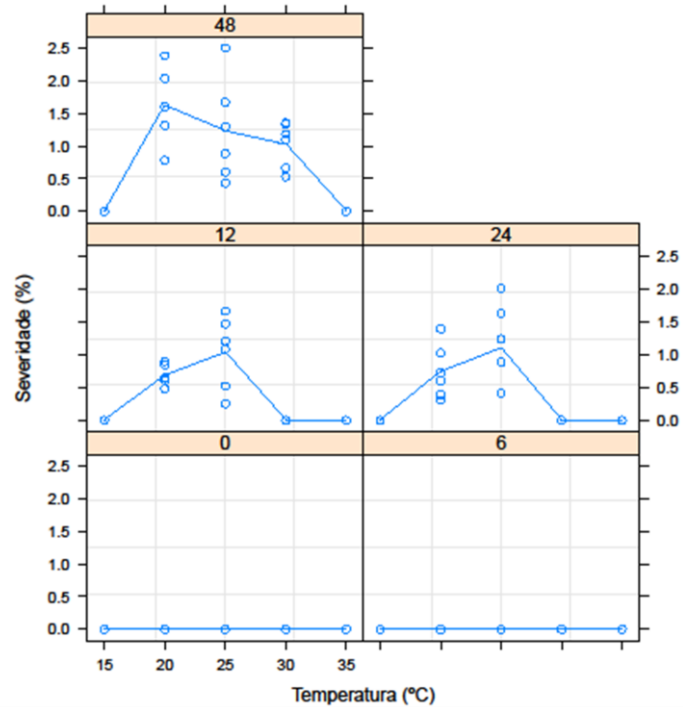
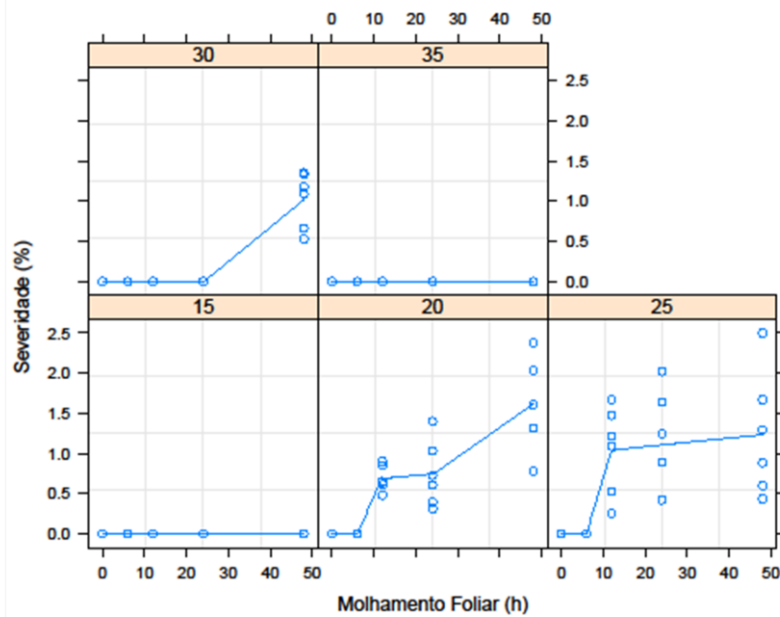


Figura 2. Severidade da mancha-bacteriana do tomateiro causada por *Xanthomonas perforans* (EH 2012-22), dez dias após a inoculação, em resposta a diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. A – valores observados; B – valores estimados pela análise de regressão múltipla. S – equação gerada pela análise de regressão múltipla para cálculo de severidade estimada. T – temperatura; M – molhamento foliar. Todos os parâmetros do modelo foram significativos (F, $P \leq 0,05$).



A



B

Figura 3. Efeito da temperatura (15; 20; 25; 30 e 35°C) e do molhamento foliar (0; 6; 12; 24 e 48 horas) sobre a severidade (porcentagem de área foliar lesionada) da mancha-bacteriana do tomateiro ocasionada por *Xanthomonas gardneri* (EH 2011-37), 10 dias após a inoculação de uma suspensão bacteriana (5×10^8 UFC ml⁻¹). A – temperatura no eixo x do gráfico; B – molhamento foliar no eixo x do gráfico.

Xanthomonas gardneri

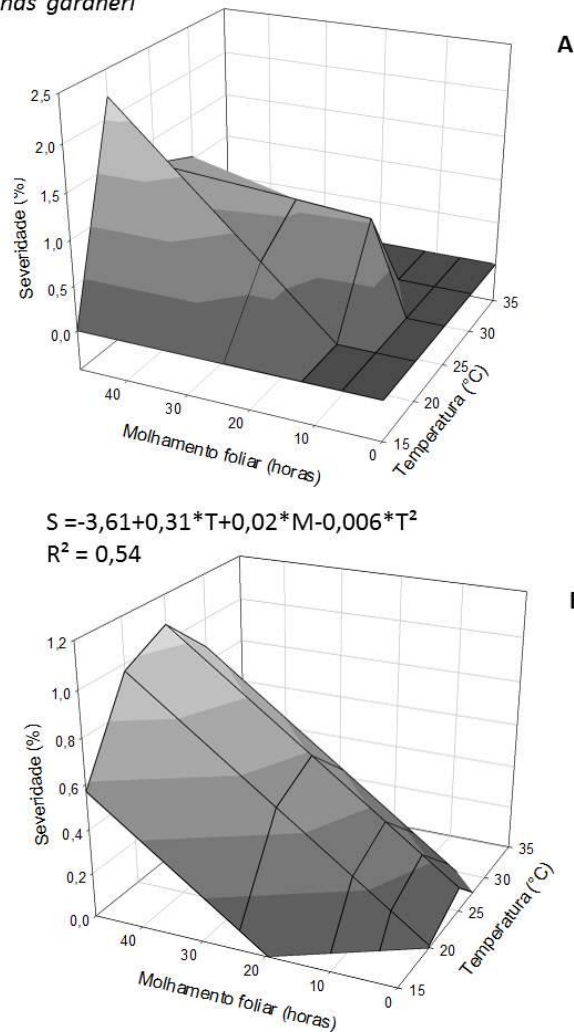


Figura 4. Severidade da mancha-bacteriana do tomateiro causada por *Xanthomonas gardneri* (EH 2011-37), dez dias após a inoculação, em resposta a diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. A – valores observados; B – valores estimados pela análise de regressão múltipla. S – equação gerada pela análise de regressão múltipla para cálculo de severidade estimada. T – temperatura; M – molhamento foliar. Todos os parâmetros do modelo foram significativos (F, $P \leq 0,05$).

Temperatura exerce efeito sobre a taxa de crescimento bacteriano de *Xanthomonas perforans*

Temperaturas mais elevadas ocasionaram um crescimento bacteriano mais acelerado para *X. perforans* (Figura 5). Observou-se maior turbidez a transmitância dos tubos contendo a suspensão do isolado dessa espécie, quando submetida a maiores temperaturas, principalmente 30 e 35°C, em especial no segundo momento de avaliação (24 horas), em comparação com temperaturas abaixo de 25°C. Houve uma diferença significativa de crescimento bacteriano entre a temperatura de 30°C e a temperatura de 20°C.

A taxa de crescimento de *X. gardneri* foi pequena para todas as temperaturas testadas (Figura 6). A bactéria não se desenvolveu bem em nenhum das temperaturas e momentos de avaliação. Aparentemente, a espécie necessita de um período superior a 24 horas pra iniciar sua multiplicação logarítmica no meio de cultura avaliado. Com isso, não houve diferenças significativas entre os valores de concentração, obtidos nas diferentes temperaturas, para essa espécie.

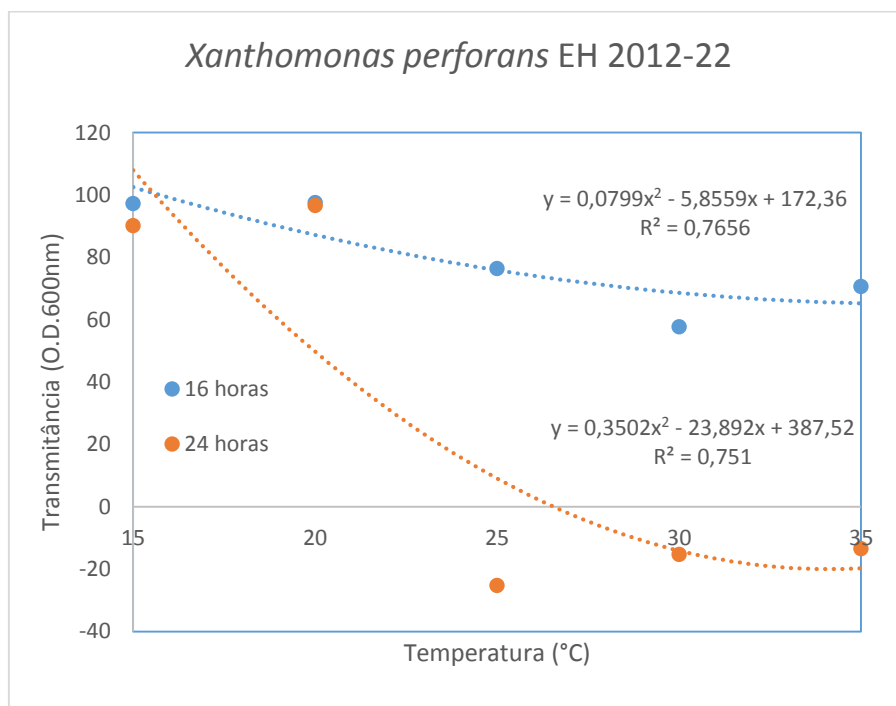


Figura 5. Efeito da temperatura na taxa de crescimento populacional de *Xanthomonas perforans*, agente causal da mancha-bacteriana do tomateiro, avaliada 16 e 24 horas após a incubação da bactéria sob diferentes temperaturas. A medição da transmitância foi realizada com espectrofotômetro (600nm).

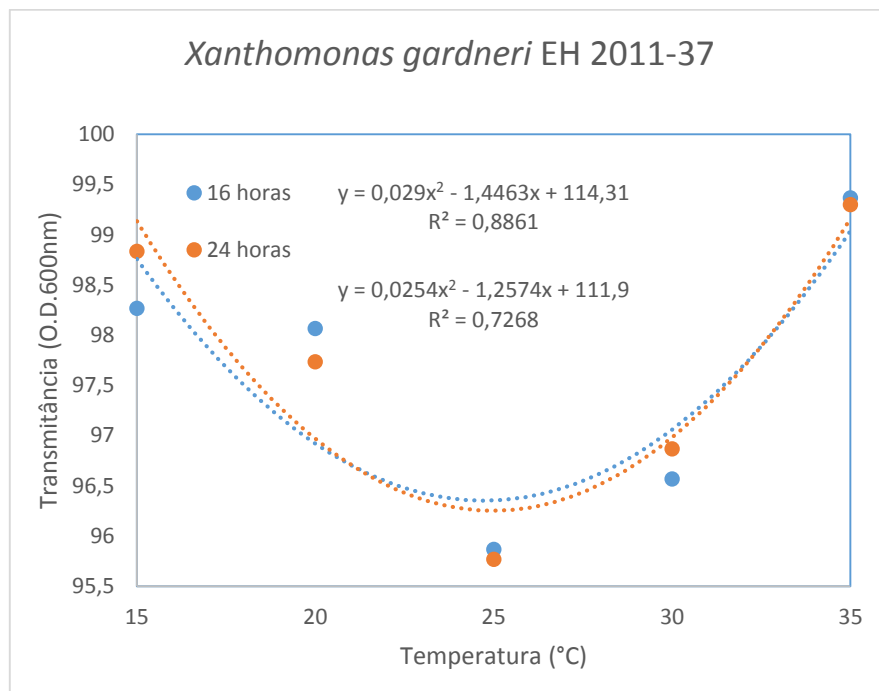


Figura 6. Efeito da temperatura na taxa de crescimento populacional de *Xanthomonas gardneri*, agente causal da mancha-bacteriana do tomateiro, avaliada 16 e 24 horas após a incubação da bactéria sob diferentes temperaturas. A medição da transmitância foi realizada com espectrofotômetro (600nm).

Discussão

O aumento da intensidade da mancha-bacteriana, causada por *X. perforans*, com o aumento da temperatura, está em concordância com os resultados relatados por Araújo *et al.* (2011), onde foi observado que essa espécie tem seu período de incubação reduzido e consegue causar uma maior severidade a temperaturas mais elevadas. Para esse patossistema, no Brasil, o fator molhamento foliar só tinha sido relatado em trabalho realizado por Marcuzzo *et al.* (2009b), em que não houve a identificação em nível de espécie. Esses autores verificaram que a partir de 20 horas de molhamento foliar havia um incremento significativo da severidade. Nesse mesmo trabalho foi observado que a 15°C não ocorreram sintomas, mesmo quando se aplicava molhamentos foliares superiores a 40 horas. De forma geral, as bactérias fitopatogênicas apresentam um ótimo de temperatura para o crescimento. Esse fato já foi observado por Feil e Purcell (2001) quando esclareceram que ótimo de crescimento de *Xylella fastidiosa* está entre 25 e 32°C. Temperaturas abaixo de 17°C e acima de 34°C prejudicavam a sobrevivência do agente causal da doença de Pierce *in planta*. Leela e Sharma (2000) igualmente relataram que *Xanthomonas campestris* apresenta uma faixa ótima entre 25 e 30°C para produção do heteropolissacarídeo conhecido como goma xantana. Por ter efeito direto na

taxa de crescimento bacteriano de *X. perforans*, a temperatura torna-se um fator fundamental para o estabelecimento da espécie, seja limitando sua capacidade de causar doença a temperaturas mais baixas (15°C), seja pela aceleração de seu crescimento a maiores temperaturas.

Xanthomonas gardneri teve uma resposta diferenciada com relação à temperatura quando comparada à *X. perforans*. Enquanto na segunda não foi possível observar um decréscimo de severidade relacionado a um limite máximo de temperatura, na primeira isso foi claramente notado. A não detecção do efeito *in vitro* da temperatura no crescimento de *X. gardneri* neste trabalho, indica que a espécie necessita de um período maior para desenvolvimento inicial. A melhor adaptabilidade dessa espécie a temperaturas mais amenas pode estar relacionada à transferência horizontal de genes da espécie *Pseudomonas syringae* para *X. gardneri*, como já discutido por Potnis *et al.* (2012). Essa adaptação a temperaturas mais baixas pode explicar parcialmente o levantamento realizado por Costa *et al.* (2012), quando constataram que 80% dos isolados que estavam associados à mancha-bacteriana do tomateiro em Santa Catarina, região sul do país e caracterizada por temperaturas mais amenas, eram de *X. gardneri*. No mesmo sentido, em levantamento e caracterização das espécies causadoras da mancha-bacteriana realizado na Rússia, Kornev *et al.* (2009) não identificaram nenhum isolado como *X. perforans*. Os autores encontraram apenas *X. gardneri* e *X. vesicatoria*, sendo a primeira em maior número.

O modelo de regressão múltipla (Campbell e Madden, 1990) utilizado nesse estudo é apenas uma das formas de análise de dados do efeito da temperatura e molhamento foliar sobre variáveis do patossistema. O modelo foi utilizado por Jardine e Stephens (1987) para um sistema de previsão da pinta-bacteriana do tomateiro, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Em outros estudos que analisam o efeito dessas variáveis independentes sobre diferentes variáveis dependentes do patossistema, observa-se com frequência o uso do modelo não linear beta generalizado para avaliar o efeito da temperatura (Kranz, 1990, apud Jesus Júnior *et al.* 2004; Dalla Pria *et al.* 2003; Marcuzzo *et al.* 2009), representado pela equação $y = b1 \cdot (T - b2)^{b4} \cdot (b3 - T)^{b5}$, onde y pode ser a severidade da doença, $b2$ é o parâmetro estimador da temperatura mínima; $b3$ é o parâmetro estimador da temperatura máxima. Os parâmetros $b1$; $b4$ e $b5$ não possuem valor biológico. Essa equação é utilizada quando o efeito da temperatura é avaliado isoladamente, não considerando o efeito combinado com o molhamento foliar. O modelo logístico é comumente utilizado para avaliação do efeito do molhamento foliar de

maneira isolada, sendo representado pela equação $y = B_1/(1+B_2 \cdot \exp(-B_3 \cdot X))$, onde y pode ser a severidade da doença; X é o tempo, em dias, após a inoculação; B_1 é a estimativa da assíntota máxima; B_2 é um parâmetro relacionado ao inóculo inicial; e B_3 é a taxa de progresso da doença (Berger, 1981). Uma vez que essas funções são aplicadas para análise de efeito de temperatura ou molhamento foliar isoladamente, alguns autores executam a multiplicação dessas duas funções para verificar o efeito combinado da temperatura e do molhamento, bem como, para o desenho de superfícies de resposta (Leite e Amorim, 2002; Marcuzzo *et al.* 2009). A princípio, esse modelo poderia futuramente ser aplicado para as duas espécies avaliadas nesse estudo, buscando melhores ajustes, principalmente para *X. gardneri*, que apresentou um R^2 no valor de 0,54, considerado baixo para que o modelo explique os valores observados.

Outros trabalhos tem tentado modelar o efeito combinado da temperatura e do molhamento foliar. Duthie (1997) propôs duas equações distintas para análise do efeito combinado desses fatores sobre variáveis de patógenos foliares. Para aplicação de ambas as equações, é necessário conhecer o limiar máximo e mínimo de temperatura que ocasiona decréscimo em alguma variável dependente relacionada ao patógeno. A primeira equação proposta pelo autor é a seguinte: $f(w,t) = A\{1 - \exp[-f(t) \cdot (w - C)]^D\}$, onde A = limite superior atingido pela variável dependente quando o molhamento foliar é estendido indefinidamente; C = momento em que a resposta da variável dependente começa a ser percebida; D = porção do período de molhamento em que a resposta da variável dependente desacelera; w = período de molhamento foliar. De acordo com o autor, essa equação expressa que a temperatura exerce um papel mais determinante, influenciando diretamente o limiar máximo de severidade, independentemente do período de molhamento foliar, ou seja, diferentes temperaturas ocasionariam diferentes níveis de severidade. Esse modelo poderá ser usado futuramente para ajustar de forma mais adequada, as respostas observadas no presente estudo para *X. gardneri*, uma vez que foi possível identificar os limiares extremos de temperatura para a variável severidade, independentemente do período de molhamento foliar aplicado. A segunda equação proposta é: $f(w,t) = f(t) \cdot (1 - \exp\{-[B(w - C)]^D\})$, onde B = taxa intrínseca de crescimento da variável dependente em resposta ao período de molhamento C ; D e w possuem o mesmo significado da primeira equação. O autor considera, nesse segundo modelo, que o efeito da temperatura também é importante, mas menos determinante. Para essa segunda equação, diferentes temperaturas não ocasionariam diferentes níveis de severidade, mas sim, diferentes taxas de progresso para o alcance de um mesmo nível de severidade, sendo assim, o fator molhamento foliar também influenciaria de forma determinante nessa velocidade de progresso.

Para a mancha-bacteriana causada por *X. perforans*, com os dados obtidos até o presente, por não ter sido alcançado o ponto superior de temperatura na qual a severidade iniciaria um decréscimo, as equações de Duthie (1997) ainda não poderiam ser avaliadas para descrição do comportamento da doença em função da temperatura e molhamento foliar. Pela análise gráfica do desenvolvimento da mancha-bacteriana incitada por *X. perforans*, em função da temperatura e molhamento foliar, de maneira isolada (Figura 1), verifica-se que nas amplitudes testadas dessas duas variáveis independentes, o crescimento da doença apresenta-se aparentemente exponencial. Assim, para continuidade do estudo, sugere-se a avaliação de níveis superiores de temperatura, sendo que, níveis ainda maiores seriam limitados por possivelmente afetarem de forma prejudicial o desenvolvimento do próprio tomateiro.

É importante salientar que as propostas de análises de dados apresentadas, bem como a própria análise utilizada no presente estudo, tem em um primeiro momento, apenas um aspecto teórico. Essas equações ou modelos necessitam ser validadas em campo para que se verifique qual representaria melhor o real modelo biológico da doença. Sendo assim, para o patossistema mancha-bacteriana do tomateiro, a validação e resposta em campo são fundamentais, assim como o conhecimento das espécies de *Xanthomonas* presentes e predominantes, para que se estabeleça futuramente, alguma estratégia de manejo baseada em um sistema de previsão da doença. O modelo baseado na multiplicação logístico – beta generalizado, desenvolvido por Marcuzzo *et al.* (2009b) para mancha-bacteriana, tem sido avaliado nas condições de produção de tomate de mesa de Santa Catarina (Marcuzzo *et al.* 2009a). No entanto, o modelo muito provavelmente não foi desenvolvido para *X. perforans*, uma vez que a severidade da doença decrescia a partir de 25°C.

O entendimento dos monociclos da mancha-bacteriana, causada pelas espécies *X. perforans* e *X. gardneri*, pertencentes ao complexo causador da doença, indica que temperatura e molhamento foliar são importantes fatores para a adaptação de uma espécie ou outra numa determinada região, bem como para sua presença simultânea. Outros fatores relacionados à competitividade também interferem nesse processo de adaptação. Além disso, os resultados ajudam a compreender um pouco melhor a distribuição das espécies nos locais onde já foram relatadas sua ocorrência.

Referências

- Araújo, E.R., Pereira, R.C., Ferreira, M.A.S.V., Café-Filho, A.C., Moita, A.W., Quezado-Duval, A.M. 2011. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. *Acta Horticulturae* 914:39-42.
- Berger, R. D. 1981. Comparison of the gompertz and logistic equations to describe plant disease progress. *Phytopathology* 71:717-719.
- Campbell, C.L., Madden, L.V. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. New York, U.S.A. John Wiley. 532p.
- Costa, J.R., Araújo, E.R., Becker, W.F., Ferreira, M.A.S.V., Quezado-Duval, A.M. 2012. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC. *Tropical Plant Pathology* 37:149–154.
- Dalla Pria, M., Amorim, L., Bergamin Filho, A. 2003. Quantificação de componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 28:401-407.
- Dalla Pria, M., Christiano, R.C.S., Furtado, E.L., Amorim, L., Bergamin Filho, A. 2006. Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. *Plant Pathology* 55:657-663.
- Duthie, J.A. 1997. Models of the response of foliar parasites to the combined effects of temperature and duration of wetness. *Phytopathology* 87:1088-1095.
- Feil, H., Purcell, A.H. 2001. Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and in potted grapevines. *Plant Disease* 85:1230-1234.
- Horvath, D.M, Stall, R.E., Jones, J.B., Pauly, M.H., Vallad, G.E., Dahlbeck, D., Staskawicz, B.J., Scott, J.W. 2012. Transgenic resistance confers effective field level control of bacterial spot disease in tomato. *Plos One* 7:e42036.
- Jesus Júnior, W.C., Pozza, E.A., Vale, F.X.R. Aguilera, G.M. 2004. Análise Temporal de Epidemias. In: Vale, F.X.R., Jesus Júnior, W.C., Zambolim, L. (eds). *Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas*. Belo Horizonte, Editora Perffil. pp 125-191.

Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., Schaad, N.W. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27:755–762.

Kornev, K.P., Matveeva, E.V., Pekhtereva, E.Sh., Polityko, V.A., Ignatov, A.N., Punina, N.V., Schaad, N.W. 2009. *Xanthomonas* species causing bacterial spot of tomato in the Russian Federation. *Acta Horticulturae* 808:243-245.

Leela, J.K., Sharma, G. 2000. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Engineering* 23:687-689.

Leite, R.M.V.B.C., Amorim, L. 2002. Influência da temperatura e do molhamento foliar no monociclo da mancha de alternaria em girassol. *Fitopatologia Brasileira* 27:193-200.

Marcuzzo, L.L., Becker, W.F., Fernandes, J.M.C. 2009a. Avaliação de um sistema de previsão para a mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro. *Agropecuária Catarinense* 22:87-89.

Marcuzzo, L.L., Fernandes, J.M.C., Becker, W.F. 2009b. Influência da temperatura e da duração do molhamento foliar na severidade da mancha-bacteriana do tomateiro. *Summa Phytopathologica* 35:229-230.

Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N.F., Patil, P.B., Ryan, R.P., Sharlach, M., Behlau, F., Dow, J.M., Momol, M.T., White, F.F., Preston, J.F., Vinatzer, B.A., Koebnik, R., Setubal, J.C., Norman, D.J., Staskawicz, B.J., Jones, J.B. 2011. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics* 12:146.

Rosenzweig, C., Iglesias, A., Yang, X.B., Epstein, P.R., Chivian, E. 2001. Climate change and extreme weather events: implications for food production, plant diseases, and pests. *Global Change and Human Health* 2:90-104.

SAS Institute. 2002. SAS System Version 9 for Microsoft Windows, Cary, NC: SAS Institute.

Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. St Paul: American Phytopathological Society Press.

Vu Thanh, T.A., Sosnowski, M.R., Giblot-Ducray, D., Taylor, C., Scott, E.S. 2012. Effect of burning and high temperature on survival of *Xanthomonas translucens* pv. *pistaciae* in infected pistachio branches and twigs. *Plant Pathology* 61:1082-1092.

Zehr, E.I., Shepard, D.P., Bridges Jr., W.C. 1996. Bacterial spot of peach as influenced by water congestion, leaf wetness duration, and temperature. *Plant Disease* 80:339-341.

CAPÍTULO 4

Caracterização parcial da comunidade bacteriana associada a sementes e mudas assintomáticas de variedades comerciais de tomateiro

Caracterização parcial da comunidade bacteriana associada a sementes e mudas assintomáticas de variedades comerciais de tomateiro

Resumo

Com o objetivo principal de se detectar *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro associadas a mudas assintomáticas ou sementes, foram realizados levantamentos, em amostras provenientes de um viveiro comercial, nos anos de 2012 e 2013. Para isso, amostras de água da superfície foliar de tomateiro assintomático e sementes foram recolhidas. Vinte e seis variedades de tomate foram amostradas. Adicionalmente, foram realizados testes de sensibilidade *in vitro* a 19 antibióticos, visando o desenvolvimento de meios semi-seletivos, tendo como alvo os agentes da mancha-bacteriana do tomateiro. Os isolados obtidos foram caracterizados por meio de testes de patogenicidade, bioquímicos e moleculares. Apenas um isolado do grupo de espécies que causam a mancha-bacteriana foi detectado e identificado como *X. euvesicatoria*. Os demais isolados obtidos, escolhidos a partir da maior frequência de ocorrência, determinada pelo aspecto das colônias, foram identificados em nível de gênero por meio do sequenciamento da região 16S do rRNA. Desses, três isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Sphingomonas*; dois isolados identificados como *Sphingobium*, dois como *Microbacterium*; dois como *Agrobacterium* e um como *Enterobacter*. Sete antibióticos podem servir como base para o desenvolvimento futuro de um meio semi-seletivo para *X. perforans*. O potencial de controle biológico desses gêneros associados a sementes e mudas poderá ser avaliado para o patossistema mancha-bacteriana do tomateiro.

Palavras-chave: antibiograma; filoplano; *Enterobacter*; *Sphingomonas*; *Sphingobium*; *Microbacterium*; *Xanthomonas euvesicatoria*

Partial characterization of bacterial community associated with asymptomatic seedlings and seeds of commercial varieties of tomato

Abstract

In order to detect *Xanthomonas* spp. causing tomato bacterial spot associated with asymptomatic seedlings or seeds, surveys on samples from one commercial tomato nursery plants were performed in the years 2012 and 2013. For this, water samples from asymptomatic leaf surface of tomato plants and seeds were collected. Twenty-six tomato varieties were sampled. Additionally, *in vitro* sensitivity testing to 19 antibiotics was made for a possible semi-selective medium development, targeting agents of tomato bacterial spot. The isolates were characterized by pathogenicity, biochemical and molecular tests. *Xanthomonas euvesicatoria* was detected in one of the samples. Other isolates were obtained and, based on their overall frequency of occurrence, from their colony aspect, were genus identified by sequencing of 16S rRNA. Three isolates were identified as belonging to the genus *Sphingomonas*, two as *Sphingobium*, two as *Microbacterium*, two as *Agrobacterium* and one as *Enterobacter*. Seven antibiotics can serve as a basis for the future development of a semi-selective medium for *X. perforans*. The potential for biological control of genus associated with seeds and seedlings yet to be evaluated for bacterial spot of tomato pathosystem.

Keywords: antibiograma; phylloplane; *Enterobacter*; *Sphingomonas*; *Sphingobium*; *Microbacterium*; *Xanthomonas euvesicatoria*

Introdução

Sementes infectadas ou infestadas são uma fonte de inóculo importante para diversas doenças causadas por bactérias fitopatogênicas (Ftayeh *et al.* 2011; van der Wolf *et al.* 2013). O uso de sementes comprovadamente sadias é uma forma simples, econômica e segura de se evitar diversas enfermidades no campo. Assim, a produção, avaliação e a subsequente utilização de sementes livres de patógenos são medidas importantes para diversas doenças bacterianas (Schaad & Donaldson, 1980).

A mancha-bacteriana do tomateiro, causada por espécies de *Xanthomonas* (Jones *et al.* 2004): *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*, pode ser transmitida a longas distâncias via sementes. A utilização de híbridos importados no país, somada à falta de metodologia e regulamentação eficientes para detecção dos agentes causais da doença, pode contribuir para que diferentes espécies e/ou raças se estabeleçam em novas regiões. A diversidade de espécies e raças encontradas no Brasil pode ter íntima relação com esse meio de disseminação (Quezado-Duval *et al.*, 2005). A ocorrência da doença na Rússia (Kornev *et al.*, 2009), na Coreia do Sul (Myung *et al.*, 2009) e no Egito (Abd-Alla & Shandy, 2008) também levam à discussão da entrada desses patógenos via sementes nesses países. Vale ressaltar que na Coreia do Sul, a detecção da doença se deu em viveiros comerciais, o que é um forte indício deste meio de disseminação.

Segundo Leben (1981), as bactérias fitopatogênicas apresentam uma importante estratégia de sobrevivência em seu ciclo de vida, e que pode estar associado a possíveis problemas fitossanitários no campo. Esta fase é denominada de residente ou epifítica. Estes termos são objetos de várias discussões. Conceitualmente, as populações de bactérias epifíticas são capazes de se multiplicar na superfície da folha ou raízes (Kimura, 1981) de plantas sadias da cultura, planta daninha, planta hospedeira ou não hospedeira sem infectá-la, sendo fonte de inóculo, mesmo ainda sem a manifestação da doença.

Xanthomonas não sobrevive no solo por longos períodos, entretanto, pode sobreviver em restos culturais ou epifiticamente na superfície foliar do tomateiro ou demais hospedeiras (Rodrigues Neto, 2000; Lindemann *et al.* 1984). As fitobactérias têm capacidade de se multiplicarem à custa de exsudados do hospedeiro sem infectá-lo, e assim incrementar a quantidade de inóculo até o suficiente para o surgimento de uma epidemia, como no caso de *Xanthomonas vesicatoria* em tomate (Leben, 1963; Schuster & Coyne, 1974).

O uso de cultivares resistentes também é uma medida de controle nesses casos, já que a população epifítica fitopatogênica normalmente é reduzida, diminuindo a possibilidade da ocorrência da doença na planta e, conseqüentemente, de uma epidemia (Marcuzzo, 2009).

Aysan & Uygur (2005) realizaram o primeiro estudo mostrando que isolados patogênicos de *Pseudomonas viridiflava* que atacam tomate podem sobreviver como uma população epifítica na filosfera de *Amaranthus* spp., sendo identificadas por características morfológicas, fisiológicas, testes bioquímicos e ELISA indireto, sendo assim reconhecida como potencial fonte de inóculo da bactéria para a cultura do tomateiro.

O objetivo deste estudo foi detectar, em viveiro comercial, a presença das espécies causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro, bem como gerar informações sobre a sensibilidade dos agentes causadores da doença a diferentes antibióticos, que possam ser utilizados no desenvolvimento de um meio seletivo eficiente para essas espécies.

Material e Métodos

Coleta de populações epifíticas na superfície foliar de variedades comerciais de tomateiro

As coletas foram realizadas durante a safra de 2012 (fevereiro a junho) em viveiro comercial no estado de Goiás. Para amostragem das populações epifíticas, utilizou-se metodologia descrita por Champoiseau *et al.* (2009). Semanalmente, coletaram-se alíquotas da água superficial dos folíolos (~ 200 µl), logo após a irrigação das plântulas, com auxílio de micropipetas, em seis pontos equidistantes de cada uma das bandejas. Foram amostrados 62 lotes, nos quais estavam representadas 26 variedades de tomate de crescimento determinado. Como as coletas eram realizadas semanalmente, a amostragem era feita, duas vezes, nos lotes e variedades que eram semeados num mesmo período, uma vez que as bandejas permaneciam no viveiro em torno de 30 dias (desde o semeio até a retirada). Lotes que apresentavam grandes quantidades de sementes, eventualmente, eram semados em períodos diferentes, porém foram considerados como mesmo lote, mas amostras distintas. Fez-se a amostragem em 0,5% do total de bandejas presentes no viveiro, totalizando 674 bandejas amostradas. As amostras foram armazenadas a – 20°C até o momento de serem depositadas em meio AN (Schaad *et al.* 2001) para verificação de crescimento bacteriano. Após 72 horas, colônias candidatas, pela característica morfológica, a serem *Xanthomonas* spp., foram transferidas para outra placa de AN até o momento da preservação. No intuito de verificar a presença de alguma das espécies associadas à mancha-bacteriana do tomateiro, a partir das suspensões bacterianas dos isolados

preservados, foi aplicada a técnica de PCR com iniciadores específicos para as quatro espécies causadoras da doença (Koenraadt *et al.* 2009), bem como com iniciadores que amplificam o gene ligado à produção de goma xantana (Mbega *et al.* 2012a).

No ano de 2013, optou-se por realizar a detecção dos patógenos diretamente das sementes. Para isso, o responsável pelo viveiro enviou sementes remanescentes da safra deste mesmo ano. Foram testados 12 lotes de sementes (1 grama por lote), as quais foram maceradas em tampão fosfato salino – phosphate buffered saline–PBS (Bulletin OEPP/EPPO, 2013). O extrato resultante da maceração foi depositado em meio AN para verificação da presença de colônias candidatas. Além disso, foram preservados outros tipos de colônias que apareciam constantemente nos isolamentos.

Testes bioquímicos e sequenciamento da região 16S do rRNA para caracterização dos isolados

Os isolados que foram preservados (13 originários da água superficial de folíolos e 12 originários de sementes) foram submetidos aos seguintes testes bioquímicos diagnósticos, de acordo com Schaad *et al.* (2001): reação de Gram, crescimento aeróbico e fluorescência em meio King's B. Após obtenção do perfil bioquímico, dez isolados foram submetidos à extração de DNA segundo protocolo descrito por Mahuku (2004). Para identificação em nível de gênero, foram utilizados os iniciadores específicos universais 27F/1492R segundo Lane (1991) para amplificação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb do gene do rRNA de 16S. Os produtos da PCR foram purificados com auxílio do “Purelink PCR purification kit” (Invitrogen) e enviados para sequenciamento na empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul). A montagem e edição das sequências foi realizada por meio do programa BioEdit (Hall, 1999). Em seguida, as sequências foram comparadas àquelas depositadas no GenBank por meio da ferramenta BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Testes com antibiograma

Iniciou-se a avaliação de sensibilidade *in vitro* de isolados brasileiros causadores da mancha-bacteriana (*X. euvesicatoria*, EH 2009-46 e EH 2009-130; *X. vesicatoria*, EH 1995-104 e EH 2010-41; *X. perforans*, EH 2006-44 e 2012-22; *X. gardneri*, EH 2010-64 e 2011-37) e de quatro isolados de populações endofíticas e/ou epifíticas associadas à superfície foliar ou sementes do tomateiro a 19 antibióticos. Os antibióticos utilizados, com suas respectivas concentrações em µg foram: Ácido Pipemídico (20); Amicacina (30); Ampicilina (10);

Cefalotina (30); Cefazolina (30); Cefoxitina (30); Ceftriaxona (30); Ciprofloxacina (5); Clindamicina (2); Cloranfenicol (30); Cotrimoxazol (25); Eritromicina (15); Gentamicina (10); Morfloxacina (10); Nitrofurantoina (300); Oxacilina (1); Penicilina G. (10); Tetraciclina (30); Tobramicina (10). Foram preparadas suspensões bacterianas em sulfato de magnésio (10 mmol l⁻¹) e ajustada a concentração, em espectrofotômetro, para aproximadamente 5 × 10⁸ UFC ml⁻¹. Quinhentos microlitros dessa suspensão foram homogeneizados em 5 ml de meio AN semi-sólido (0,5 % de ágar) e depositado em uma camada de AN pré-vertida em placa de Petri. Após a solidificação desta sobrecamada, foram depositados os discos com antibióticos, em triplicata, sobre o meio. Após quarenta e oito horas, realizou-se a avaliação da sensibilidade, via medição dos halos de inibição.

Resultados

Diversidade da população bacteriana em sementes e mudas assintomáticas de tomateiro

A partir das coletas de água superficial dos folíolos e maceração das sementes de variedades comerciais de tomate, foram obtidos 24 isolados (Tabela 1). Além desses, um isolado proveniente de água superficial de folíolos assintomáticos foi identificado como *X. euvesicatoria* e incorporado à coleção de trabalho de bactérias fitopatogênicas da Embrapa Hortaliças com o código EH 2012-36. Este foi o único isolado para o qual se obteve amplificação positiva com o par de iniciadores específicos para a espécie, bem como para o gene ligado à produção de goma xantana. Além disso, este ainda foi o único isolado capaz de causar sintomas em tomateiro suscetível (Bonny Best) (Figura 1). Os isolados mostraram características morfológicas (relacionadas ao aspecto de colônias) e bioquímicas semelhantes ao gênero *Xanthomonas*, com exceção dos isolados 2; 6; 7; 8; 19; 23 e 24, os quais apresentaram características morfológicas distintas, mas estavam normalmente presentes nos isolamentos provenientes tanto de água superficial como de sementes.

Com base no sequenciamento do rRNA de 16S, identificaram-se três isolados do gênero *Sphingomonas*, dois isolados do gênero *Microbacterium*, dois do gênero *Sphingobium*, dois do gênero *Agrobacterium* e um do gênero *Enterobacter* (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização bioquímica e molecular de isolados bacterianos associados a mudas e sementes de tomateiro utilizados no estudo

Isolado	Origem	Coloração da Colônia	Reação de Gram	Crescimento aeróbio	Fluorescência em meio King's B	Genêro/Espécie	Identidade (%) ^a
1	Superfície foliar	Amarela	-	obrigatório	-	nd	nd
2	Semente	Creme	-	obrigatório	-	<i>Microbacterium testaceum</i>	KC329834.1 <i>Microbacterium testaceum</i> (97)
3	Superfície foliar	Amarela	-	obrigatório	-	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	AB680769.1 <i>Sphingobium yanoikuyae</i> (98)
4	Semente	Amarela	-	obrigatório	-	<i>Sphingomonas</i> sp.	EF062503.1 <i>Sphingomonas</i> sp. (98)
5	Semente	Amarela	-	obrigatório	-	nd	nd
6	Semente	Translúcida	-	obrigatório	-	nd	nd
7	Semente	Translúcida	-	obrigatório	-	<i>Microbacterium oleivorans</i>	KC764962.1 <i>Microbacterium oleivorans</i> (99)
8	Superfície foliar	Branca	-	facultativo	-	<i>Enterobacter</i> sp.	JF772075.1 <i>Enterobacter</i> sp. (93)
9	Superfície foliar	Amarela	-	obrigatório	-	nd	nd
10	Superfície foliar	Amarela	-	obrigatório	-	nd	nd
11	Semente	Amarela	-	obrigatório	-	<i>Sphingobium</i> sp.	JN860414.1 <i>Sphingobium</i> sp. (98)
12	Semente	Amarela	-	obrigatório	-	nd	nd
13	Superfície foliar	Amarela	-	obrigatório	-	<i>Sphingomonas</i> sp.	HM536969.1 <i>Sphingomonas</i> sp. (98)
14	Superfície foliar	Amarela	-	obrigatório	-	nd	nd
15	Superfície foliar	Amarela	-	obrigatório	-	nd	nd
16	Superfície foliar	Amarela	-	obrigatório	-	nd	nd
17	Semente	Amarela	-	obrigatório	-	nd	nd
18	Semente	Amarela	-	obrigatório	-	nd	nd
19	Semente	Creme	-	obrigatório	-	<i>Agrobacterium</i> sp.	GU085230.1 <i>Agrobacterium</i> sp. (99)
20	Semente	Amarela	-	obrigatório	-	<i>Sphingomonas</i> sp.	HM536969.1 <i>Sphingomonas</i> sp. (99)
21	Superfície foliar	Amarela	-	obrigatório	-	nd	nd
22	Superfície foliar	Amarela	-	obrigatório	-	nd	nd
23	Semente	Creme	-	obrigatório	-	<i>Agrobacterium</i> sp.	JN585710.1 <i>Agrobacterium</i> sp. (96)
24	Superfície foliar	Branca	-	facultativo	-	nd	nd
EH 2012-36	Superfície foliar	Amarela	-	obrigatório	-	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	NR_104773.1 <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> (97)

^a isolados identificados pelo sequenciamento do rRNA de 16S. Os códigos e porcentagem correspondem à identificação e similaridade encontrada com isolados depositados no GenBank
nd – não determinado

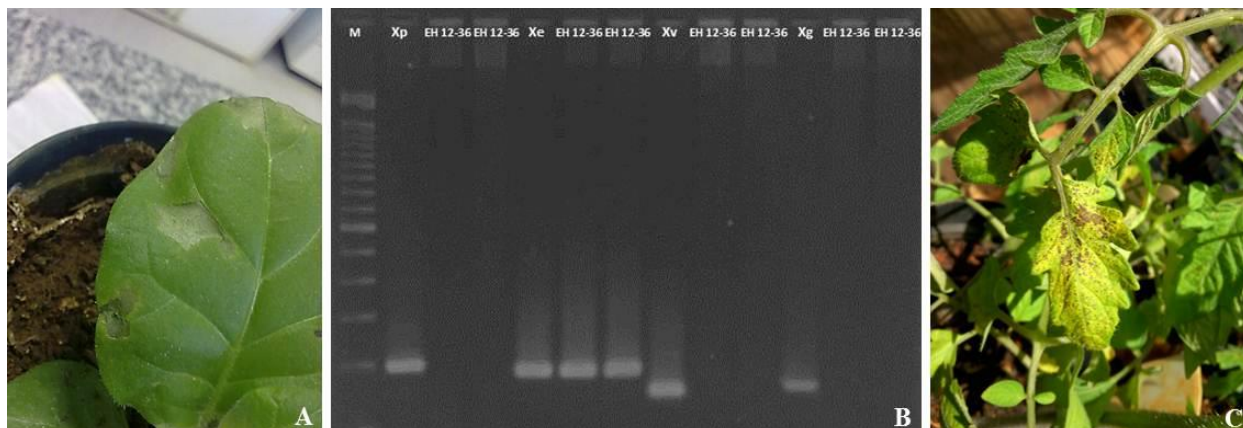


Figura 1. Procedimentos para identificação do isolado EH 2012-36 (*Xanthomonas euvesicatoria*) presente no filoplano de mudas assintomáticas de tomateiro. A – reação de hipersensibilidade em fumo 24 horas após infiltração de suspensão bacteriana (5×10^8 UFC ml⁻¹); B – amplificação de iniciadores específicos Bs-XeF/XeR de *X. euvesicatoria*. C – sintomas observados em tomateiro suscetível *Bonny Best*, dez dias após inoculação de suspensão bacteriana (5×10^8 UFC ml⁻¹).

Antibiograma indica possíveis antibióticos para uso em meio semi-seletivo

Com o conjunto de antibióticos utilizados, nas concentrações comercialmente disponíveis, não seria possível o desenvolvimento de um mesmo meio para as quatro espécies-alvo: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (Tabela 2, Figura 2). Porém, sete antibióticos [Ampicilina (10); Cefalotina (30); Cefazolina (30); Clindamicina (2); Nitrofurantoina (300); Oxacilina (1) e Penicilina G. (10)] mostraram-se promissores para compor um meio semi-seletivo para *X. perforans*. Nenhum destes antibióticos inibiu o crescimento de *X. perforans*, e ao mesmo tempo estes produtos causaram halos de inibição em isolados de coloração amarela (*Sphingomonas* sp., *Sphingobium* sp.), que são mais facilmente confundidos com *Xanthomonas*. Isolados de coloração creme ou translúcida não foram inibidos pelos antibióticos testados.

Tabela 2. Resposta de isolados de *Xanthomonas* spp. causadores da mancha-bacteriana do tomateiro e isolados associados a sementes e mudas a diferentes antibióticos

Antibióticos (µg)	Halo de inibição (mm) ^a											
	EH 2012-22 Xp	EH 2006-44 Xp	EH 2011-37 Xg	EH 2010-64 Xg	EH 2009-46 Xe	EH 2009-130 Xe	EH 2010-41 Xv	EH 1995-104 Xv	Isolado 3	Isolado 6	Isolado 10	Isolado 11
Ac. Pipemídico (PIP 20)	28	31	26	24	31	>30	37	>30	nd	nd	nd	nd
Amicacina (AML 30)	30	32	31	>30	34	36	31	>30	nd	nd	nd	nd
Ampicilina (AMP 10)	0	0	19	19	0	0	22	>40	3	0	>30	12
Cefalotina (CFL 30)	0	0	11	15	0	0	18	>30	2	0	21	0
Cefazolina (CFZ 30)	0	0	0	0	9	10	9	21	11	0	21	0
Cefoxitina (CFO 30)	17	19	24	26	18	>30	30	>30	nd	nd	nd	nd
Ceftriaxona (CRO 30)	14	13	28	31	10	14	38	>40	nd	nd	nd	nd
Ciprofloxacina (CIP 5)	33	>40	29	>30	>40	>40	>40	>40	nd	nd	nd	nd
Clindamicina (CLI 2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cloranfenicol (CLO 30)	40	35	>40	>40	>40	>40	>40	>40	nd	nd	nd	nd
Eritromicina (ERI 15)	31	28	>30	35	31	30	32	>30	nd	nd	nd	nd
Gentamicina (GEN 10)	21	24	23	24	28	23	25	23	nd	nd	nd	nd
Nitrofurantoina (NIT 300)	0	0	0	13	0	14	0	9	0	0	15	17
Oxacilina (OXA 1)	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
Penicilina G. (PEN 10)	0	0	15	18	12	19	17	>30	9	0	31	0
Tetraciclina (TET 30)	>36	37	>40	>40	>40	43	>40	>40	nd	nd	nd	nd
Tobramicina (TOB 10)	19	21	20	23	20	27	20	>20	nd	nd	nd	nd
Morfloxacina (NOR 10)	25	>30	18	23	35	>40	32	>40	nd	nd	nd	nd
Cotrimoxazol (SUT 25)	0	12	30	>30	0	34	29	>40	nd	nd	nd	nd

^a valores médios de inibição de acordo com o ensaio em triplicata
Xp = *X. perforans*; Xg = *X. gardneri*; Xe = *X. euvesicatoria*; Xv = *X. vesicatoria*

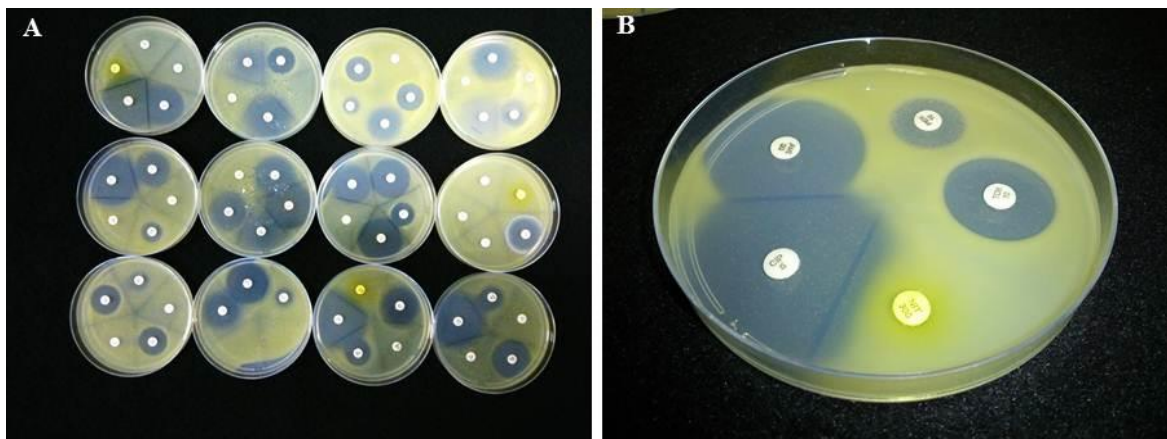


Figura 2. Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Xanthomonas* associadas à mancha-bacteriana do tomateiro a diferentes antibióticos. A – reação de sensibilidade de *X. perforans* (EH 2012-22); B – reação de sensibilidade de *X. vesicatoria* (EH 2010-41).

Discussão

A detecção das espécies causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro em sementes naturalmente infectadas é bastante difícil de ser realizada, devido às baixas concentrações dos patógenos. Em boletim publicado no ano de 2013 pela EPPO/OEPP (European and Mediterranean Plant Protection Organization/Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes), a Federação Internacional de Sementes - *International Seed Federation* (ISF) recomenda uma amostra mínima de 10.000 sementes de tomate ou pimentão para detecção dos agentes causadores da mancha-bacteriana. Subamostras menores (por exemplo, 5 de 2.000 sementes) são recomendadas se altas populações de bactérias saprófitas estiverem presente nas amostras, podendo mascarar a presença potencial de *Xanthomonas*. No presente levantamento, foi detectado um isolado *X. euvesicatoria* numa subamostra de 16 bandejas (≈ 2.240 sementes) que pertencia a um lote de 2635 bandejas. Logo, a baixa detecção de *Xanthomonas* spp. associadas às mudas pode estar relacionado ao número reduzido de amostras e/ou às constantes aplicações de cúpricos no manejo de rotina do viveiro comercial (entre 3 e 4 aplicações semanais).

Outro fator que pode interferir na detecção das espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha-bacteriana é o tipo de estratégia que membros deste gênero utilizam para colonização da superfície foliar. Segundo Beattie e Lindow (1999), representantes de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* abrigam-se em locais da superfície foliar de difícil remoção por lavagem com água, além disso, a espécie, assim que entra em contato com a superfície foliar

de tomate ou pimentão, coloniza num primeiro momento, a região intercelular, para posteriormente iniciar um fluxo contínuo para a superfície da folha. Contudo, os mesmos autores afirmam que, quando a espécie é encontrada na superfície foliar de hospedeiros assintomáticos, isso se torna um bom indício de futuras ocorrências da doença, uma vez que a bactéria já se estabeleceu internamente. Outra característica que pode estar relacionada à difícil detecção de isolados do gênero *Xanthomonas*, é sua conhecida capacidade de formar biofilme na superfície foliar de plantas, por meio do polissacarídeo conhecido como xantana (Ramey *et al.* 2004; Rigano *et al.* 2007). Com a produção da goma xantana, essas bactérias podem formar aglomerados pontuais na superfície foliar, como um mecanismo de resistência e sobrevivência, dificultando dessa forma, sua detecção por meio das coletas de água superficial em pontos específicos dos folíolos. Vale ressaltar, que a princípio, considera-se que a presença de *X. euvesicatoria* na superfície foliar de mudas assintomáticas estaria diretamente relacionado à presença da bactéria nas sementes, uma vez que o viveiro apresentava manejo adequado e preventivo para o controle da doença.

Mais um fato a ser considerado, é a presença de *Xanthomonas* spp. em plantas assintomáticas de tomateiro, o que pode se tornar um problema no campo, desde que haja condições favoráveis para tal. Essa associação de plantas assintomáticas e ocorrência de doença em campo já foi observada por Champoiseau *et al.* (2009), relacionando a presença de *Xanthomonas albilineans* epifiticamente e a posterior infecção de cana de açúcar.

O gênero *Sphingomonas* já havia sido relatado como bactéria naturalmente presente em sementes de tomateiro, representando 23,3% das amostras, em levantamento realizado por Mbega *et al.* (2012b), quando estes autores verificaram a presença comum de bactérias parecidas com *Xanthomonas* em amostras provenientes da Tanzânia. Adicionalmente, bactérias desse gênero já apresentaram efeito benéfico em um modelo desenvolvido em *Arabidopsis thaliana*, onde foi verificada a proteção *in planta* contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Innerebner *et al.* 2011). Por conseguir consumir um espectro maior de fontes de carbono, os autores deste trabalho sugerem que o antagonismo exercido neste caso, seja possivelmente pela competição por substratos. Em teste preliminar realizado neste estudo, não foi verificada antibiose *in vitro* de isolados de *Sphingomonas* e *Sphingobium* contra *Xanthomonas* spp. (dados não mostrados). Por sua vez, Ma *et al.* (2013) verificaram atividade antagonica dos gêneros *Sphingomonas*, *Sphingobium* e *Enterobacter* contra *Meloidogyne hapla* e/ou *Ralstonia solanacearum*. Os isolados obtidos de sementes e

superfície foliar neste trabalho devem ser melhor avaliados, tanto *in vitro* como *in planta*, para caracterização do seu potencial de controle biológico.

Os meios até o presente momento disponíveis para detecção de *Xanthomonas* causadoras da mancha-bacteriana, CKTM (Sijam *et al.* 1991) e TMB (McGuire *et al.* 1986) foram previamente testados (dados não mostrados), porém não demonstraram eficiência satisfatória para os isolados nacionais. A inibição do crescimento de isolados brasileiros está possivelmente associada à excessiva quantidade de antibióticos utilizados. Estes meios são oficialmente recomendados pelo Manual de Análise Sanitária de Sementes, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2009). Desta forma, recomenda-se o preparo de meio semi-seletivo com antibióticos promissores como penicilina e ampicilina, que produziram os maiores halos de inibição para os isolados similares morfológicamente a *Xanthomonas*, para verificação de especificidade, supressividade e sensibilidade do mesmo, a fim de se obter uma nova proposta de meio de cultura que se adeque às condições exigidas pelas espécies causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro.

Referências

- Abd-Alla, M.H., Bashandy, S.R. 2008. Bacterial wilt and spot of tomato caused by *Xanthomonas vesicatoria* and *Ralstonia solanacearum* in Egypt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:291–292.
- Aysan, Y., Uygur, S. 2005. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava*, causal agent of pith necrosis of tomato, on weeds in Turkey. *Journal of General Plant Pathology* 87:135-139.
- Beattie, G.A., Lindow, S.E. 1999. Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. *Phytopathology* 89:353-359.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Análise Sanitária de Sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 200 p.
- Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2013. *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. European and Mediterranean Plant Protection Organization/ Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes. PM 7/110 (1) 43:7–20.
- Champoiseau, P., Rott, P., Daugrois, J-H. 2009. Epiphytic populations of *Xanthomonas albilineans* and subsequent sugarcane stalk infection are linked to rainfall in Guadeloupe. *Plant Disease* 93:339-346.
- Ftayeh, R.M., von Tiedemann, A., Rudolph, K.W.E. 2011. A new selective medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seed. *Phytopathology* 101:1355-1364.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Innerebner, G., Knief, C., Vorholt, J.A. 2011. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Applied and Environmental Microbiology* 77:3202–3210.

Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., Schaad, N.W. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27:755–762.

Kimura, O. 1981. Importância das populações "residentes" de fitobactérias na epidemiologia de enfermidades bacterianas. *Fitopatologia Brasileira* 6:310-311

Koenraadt, H., van Betteray, B., Germain, R., Hiddink, G., Jones, J.B., Oosterhof, J., Rijlaarsdam, A., Roorda, P., Woudt, B. 2009. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *Acta Horticulturae* 808:99–102.

Kornev, K.P., Matveeva, E.V., Pekhtereva, E.Sh., Polityko, V.A., Ignatov, A.N., Punina, N.V., Schaad, N.W. 2009. *Xanthomonas* species causing bacterial spot of tomato in the Russian Federation. *Acta Horticulturae* 808:243-245.

Lane, D.J. *Bacterial Systematics*. Ed. Stackebrandt, E., Goodfellow, M. 1991. John Wiley and Sons, New York, pp. 115–175.

Leben, C. 1963. Multiplication of *Xanthomonas vesicatoria* on tomato seedlings. *Phytopathology* 53:778-781.

Leben, C. 1981. How plant pathogenic bacteria survive. *Plant Disease* 63:633-637.

Lindemann, J., Arny, D.C., Upper, C.D. 1984. Epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on snap bean and nonhost plants and the incidence of bacterial brown spot disease in relation to cropping patterns. *Phytopathology* 74:1329-1333.

Ma, L., Cao, Y.H., Cheng, M.H., Huang, Y., Mo, M.H., Wang, Y., Yang, J.Z., Yang, F.X. 2013. Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. *Antonie van Leeuwenhoek* 103:299–312.

Mahuku, G.S. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:71–81.

Marcuzzo, L.L. 2009. Importância das populações epifíticas na epidemiologia de enfermidades bacterianas. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 8:146-151.

- Mbega, E.R., Mabagala, R.B., Adriko, J., Lund, O.S., Wulff, E.G., Mortensen, C.N. 2012a. Five species of xanthomonads associated with bacterial leaf spot symptoms in tomato from Tanzania. *Plant Disease* 96:760.
- Mbega, E.R., Wulff, E.G., Mabagala, R.B., Adriko, J., Lund, O.S., Mortensen, C.N. 2012b. Xanthomonads and other yellow-pigmented *Xanthomonas*-like bacteria associated with tomato seeds in Tanzania. *African Journal of Biotechnology* 11:14303-14312.
- McGuire, R.G., Jones, J.B., Sasser, M. 1986. Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. *Plant Disease* 70:887–891.
- Myung, I.-S., Moon, S.Y., Jeong, I.H., Lee, Y.-K., Lee, Y.H., Ra, D.S. 2009. Bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas perforans*, a new disease in Korea. *Plant Disease* 93:1349.
- Quezado-Duval, A.M., Lopes, C.A., Leite Júnior, R.P., Lima, M.F., Camargo, L.E.A. 2005. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. *Acta Horticulturae* 695:101–108.
- Ramey, B.E., Koutsoudis, M., von Bodman, S.B., Fuqua, C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Current Opinion in Microbiology* 7:602-609.
- Rodrigues Neto, J. 2000. Doenças bacterianas do tomateiro. In: Sinigaglia, C., Rodrigues Neto, J., Collaricio, A., Vicente, M., Groppo, G., Gravena, S., Leite, D. Manejo Integrado de Pragas e Doenças do Tomateiro. São Paulo. Manual Técnico – série especial, 6.:42-52.
- Rigano, L.A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendín, L., Filippone, P., Torres, P.S., Qüesta, J., Dow, J.M., Castagnaro, A.P., Vojnov, A.A., Marano, M.R. 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1222-1230.
- Schaad, N.W., Donaldson, R.C. 1980. Comparison of two methods for detection of *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seeds. *Seed Science and Technology* 8:383-391.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. St Paul: American Phytopathological Society Press.

Schuster, M.L., Coyne, D.P. 1974. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology 12:199-221.

Sijam, K., Chang, C.J., Gitaitis, R.D. 1991. An agar medium for the isolation and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from seed. Phytopathology 81:831–834.

van der Wolf, J.M., van der Zouwen, P.S., van der Heijden, L. 2013. Flower infection of *Brassica oleracea* with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* results in high levels of seed infection. European Journal of Plant Pathology 136:103-111.

CONCLUSÕES GERAIS

- ❖ Considerando as quatro espécies que podem causar a mancha-bacteriana do tomateiro e suas respectivas raças, *Xanthomonas perforans* (raça T3) são espécie e raça prevalentes nos campos brasileiros de produção de tomate.
- ❖ Protocolos baseados na técnica de PCR com iniciadores específicos, em formato simples ou *multiplex*, são eficientes na detecção e identificação simultâneas dos agentes causais da mancha-bacteriana do tomateiro.
- ❖ *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri* apresentam melhor adaptabilidade em uma faixa térmica divergente. Além disso, ambas necessitam de um período de molhamento foliar superior a seis horas para incitar doença em tomateiro.
- ❖ É possível detectar *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha-bacteriana no filoplano de mudas assintomáticas de tomateiro.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- ❖ Uma vez que não foram encontrados muitos isolados da raça T4 de *Xanthomonas perforans*, a inserção de um transposon dentro do gene *avrXv3*, de forma artificial, auxiliaria em estudos futuros sobre essa raça nas condições brasileiras. No mesmo sentido, o desenvolvimento de variedades resistentes deve ter como suporte uma base genética que apresente algum nível de resistência tanto para raça T3 como para T4. Os levantamentos sistemáticos da frequência de ocorrência de espécies e raças de *Xanthomonas* associadas à mancha-bacteriana devem ser continuados nos próximos anos.
- ❖ Utilização dos protocolos, desenvolvidos no presente estudo, para detecção e identificação das *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro em diferentes laboratórios, como uma importante ferramenta de diagnose.
- ❖ Ajustar os dados obtidos no ensaio do efeito da temperatura e molhamento foliar sobre a severidade da doença, para diferentes modelos matemáticos e levá-los para validação em campo. A validação em campo, com base na severidade estimada, deve considerar o melhor momento para aplicação de um determinado produto químico, a fim de garantir a mesma produtividade com um menor custo de controle.
- ❖ Avaliar a sensibilidade e supressividade de um meio seletivo, com base nos antibióticos mais promissores. Avaliar o potencial de controle biológico da mancha-bacteriana do tomateiro, utilizando os isolados representantes dos diferentes gêneros bacterianos encontrados em mudas assintomáticas e sementes.

ANEXOS
