



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

**COMPETITIVIDADE ENTRE ESPÉCIES DE
XANTHOMONAS CAUSADORAS DA
MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO**

EDIVÂNIO RODRIGUES DE ARAÚJO

Brasília – DF
2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

**COMPETITIVIDADE ENTRE ESPÉCIES DE
XANTHOMONAS CAUSADORAS DA
MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO**

EDIVÂNIO RODRIGUES DE ARAÚJO

Orientador: Adalberto Corrêa Café Filho

Dissertação apresentada ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia

Brasília – DF
2010

Trabalho executado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do professor Adalberto Corrêa Café Filho, com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

COMPETITIVIDADE ENTRE ESPÉCIES DE *XANTHOMONAS* CAUSADORAS DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

EDIVÂNIO RODRIGUES DE ARAÚJO

Banca Examinadora:

Adalberto Corrêa Café Filho, Ph.D.
Universidade de Brasília
(Orientador)

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

Betania Ferraz Quirino, Ph.D.
Embrapa Agroenergia
(Examinador)

FICHA CATALOGRÁFICA

Araújo, Edivânio Rodrigues

Competitividade entre espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro.

Orientação: Adalberto Corrêa Café Filho. Brasília, 2010. 82p.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Departamento de Fitopatologia, 2010

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARAÚJO, E.R. Competitividade entre espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro. Brasília, Universidade de Brasília, Dissertação de Mestrado, 2010. 82p.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Edivânio Rodrigues de Araújo

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Competitividade entre espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro.

GRAU: MESTRE ANO: 2010

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado 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.

Edivânio Rodrigues de Araújo
CPF: 007.834.161-21

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é base para todas as coisas em minha vida.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, paciência, disponibilidade, compreensão e apoio em todos os momentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho, com muito amor e respeito agradeço!!

Aos meus orientadores, Adalberto Corrêa Café Filho e Alice Maria Quezado Duval, pelo apoio, ensinamentos e incentivo durante este projeto.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília que contribuíram para minha formação acadêmica.

À Embrapa Hortaliças, pela disponibilidade de espaço e equipamentos para realização dos trabalhos.

Ao doutorando Nadson de Carvalho Pontes e ao pesquisador Antonio Williams Moita, pelas fundamentais ajudas na análise estatística.

Aos funcionários e estagiários da Embrapa Hortaliças, Bruno, Carielli, Josineide, Rayane, Cléia, Maurício, Manuela, André, Helena, Jocilene, Izabela, Eremita e Wilson, pelos auxílios nos trabalhos e momentos de descontração.

Aos amigos, que estiveram sempre comigo nessa caminhada, Roberta, Niday, Flávio, Dina, Pablo, Celso, Fernanda, Fabiane, Priscila, Maria e Leila.

Aos eternos e fiéis amigos, Lídia, Ana Paula, Eduardo, Fábio, Fabiana, Renato e em especial, a um amigo-irmão, que demonstrou sempre lealdade e amizade verdadeira, que é e sempre será importante no decorrer da minha vida, Bruno Tarchetti Diniz.

A todos meus familiares pelo apoio, torcida e orações.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a execução deste trabalho

SUMÁRIO

Resumo Geral	1
Dissertation Abstract	3
Revisão de Literatura	5
A cultura do tomate	5
O gênero <i>Xanthomonas</i>	6
A mancha Bacteriana	7
Histórico da Classificação do Patógeno	10
Referências Bibliográficas	13
Capítulo I – Efeito da temperatura sobre componentes de patogenicidade da mancha bacteriana do tomateiro e competitividade entre <i>Xanthomonas perforans</i> e <i>X. gardneri</i>	19
Resumo	20
Abstract	22
Introdução	24
Material & Métodos	28
Resultados & Discussão	36
Referências Bibliográficas	53
Capítulo II – Competitividade entre isolados de <i>Xanthomonas</i> <i>perforans</i> resistentes e sensíveis a cobre	60
Resumo	61
Abstract	62
Introdução	63

Material & Métodos	65
Resultados & Discussão	69
Referências Bibliográficas	75
Anexo I	79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Principais medidas de controle de doenças bacterianas em tomateiro. ...	9
Tabela 2 Espécies de <i>Xanthomonas</i> associadas a tomate e pimentão.	12
Tabela 1.1 Isolados de <i>Xanthomonas</i> associados à mancha bacteriana utilizados nos diferentes ensaios com respectivos locais de origem.	28
Tabela 1.2 Relação dos isolados de <i>Xanthomonas perforans</i> e <i>X. gardneri</i> inoculados individualmente ou em combinação em plantas de tomate suscetível. .	32
Tabela 1.3 Análise de variância do modelo fatorial-aninhado (hierárquico) utilizado para análise estatística do experimento que avalia o efeito da temperatura sobre a severidade da doença.	36
Tabela 1.4 Período de incubação de isolados de <i>Xanthomonas</i> causadoras da mancha bacteriana do tomateiro em diferentes temperaturas.	41
Tabela 1.5 Isolados de <i>Xanthomonas perforans</i> , <i>X. gardneri</i> e <i>X. euvesicatoria</i> avaliados quanto à produção de bacteriocinas.	50
Tabela 2.1 Isolados de <i>Xanthomonas perforans</i> e respectivos locais de origem utilizados para teste de sensibilidade a cobre.	66
Tabela 2.2 Reação de isolados de <i>Xanthomonas perforans</i> a sulfato de cobre em três diferentes concentrações.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Sintomas de mancha bacteriana em tomateiro.	8
Figura 1.1 Metodologia empregada para utilização do programa QUANT.	30
Figura 1.2 Esquema do experimento ilustrando a relação fatorial entre temperatura e espécies e de aninhamento de isolados, representados pelos respectivos números, dentro da espécie.	31
Figura 1.3 Percentual de área foliar lesionada em plantas de tomate, 10 dias após a inoculação com diferentes espécies de <i>Xanthomonas</i> e mantidas em diferentes temperaturas. Barras que apresentam a mesma letra não diferem significativamente (LSD, $p \leq 0,05$).	39
Figura 1.4 Resposta das diferentes espécies de <i>Xanthomonas</i> causadoras da mancha bacteriana do tomateiro a três diferentes temperaturas sob condições controladas.	40
Figura 1.5 Percentual de área foliar lesionada em plantas de tomate, 12 dias após a inoculação com isolados de <i>Xanthomonas perforans</i> , <i>X. gardneri</i> e combinação de ambas em casa de vegetação, com temperatura média de 28,7°C durante o período do ensaio. Barras que apresentam a mesma letra não diferem significativamente (LSD, $p \leq 0,05$). XP = <i>Xanthomonas perforans</i> . XG = <i>Xanthomonas gardneri</i> . XP+XG = combinação de um isolado de <i>X. perforans</i> e um isolado de <i>X. gardneri</i>	43
Figura 1.6 Lesões foliares com perfurações características de <i>Xanthomonas perforans</i>	44
Figura 1.7 Recuperação de isolados de <i>Xanthomonas perforans</i> e <i>X. gardneri</i> em meio NA+amido(1%) a partir de lesões foliares de plantas de tomate inoculadas com ambas as espécies e mantidas em casa de vegetação, com temperatura média de 28,7°C durante o período do ensaio.	45
Figura 1.8 Colônias de <i>Xanthomonas</i> isoladas em meio NA + amido(1%).	46
Figura 1.9 Perfil BOX-PCR dos isolados.	48
Figura 1.10 Halos de inibição produzidos por isolados de <i>Xanthomonas perforans</i>	52
Figura 2.1 Percentual de área foliar lesionada em plantas de tomate, 12 dias após a inoculação com diferentes isolados de <i>Xanthomonas perforans</i> resistentes ou sensíveis a cobre e combinações de ambos. Barras que apresentam a mesma letra não diferem significativamente (LSD, $p \leq 0,05$).	72
Figura 2.2 Recuperação em meio MMCC acrescido ou não com sulfato de cobre (100ppm) de isolados de <i>Xanthomonas perforans</i> resistentes e sensíveis a cobre, 12 dias após a inoculação destes isolados em diferentes combinações.	74

Resumo Geral

Competitividade entre espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro

Dentre as doenças que acometem a tomaticultura nacional, a mancha bacteriana é uma das mais importantes, principalmente para o segmento de processamento industrial. A mancha bacteriana é causada por quatro diferentes espécies do gênero *Xanthomonas*, a saber, *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*. Os objetivos desta dissertação foram avaliar o efeito da temperatura sobre componentes da patogenicidade das espécies causadoras da mancha bacteriana; observar a competitividade entre as espécies *X. perforans* e *X. gardneri* *in vitro* e *in planta* e avaliar a competitividade entre isolados de *X. perforans* sensíveis e resistentes ao cobre. Para a primeira etapa, isolados representantes das quatro espécies foram inoculados em plantas de tomate de variedade suscetível Yuba (CNP 851) e submetidos a diferentes temperaturas constantes para posterior quantificação de severidade e período de incubação. Realizaram-se testes para verificação de inibição de crescimento *in vitro*, o que pode estar relacionado à produção de bacteriocina. Inoculações em casa de vegetação de isolados de *X. perforans* e *X. gardneri* foram realizadas para quantificação da doença e observação de competitividade entre ambas. Da mesma maneira, isolados sensíveis e resistentes a cobre foram inoculados conjuntamente no intuito de verificar a ocorrência de competitividade entre estes. Pôde-se observar que tanto a severidade, como o período de incubação, foram influenciados diretamente pela temperatura. *Xanthomonas perforans* mostrou-se mais agressiva sob temperaturas mais elevadas, enquanto *X. gardneri* foi favorecida por temperaturas menores. *Xanthomonas euvesicatoria* foi menos agressiva para todas as temperaturas avaliadas, enquanto *X. vesicatoria* apresentou uma maior constância para estas temperaturas. As inoculações

individuais e conjuntas demonstraram vantagem competitiva de *X. perforans* para causar doença, bem como uma maior frequência de recuperação, em meio de cultura, de *X. perforans* em relação a *X. gardneri*, evidenciando essa vantagem competitiva da espécie. Foi verificada a inibição no crescimento de três isolados brasileiros de *X. euvesicatoria* por parte de um isolado nacional de *X. perforans*, provavelmente relacionado com a produção de bacteriocina. Já entre os isolados de *X. perforans* resistentes e sensíveis a cobre, pôde-se observar, de forma geral, uma maior severidade da doença para os isolados sensíveis, indicando que isolados resistentes podem ter redução de agressividade quando na ausência do seu produto de controle. Este é o primeiro relato de isolados brasileiros de *Xanthomonas* associados à mancha bacteriana do tomateiro com ação específica de inibição a outros isolados de espécies correlatas, bem como o primeiro estudo sobre o efeito da temperatura sobre este patossistema no Brasil, considerando as quatro diferentes espécies que causam a doença e também a primeira constatação de perda de competitividade de *X. perforans* associada à aquisição de resistência ao cobre.

Palavras chaves: *Xanthomonas*; mancha bacteriana; competitividade.

Dissertation Abstract

Assessment of competitive traits among species of *Xanthomonas* causing bacterial spot of tomatoes

Bacterial spot of tomato stands out as one of the main diseases of this crop, especially for the segment of industrial processing. The disease is caused by four different species of the genus *Xanthomonas*, namely, *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* and *X. gardneri*. The objectives of this dissertation were to evaluate the effect of temperature on pathogenic components of bacterial spot caused by each species separately, to assess the competitiveness between *X. perforans* and *X. gardneri* *in vitro* and *in planta* and to compare the fitness of strains of *X. perforans* sensitive and resistant to copper. In the first assay, isolates representative of all four species were inoculated on tomato plants of susceptible variety Yuba (CNP 851) and subjected to different constant temperatures for subsequent quantification of disease severity and period of incubation. *In vitro* competition tests were carried out in order to check for growth inhibition, which may be related to the production of bacteriocin. A greenhouse test, with isolates of *X. perforans* and *X. gardneri* was performed to quantify the disease caused by each species, and to compare the competitiveness of the two species, when inoculated simultaneously. Similarly, *X. perforans* isolates sensitive and resistant to copper were inoculated either isolated or in various combinations in order to verify possible loss of fitness associated with naturally-acquired copper resistance. Both disease severity, as well as the incubation period, were directly influenced by temperature: *X. perforans* was more aggressive under high temperatures, while *X. gardneri* showed preference for lower temperatures. *X. euvesicatoria* was the least aggressive in all temperatures tested, whereas *X. vesicatoria* aggressiveness was more stable at all temperature tested. The individual and combined

inoculations demonstrated fitness advantage of *X. perforans* over *X. gardneri*, and also higher frequency of recovery in culture medium of *X. perforans*, indicating a fitness edge for that species. One single Brazilian isolate of *X. perforans* was found to inhibit the growth of three Brazilian isolates of *X. euvesicatoria*, probably related to the production of bacteriocin. Among *X. perforans* isolates resistant and sensitive to copper, greater disease severity was associated with sensitivity to copper, indicating that resistant isolates may have reduced aggressiveness when in the absence of Cu. This is the first account of Brazilian strains of *Xanthomonas* associated with bacterial spot of tomato with the specific action of inhibiting other strains of related species, the first study on the effect of temperature on this disease in Brazil, considering that four different species cause disease. This was the first report that reduced fitness of *X. perforans* associated with the acquisition of copper resistance.

Key words: *Xanthomonas*; bacterial spot; fitness.

Revisão de Literatura

A cultura do tomate

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*, sin.: *Lycopersicon esculentum*, Mill.), atualmente com cultivo universal, teve origem da espécie andina *L. esculentum* var. *cerasiforme*, que produz fruto tipo cereja. As cores da espécie nativa eram de tons amarelados ou avermelhados, tendo a planta forma de moita, devido à flexibilidade do seu caule. Foi introduzido na Europa pela Espanha entre 1524 e 1554. Inicialmente era utilizado como planta ornamental por temor à toxicidade, o que retardou o seu uso culinário (Filgueira, 2001). O tomate foi a primeira hortaliça a ser processada, antes de outros condimentos, como o alho e a cebola, que possuem longevidade pós-colheita muito maior por serem bulbos. Inicialmente, a preparação era caseira (conserva ou massa), passando depois aos processos industriais. Essa evolução ocorreu na Europa, Estados Unidos da América e no Brasil, em períodos diferentes, mas cumprindo os mesmos estágios (Camargo et al., 2006).

A tomaticultura movimenta uma cifra anual superior a R\$ 2 bilhões, cerca de 16% do PIB gerado pela produção de hortaliças no Brasil. No ano de 2008, o Brasil teve um total de 55 mil hectares destinados à cultura, sendo 17 mil hectares destinados para o segmento de processamento industrial e 38 mil hectares para o segmento mesa. No Sudeste, está a maior concentração da área plantada de tomate para consumo *in natura*, com 57%. O restante do Brasil, Centro Oeste e Nordeste participam com 24% do total da área plantada de tomate de mesa. Já o tomate para processamento industrial tem 62% de sua área em Goiás, 20%, em São Paulo e 16% em Minas Gerais (ABCSEM, 2010).

O Gênero *Xanthomonas*

O gênero foi proposto por Dowson em 1939, sendo composto por bactérias Gram-negativas, móveis, com único flagelo polar ou raramente com dois flagelos, não produtoras de esporos, formando colônias com forma arredondada em meio adequado (Elrod & Braun, 1947). As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* constituem um dos grupos de fitopatógenos mais prevalentes na natureza, com capacidade de infectar aproximadamente 390 espécies botânicas, sendo 120 monocotiledôneas e 270 dicotiledôneas (Leyns et al., 1984). A capacidade de causar danos em uma grande variedade de plantas torna o estudo do gênero de grande interesse para a pesquisa básica, bem como para a aplicada, pois a produtividade de diferentes culturas de interesse agrônômico pode ser afetada por patógenos pertencentes a este grupo (Leite Jr., 1990).

De acordo com a classificação filogenética de bactérias baseada em comparações de sequências nucleotídicas, principalmente do rRNA 16S, o gênero *Xanthomonas* pertence ao filo *Proteobacteria*, classe Gammaproteobacteria, ordem Xanthomonadales e família Xanthomonadaceae (Garrity & Holt, 2000). O gênero possui ainda a característica marcante de produzir colônias de coloração amarelada em meio Nutriente Ágar devido à produção de xantomadina (Bradbury, 1993).

A Mancha Bacteriana

A mancha bacteriana tem distribuição mundial, sendo encontrada desde a Oceania até a América do Norte, causando sérios prejuízos para as culturas de tomate e pimentão (Jones & Stall, 1998). No Brasil, a doença 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 apresenta uma gama de hospedeiras bastante diversificada dentro da família botânica 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*, já foram verificadas como espécies hospedeiras naturais da bactéria ou a partir de inoculações artificiais (Dye et al. 1964; Laub & Stall, 1967; Jones & Stall, 1998).

Os sintomas da doença podem ser observados em toda a parte aérea da planta. Nas folhas, aparecem pequenas lesões irregulares e pretas (cerca de 3 mm). As lesões apresentam anasarca em condições de alta umidade do ar. Estas, no entanto, são geralmente mais alongadas quando comparadas com a pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Okabe) que são mais arredondadas. Em ataques severos, as lesões podem coalescer e provocar amarelecimento e morte das folhas (Figura 1A). Normalmente, esses sintomas são primeiramente observados nas folhas baixas. Nas peças florais, usualmente, o ataque resulta em sérios declínios de florescimento. Já em frutos verdes, aparecem manchas levemente elevadas (Figura 1B), que comumente têm halos branco-esverdeados, e alargam-se entre 3 a 6 mm de diâmetro (Higgins, 1922; Kurozawa & Pavan, 1997; Lopes & Quezado-Duval, 2005).

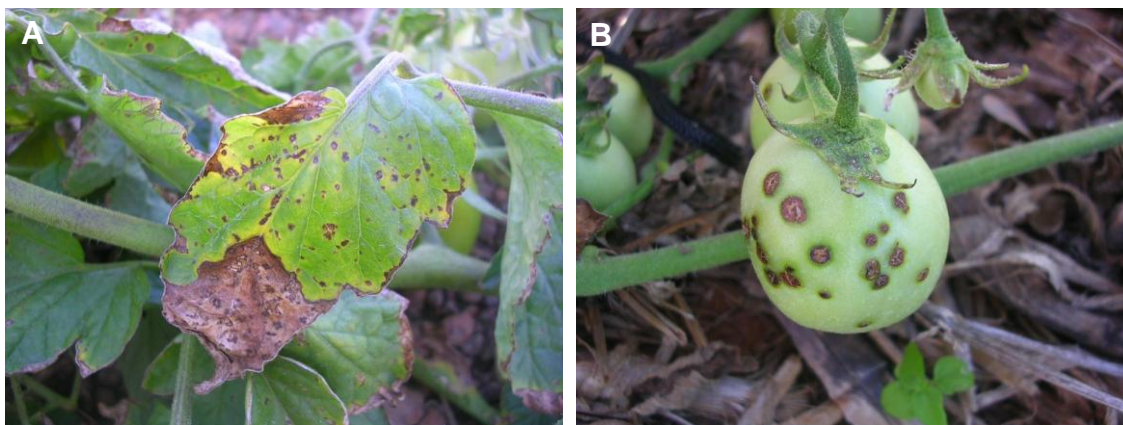


Figura 1: Sintomas de mancha bacteriana em tomateiro. A – Manchas e necrose nas folhas. B – Manchas no fruto. Foto: Alice Quezado-Duval.

A bactéria não sobrevive no solo por longos períodos, entretanto, pode sobreviver em restos culturais ou epifitamente na superfície foliar do tomateiro ou demais hospedeiras (Rodrigues Neto, 2000; Lindemann et al. 1984). A doença é favorecida por temperaturas entre 22,5 e 27,5°C e alta umidade relativa (Morton, 1965). As fitobactérias têm capacidade de multiplicarem-se 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). A bactéria penetra na planta através dos estômatos ou através de ferimentos provocados por equipamentos ou tratos culturais como amarrão e desbrota (Vakili, 1967). A doença é disseminada por respingos de água a curta distância (Romeiro, 1995), por mudas (Leben, 1963), ou sementes infectadas a longa distância (Lopes & Quezado-Soares, 1997).

Estratégias de manejo visam à utilização de sementes livres do patógeno, enterramento de restos culturais e rotação de culturas (Bouzar et al., 1999) (Tabela 1). Para obtenção de sementes livres do patógeno, o tratamento térmico com calor a seco mostra-se eficiente, porém pode ocasionar redução na germinação das mesmas (Carmo et al., 2004). A utilização de antibióticos e produtos à base de cobre para o controle da

doença não tem demonstrado efeito adequado, ou suficiente quando empregados isoladamente. Na realidade, não existem práticas totalmente eficientes de controle, e a mancha bacteriana permanece como uma ameaça contínua para a produção de tomate e pimentão (Abbasi et al., 2002). Resistência varietal pode existir em tomateiros (Scott & Jones, 1989), mas devido à alta adaptabilidade genética do patógeno, atualmente abrangendo quatro espécies e cinco raças, torna-se difícil o desenvolvimento de variedades resistentes de alta estabilidade.

Tabela 1: Principais medidas de controle de doenças bacterianas em tomateiro (Embrapa Hortaliças, 2003).

<i>Recomendação</i>	<i>Pinta bacteriana</i>	<i>Mancha bacteriana</i>	<i>Cancro bacteriano</i>	<i>Murcha bacteriana</i>	<i>Talo-oco podridão de frutos</i>
1) Utilizar sementes de boa qualidade e/ou tratar previamente as sementes	++	++	++	-	-
2) Plantar cultivares resistentes	++	+	+	+	-
3) Não plantar próximo a lavouras velhas de tomate	++	++	++	+	+
4) Evitar ferimentos na plantas (mecânicos, insetos)	-	-	+	+	++
5) Pulverizar com fungicidas cúpricos ou antibióticos	++	++	++	-	+
6) Fazer rotação de cultura	+	+	+	++	+

++ = muito eficiente

+ = pouco eficiente

- = sem eficiência ou eficiência muito baixa

Histórico da classificação do patógeno

A mancha bacteriana 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 amidolítica dos isolados analisados 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 amidolítica, sendo este nomeado como *Bacterium exitiosa* (Gardner & Kendrick, 1921). Na mesma época, Sherbakoff descreveu a doença em pimentão (Sherbakoff, 1918). Posteriormente, os agentes causais foram classificados como *Pseudomonas vesicatoria* em 1925; *Phytophthora vesicatoria* em 1930; e *Xanthomonas vesicatoria* em 1939 (Jones & 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. *Xanthomonas gardneri* já foi encontrada causando epidemias em regiões produtoras de tomate para processamento industrial no Brasil (Quezado-Duval, 2005).

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, estabeleceu-se dois diferentes grupos causadores da mancha bacteriana (Vauterin et al, 1995; 2000): *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (sem atividade amidolítica) e *X. vesicatoria* (amidolítico positivo).

Estudos mais recentes, incluindo testes de patogenicidade, bioquímicos, atividade enzimática, marcadores genéticos, hibridização DNA-DNA e comparação de sequências de RNA, concluíram que dentro do grupo das *Xanthomonas* patogênicas ao tomate e pimentão existem quatro grupos fenotípicos distintos, 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 do grupo em que *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* foi denominada como *Xanthomonas euvesicatoria* e foi incluído no grupo, além das três espécies já existentes, o táxon *X. perforans* entre os agentes causadores da mancha bacteriana (Tabela 2). Além disso, isolados de cada espécie podem ser caracterizados quanto a raças, de acordo com o comportamento de causar ou não reação de hipersensibilidade em variedades diferenciais de tomate e pimentão (Stall et al., 2009).

A posição taxonômica destes organismos ainda é discutida, porém, nesta dissertação será adotada a última proposta de classificação feita por Jones et al. (2004), na qual se considera quatro espécies como agentes causais da mancha bacteriana do tomateiro, a saber: *X. euvesicatoria* (grupo A, raça T1); *X. vesicatoria* (grupo B, raça T2); *X. perforans* (grupo C, raças T3, T4 e T5) e *X. gardneri*, uma vez que estas se diferenciam bioquimicamente e genotipicamente, além de se encontrarem em fase de validação (Euzéby, 2006).

Tabela 2: Espécies de *Xanthomonas* associadas a tomate e pimentão (adaptado de Jones et al. 2005).

<i>Espécies</i>	<i>Grupo Fenotípico</i>	<i>Distribuição</i>	<i>Atividade Amidolítica</i>
<i>X. euvesicatoria</i>	A	Mundialmente	Variável
<i>X. vesicatoria</i>	B	Mundialmente	Positiva
<i>X. perforans</i>	C	Brasil, México, Tailândia, Estados Unidos	Positiva
<i>X. gardneri</i>	D	Costa Rica, Estados Unidos, Iugoslávia, Brasil	Negativa

Referências Bibliográficas

ABBASI, P.A.; SOLTANI, N.; CUPPELS, D.A.; LAZAROVITS, G. Reduction of bacterial spot disease severity on tomato and pepper plants with foliar applications of ammonium lignosulfonate and potassium phosphate. *Plant Disease* 86:1232-1236. 2002.

ABCSEM. Tomate lidera crescimento e lucratividade no setor de hortaliças. 04/01/2010. Disponível em < <http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=284> > Acesso em 10/01/2010.

BOUZAR, H.; JONES, J.B.; STALL, R.E.; LOUWS, F.J.; SCHNEIDER, M.; RADEMAKER, J.L. W.; de BRUIJN, F.J.; JACKSON, L.E. Multiphasic analysis of *Xanthomonas* 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. 1999.

BRADBURY, J.F. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. Slough. C.A.B. International. 1993. 332p.

BURKHOLDER, W.H. & LI, C.C. Variation in *Phytomonas vesicatoria*. *Phytopathology* 31:753-755. 1941.

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

CARMO, M.G.F.; CORREA, F.M.; CORDEIRO, E.S.; CARVALHO, A.O. & ROSSETTO, C.A.V. Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. *Horticultura Brasileira* 22:579-584. 2004.

DELEY, J. Modern molecular methods in bacterial taxonomy: evaluation, application, prospects. In: International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 4, Angers. Proceedings ... Angers. 347-357. 1979.

DYE, D.W. Cultural and biochemical reaction of additional *Xanthomonas* species. *New Zealand Journal of Science* 9:913-919. 1966.

DYE, D.W.; STARR, M.P.; STOLP, H. Taxonomic clarification of *Xanthomonas vesicatoria* based upon host specificity, bacteriophage sensitivity, and cultural characteristics. *Phytopathol. Z.* 51:394– 407. 1964.

ELROD, R.P. & BRAUN, A.C. Serological studies of the genus *Xanthomonas*. I-cross-agglutination relationships. *Journal of Bacteriology* 53:509-518. 1947.

EMBRAPA HORTALIÇAS. Sistema de Produção, 1 ISSN ____ Versão Eletrônica. Jan/2003. Disponível em < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/doencas.htm> >. Acesso em 05/12/2009.

EUZÉBY, J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. List. 109. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 925–927. 2006.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia Moderna na Produção e Comercialização de Hortaliças. 2 ed. Viçosa: UFV. 412 p. 2001.

GARDNER, M.W, KENDRICK, J.B. Bacterial spot of tomato. J. Agric. Res 21:123–56. 1921.

GARRITY, G.M. & HOLT, J.G. An overview of the road map to the manual. Systematic Bacteriology. 2ed. New York. Springer. p. 20. 2000.

HILDEBRAND, D.C.; PALLERONI, N.J. & SCHROTH, M.N. Deoxyribonucleic acid relatedness of 24 xanthomonads strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*. Journal of Applied Bacteriology 8:263-269. 1990.

HIGGINS, B.B. The bacterial spot of pepper. Phytopathology 12:501-516. 1922.

JONES, J.B.; BOUZAR, H.; STALL, R.E.; ALMIRA, E.C.; ROBERTS, P.D.; BOWEN, B.W; SUDBERRY, J.; STRICKLER, P.M.; CHUN, J. Systematic analysis of Xanthomonads (*Xanthomonas* ssp.) associated with pepper and tomato lesions. International Journal of Systematic Bacteriology 50:1211-1219. 2000.

JONES, J.B; LACY, G.H.; BOUZAR, H.; MINSAVAGE, G.V.; STALL, R.E. & SCHAAD, N.W. Bacterial spot - worldwide distribution, importance and review. Proc. 1st IS on Tomato Diseases. In: MOMOL, M.T.; JI, P. & JONES, J.B (Eds). Acta Hort. 695:27-33. 2005.

JONES, J.B.; LACY, G.H.; BOUZAR, H.; STALL, R.E.; SCHAAD, N.W. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27:755-762. 2004.

JONES, J.B; & STALL, R.E. Diversity among Xanthomonads pathogenics on pepper and tomato. *Annual Review of Phytopathology* 36:41-58. 1998.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do Tomateiro. In: HIROSHI KIMATI et al. *Manual de Fitopatologia*. Vol. II. São Paulo:Ceres:614-615. 1997.

LAUB, C.A.; STALL, R.E. An evaluation of *Solanum nigrum* and *Physalis minima* as suscept of *Xanthomonas vesicatoria*. *Plant Disease Reporter* 51:659–61. 1967.

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

LEITE JR, R.P. Cancro Cítrico: Prevenção e Controle no Paraná. IAPAR, Londrina – PR. p. 51. (IAPAR, Circular 61). 1990.

LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J.G. & DE LEY, J. The host range of the genus *Xanthomonas*. *Botanical Review* 50:308-356. 1984.

LINDEMANN, J.; ARNY, D.C.; UPPER, C.D. 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. 1984.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, M.A.; Doenças bacterianas. In: LOPES, C. A.; ÀVILA, A. C. Doenças do Tomateiro. Brasília: EMBRAPA-CNPq, p.62-64. 2005.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, M.A. Doenças Bacterianas de Hortaliças. Brasília: Embrapa-CNPq, p. 10-15. 1997.

MORTON, D.J. Comparison of three serological procedures for identifying *Xanthomonas vesicatoria* in pepper leaves. *Phytopathology* 55:421-424. 1965.

QUEZADO-DUVAL, A.M.; LOPES, C.A.; LEITE JUNIOR, R.P.; LIMA, M.F.; CAMARGO, L.E.A. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. In: MOMOL, M.T.; JI, P & JONES, J.B. (Eds). *Acta Hort.* 695:101-108. 2005.

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

RODRIGUES NETO, J. 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, v. 6. p. 42-52. 2000.

ROMEIRO, R.S. *Bactérias Fitopatogênicas*. Viçosa, Imprensa Universitária – UFV, p.367. 1995.

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

SCOTT, J.W. & JONES, J.B. Inheritance of resistance to foliar bacterial spot of tomato incited by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Journal of the American Society of Horticultural Science 114:111-114. 1989.

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

STALL, R.E.; JONES, J.B. & MINSAVAGE, G.V. Durability of resistance in tomato and pepper to Xanthomonads causing bacterial spot. Annual Review of Phytopathology 47:265-284. 2009

SUTIC, D. Bakterioze crvenog patlidzana (Tomato bacteriosis). Posebna Izd. Inst. Zasht. Bilja Beograd (Spec. Edit. Inst. Plant Prot. Beograd) 6:1-65. English summary: Rev. Appl. Mycol 36:734-35. 1957.

VAKILI, N.G. Importance of wounds in bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*) of tomatoes in the field. Phytopathology 57:1099-1103. 1967.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K. & SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology 45:472-489. 1995.

VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J. & SWINGS, J. Synopsis on the taxonomy of the genera *Xanthomonas*. Phytopathology 90:677-682. 2000.

CAPÍTULO I
Efeito da temperatura sobre componentes de
patogenicidade da mancha bacteriana
do tomateiro e competitividade entre
Xanthomonas perforans* e *X. gardneri

Resumo

Efeito da temperatura sobre componentes de patogenicidade da mancha bacteriana do tomateiro e competitividade entre *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*

A mancha bacteriana do tomateiro, atribuída atualmente a quatro diferentes espécies de *Xanthomonas*, é um problema caracterizado como de grande importância em plantações de tomate sob condições ideais de temperatura e umidade. Competitividade é definida como a habilidade de um organismo manter vantagens de crescimento, desenvolvimento e sobrevivência nos repetidos ciclos de vida. Um levantamento realizado pela Embrapa Hortaliças/ESALQ, com isolados de 1995 a 2000, indicou a predominância de *X. gardneri* nas áreas de maior produção nacional. *Xanthomonas perforans*, por sua vez, foi detectada no estado de Goiás, posteriormente, entre isolados coletados em 2002 e 2003. O objetivo do trabalho foi estudar experimentalmente a competitividade entre estas duas espécies e avaliar o efeito da temperatura na severidade e período de incubação das diferentes espécies causadoras da doença. Isolados das quatro diferentes espécies que causam a doença foram inoculados separadamente em plantas de tomate suscetíveis sob diferentes temperaturas (20; 25 e 30°C), para posterior quantificação de porcentagem de área foliar lesionada, utilizando o programa QUANT. Duas espécies, *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri* foram inoculadas em plantas de tomate suscetíveis isoladamente e em combinações para observação de competitividade. Fez-se a recuperação das espécies em meio NA acrescido de amido (1%) para a determinação da frequência de colônias amidolíticas positivas e negativas. Realizaram-se testes para observação de inibição *in vitro* de uma espécie sobre a outra, o que provavelmente está associado à produção de bacteriocinas.

Em relação ao efeito da temperatura sobre a severidade e período de incubação das quatro espécies, observou-se que *X. gardneri* foi mais agressiva que as demais espécies a 20°C, já para a maior temperatura (30°C), *X. perforans* apresentou significativamente maior porcentagem de área foliar lesionada. *Xanthomonas euvesicatoria* apresentou severidade inferior às demais espécies em todas as temperaturas avaliadas, enquanto *X. vesicatoria* apresentou uma maior constância para as três temperaturas. O período de incubação da doença para cada espécie mostrou-se variável de acordo com a temperatura. Na recuperação e contagem de colônias das duas espécies inoculadas conjuntamente, pôde-se observar que, em metade das combinações, encontrou-se apenas colônias de *X. perforans*, para as outras combinações o número de colônias de *X. perforans* apresentou-se significativamente maior que *X. gardneri*. Não foi observado inibição *in vitro* entre os isolados de *X. perforans* e *X. gardneri* utilizados. A inibição foi observada apenas de *X. perforans* sobre *X. euvesicatoria*, com os isolados de referência de ambas as espécies e um isolado brasileiro de *X. perforans* e três isolados nacionais de *X. euvesicatoria*, mostrando-se produtor e indicadores, respectivamente. Estes resultados indicam que a temperatura exerce papel importante na determinação de qual espécie será prevalecente numa determinada região, principalmente em se tratando das espécies *X. perforans* e *X. gardneri*, uma vez que cada uma destas espécies demonstra-se mais adaptada a uma faixa térmica.

Palavras-chaves: mancha bacteriana; temperatura; espécies; competitividade.

Abstract

Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and assessment of competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*

Bacterial spot of tomato, caused by four different species of *Xanthomonas*, is a problem of great importance in tomato crops under ideal conditions of temperature and humidity. Competitiveness is defined as the ability of an organism to maintain growth, development and survival in repeated cycles of life. A survey conducted by Embrapa Hortaliças / ESALQ, with isolates obtained from 1995 to 2000, suggested predominance of *X. gardneri* in the main domestic production areas. *Xanthomonas perforans*, in turn, was detected slightly later in the state of Goiás, among isolates collected in 2002 and 2003. The objective of this study was to evaluate experimentally the competition between these two species and to evaluate the effect of temperature on the severity and incubation period of the four different species that cause the disease. Isolates from the four different species were inoculated separately on susceptible tomato plants under three constant temperatures (20, 25 and 30 ° C) and the percentage of symptomatic leaf area was estimated using the software program QUANT. Two species, *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* were inoculated in susceptible tomato plants alone and in several combinations for determination of competitiveness. The *Xanthomonas* species were recovered in NA medium, amended with starch (1%), for determining the frequency of amidolytic colonies (a biological marker for *X. perforans*). *In vitro* tests were also conducted to observe possible *in vitro* inhibition of one species over another, which is might be associated with the production of bacteriocins. The temperature studies showed that *X. gardneri* is the most aggressive species at 20 °C, whereas at the highest temperature (30 °C), *X. perforans* caused the greater percentage of diseased leaf

area. *Xanthomonas euvesicatoria* was the least aggressive species at all temperatures, whereas *X. vesicatoria* aggressiveness was the most stable at all three temperatures tested. The period of incubation for each species was shown to be variable according to temperature, and was the shortest overall at 25 °C. At the *in planta* competition assays, only *X. perforans* colonies were recovered in half of the combined inoculations, while for the other combinations, the number of colonies of *X. perforans* was significantly greater than the number of *X. gardneri* colonies. No *in vitro* inhibition was observed between isolates of *X. perforans* and *X. gardneri*. Inhibition of *X. perforans* over *X. euvesicatoria* was observed among reference isolates. One Brazilian isolate of *X. perforans* and three isolates *X. euvesicatoria*, were found to be bacteriocin producers and indicators, respectively. These results indicate that temperature has an important role in determining which species will be prevalent in a particular region, especially in the case of *X. perforans* and *X. gardneri*, since each of these species has been shown to be more adaptable to one thermal zone.

Key words: bacterial spot; temperature; species; fitness.

Introdução

A mancha bacteriana, doença causada por diferentes espécies de *Xanthomonas* (Jones et al. 2004), 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). O problema é caracterizado como de grande importância em plantações de tomate sob temperaturas entre 20 e 30 °C (Lopes & Quezado-Duval, 2005). A doença foi apontada por 70% dos produtores, como o maior problema para a produção de tomate para indústria (Villas Bôas et al., 2007).

Diferentes trabalhos propuseram amplitudes térmicas semelhantes para o desenvolvimento ideal da mancha bacteriana. Cox (1966) relatou que temperaturas entre 22,5 e 27,5°C e alta umidade relativa são condições ótimas para o patógeno. Já para Barreto & Scaloppi (2000), a doença é favorecida com temperaturas entre 22 e 28 °C e umidade relativa entre 95 e 100%, associada com presença de água livre, além de ser mais severa em locais onde ocorrem chuvas associadas a ventos fortes. A mancha bacteriana pode também encontrar as condições ideais de temperaturas entre 20 e 30 °C (Lopes & Santos, 1994). Entretanto, tais trabalhos consideraram os agentes causais da mancha bacteriana como um grupo mais homogêneo, não fazendo distinção de espécies.

Algumas doenças são mais severas a baixas temperaturas, outras se desenvolvem mais facilmente em temperaturas mais altas, apesar do agente causal se desenvolver sobre ampla faixa. Por isso, os efeitos da temperatura sobre a doença, assim como de outros fatores ambientais, podem ser atribuídos por agirem sobre o patógeno, sobre o hospedeiro ou sobre a interação entre ambos (Colhoun, 1973).

Competitividade é definida como a habilidade de um organismo manter vantagens comparativas de crescimento, desenvolvimento e sobrevivência nos repetidos ciclos de vida (Vanderplank, 1982). Competição refere-se à disputa entre organismos para obter recursos indispensáveis – nutrientes, água, luz ou espaço – que no habitat, se encontra em quantidade finita para suprir a demanda biológica. A competição por nutrientes e nichos ecológicos pode ocorrer concomitantemente a outros mecanismos antagônicos, como produção de substâncias inibitórias (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Não basta o antagonista ser um potente agente de controle *in vitro*. É preciso conhecer os fatores ecológicos que podem afetar o seu desempenho (Cardoso, 1978; Mariano, 1993).

Andrivon (1993) propôs substituir o termo “agressividade” por “competitividade do patógeno”, uma vez que o primeiro, apesar de designar uma característica exclusiva do microrganismo, tem interação com outros fatores (hospedeira e ambiente) para sua expressão em diferentes níveis (Vanderplank, 1963).

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas de variado peso molecular produzidos pela maioria dos gêneros bacterianos, que apresentam ação bactericida ou bacteriostática, sendo os determinantes genéticos que codificam sua produção, geralmente de natureza plasmidial. Essa ação antagônica é exercida apenas sobre outras bactérias taxonomicamente próximas (Klement et al. 1990; Tagg et al, 1976). Tal característica as diferem dos antibióticos, pois estes têm um efeito antagônico mais abrangente, podendo atingir gêneros ou até reinos diferentes do organismo produtor (Riley & Wertz, 2002).

Os primeiros relatos sobre produção de bacteriocinas foram realizados por André Gratia e envolveram estudos com linhagens de *Escherichia coli* sobre outras linhagens da mesma espécie. As substâncias responsáveis por esse efeito inibitório

foram denominadas de ‘colicinas’ em referência ao microrganismo produtor original. Com a descoberta de que a produção desses compostos não se limitava ao grupo dos coliformes, o termo ‘bacteriocina’ foi proposto para as proteínas antimicrobianas produzidas por microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos (Reeves, 1972).

Bacteriocinas podem ser detectadas em meio líquido, semi-sólido ou sólido, dependendo da espécie (Gangliano & Hindsdill, 1970; Bottone et al, 1971). Os métodos mais utilizados para sua detecção são o de “sobrecamada”, onde a linhagem produtora de bacteriocina é inoculada em meio sólido, incubada e em seguida é colocada uma sobrecamada com meio semi-sólido pré-inoculada com linhagem indicadora; método de “semeio por estrias”, em que a linhagem produtora é riscada em meio sólido e após crescimento, a linhagem indicadora é também riscada perpendicularmente a primeira; e “difusão em poços ou discos de papel”, onde o sobrenadante da linhagem produtora é adicionado aos discos ou poços no meio de cultura sólido, já inoculado com o microrganismo indicador (Mayr-Harting et al, 1972; Hoover & Harlander, 1993).

Sabe-se que a produção e liberação dessas substâncias podem ser influenciadas em diferentes espécies por fatores como tipo de meio de cultura, aeração, ciclo de crescimento e fatores físicos como luz ultra-violeta, entre outros (Biagi & Azevedo, 1992).

Na fitopatologia, o estudo das bacteriocinas adquire relevância sob diferentes aspectos. Gens envolvidos na sua produção podem ser utilizados como marcadores genéticos. Tem uso potencial no controle de fitobacterioses e pode auxiliar em estudos taxonômicos e filogenéticos (Romeiro, 1995; Vidaver, 1983).

A raça 1 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* era a única encontrada causando a mancha bacteriana em tomate na Flórida. Em 1991, a raça 3 (T3) foi identificada em 3 dos 13 campos de produção avaliados no mesmo estado. Já em 1994,

T3 foi observada em 21 dos 28 campos e foi a única presente em 14 deles. A partir de testes *in vitro* e *in vivo*, utilizando cultivares susceptíveis às duas raças, ou só a uma delas, evidenciou-se a dominância da raça 3 com relação à raça 1 nos diferentes testes (Jones et al., 1998). Segundo classificação proposta por Jones et al. (2004), as raças T1 e T3 são denominadas como *Xanthomonas euvesicatoria* e *X. perforans*, respectivamente. Esses resultados indicam que *X. perforans* parece ser mais competitiva que *X. euvesicatoria* e pode explicar o aparecimento de T3 como uma raça prevalecente na Flórida (Jones et al., 1998).

Um levantamento realizado pela Embrapa Hortaliças/ESALQ, com isolados de 1995 a 2000, indicou a predominância de *X. gardneri* em Goiás e Minas Gerais, que concentravam na época a maior produção nacional. *Xanthomonas perforans*, por sua vez, foi detectada no estado de Goiás, posteriormente, entre isolados coletados em 2002 e 2003, indicando um aparecimento acelerado da espécie nos locais avaliados (Quezado-Duval et al., 2005).

Os objetivos deste capítulo foram estudar experimentalmente a competitividade entre *X. perforans* e *X. gardneri* e avaliar o efeito da temperatura na severidade e período de incubação das diferentes espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro.

Material & Métodos

Escolha dos isolados e preparo de inóculo

Todos os experimentos foram realizados no Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (CNPq), Brasília-DF.

Utilizou-se isolados da coleção de trabalho da Embrapa Hortaliças (EH), a exceção de UENF 4135, já identificados como representantes das quatro diferentes espécies de *Xanthomonas* (Tabela 1.1). Os isolados foram riscados do tampão-fosfato (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 pH 7) em meio Nutriente Agar (NA) e incubados por 4 dias a 28°C. Fez-se a repicagem de colônias isoladas para proceder o preparo do inóculo. Utilizou-se uma solução de sulfato de magnésio de 10mMol/L (Sigma Cell Culture $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) para preparo da solução bacteriana e ajustou-se a concentração em espectrofotômetro $OD_{600} = 0,3$ (5×10^8 UFC/mL).

Tabela 1.1: Isolados de *Xanthomonas* associados à mancha bacteriana utilizados nos diferentes ensaios com respectivos locais de origem

<i>Espécies</i>	<i>Isolados</i>	<i>Local de Origem</i>
<i>X. euvesicatoria</i>	EH 411T	Morrinhos – GO
<i>X. euvesicatoria</i>	UENF 4135 ¹	-
<i>X. euvesicatoria</i>	EH 1995-109	Itapaci – GO
<i>X. vesicatoria</i>	EH 1995-95	Itapaci – GO
<i>X. vesicatoria</i>	EH 1990-54	Brasília – DF
<i>X. vesicatoria</i>	EH 89T	Itapaci – GO
<i>X. perforans</i>	EH 1998-436	Petrolina - PE
<i>X. perforans</i>	EH 2006-44	Itaberaí – MG
<i>X. perforans</i>	EH 2007-26	Joviânia – GO
<i>X. perforans</i>	EH 2008-13	Rio Verde – GO
<i>X. perforans</i>	EH 2008-16	Rio Verde – GO
<i>X. gardneri</i>	EH 2006-17	Goiânia – GO
<i>X. gardneri</i>	EH 2006-21	Goiânia – GO
<i>X. gardneri</i>	EH 2006-52	Goiânia – GO
<i>X. gardneri</i>	EH 2007-41	Caí – RS

1. Replicata do isolado obtido da coleção da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacazes, RJ, fornecido por Rosana Rodrigues.

Efeito da temperatura na severidade e período de incubação

Para o ensaio, utilizou-se as quatro espécies associadas à mancha bacteriana, a saber, *X. euvesicatoria* (XE), *X. vesicatoria* (XV), *X. perforans* (XP) e *X. gardneri* (XG), sendo três isolados de cada uma das espécies, XE (411T; 1995-109; UENF 4135), XV (1990-154; 89T; 1995-95), XP (2006-44; 2008-13; 2008-16) e XG (2006-17; 2006-21; 2006-52), os quais foram inoculados em plantas de tomate da variedade suscetível Yuba (CNPq 851), quando estas apresentavam de cinco a seis folhas verdadeiras.

Uma câmara incubadora (*Percival MR*) com temperatura ajustável e controlada foi utilizada para propiciar as condições desejadas no ensaio. Ajustou-se a câmara para um fotoperíodo de 12 horas/luz e utilizou-se as temperaturas de 20, 25 e 30°C, que foram monitoradas com termohigrógrafo devidamente calibrado para registro e certificação de que as temperaturas requeridas mantinham-se constantes durante o período necessário.

Fez-se a inoculação da suspensão bacteriana utilizando borrifadores manuais, distribuindo homogeneamente a suspensão de inóculo por toda superfície foliar, até o início do escorrimento das folhas. Após a inoculação, as plantas foram mantidas individualmente em câmara úmida por 48 horas com o auxílio de sacos de plástico umedecidos, no intuito de induzir a abertura estomatal e facilitar a penetração da bactéria. O período de câmara úmida foi realizado já dentro da câmara de crescimento com as respectivas temperaturas de teste. Plantas inoculadas com os respectivos isolados eram também mantidas em casa de vegetação para observação de sintomas, garantindo que uma possível ausência de sintomas seria resultado do efeito da temperatura e não do próprio isolado.

As plantas foram observadas diariamente para registro do aparecimento dos primeiros sintomas, o que caracteriza o período de incubação da espécie bacteriana. Foi considerado como período de incubação o intervalo, em dias, entre a inoculação e o aparecimento de sintomas em pelo menos uma das três plantas que compunham a parcela.

Dez dias após a inoculação, coletou-se nove folíolos de cada tratamento, sendo três de cada planta, anexando-as com auxílio de fita dupla face em folha branca com régua milimetrada (Figura 1.1 A). As imagens dos folíolos foram digitalizadas utilizando um “scanner”, para posterior quantificação de porcentagem de área foliar lesionada utilizando o programa QUANT (Vale et al., 2001) – software para quantificação de doenças de plantas V. 1.0 – UFV, que diferencia área lesionada de área sadia por distinção de cores (Figura 1.1 B, C). Considerou-se como sintomas da doença a presença de manchas características e tecido necrótico, não sendo consideradas as áreas cloróticas.

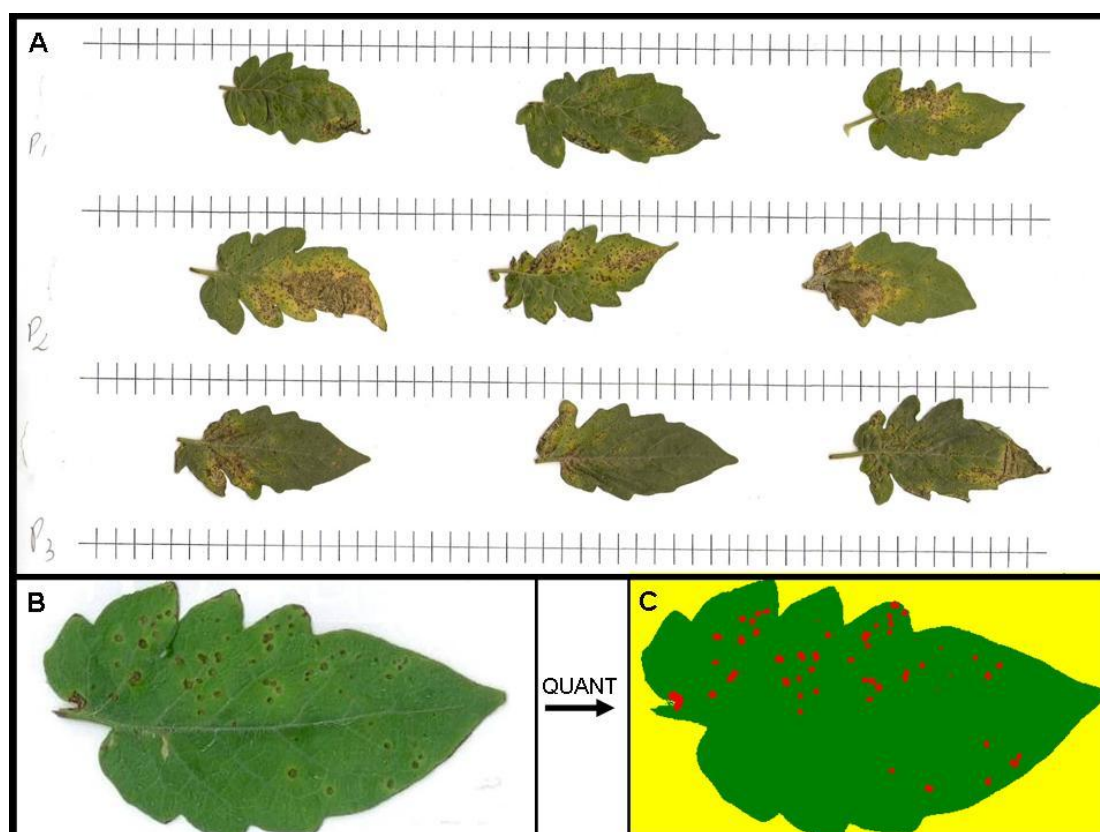


Figura 1.1: Metodologia empregada para utilização do programa QUANT. A – Folíolos anexados e digitalizados em folha branca milimetrada. B, C – Distinção entre regiões sintomáticas e sadias a partir de distinções de cores.

Como para este experimento, dispunha-se de apenas uma câmara com temperatura controlada, o que limitou a avaliação de todas as temperaturas em um mesmo período, foram feitas duas análises preliminares com o objetivo de avaliar se o fato de cada temperatura (tratamento do nível A) ter sido implementado em um evento distinto de produção de plantas, produção de inóculo e inoculação, afetaria de modo significativo a interpretação dos resultados. A primeira análise foi feita confundindo-se blocos com temperatura e a segunda, considerando-se cada temperatura como um ensaio independente. Em ambas, o efeito de bloco (igual à temperatura na primeira análise e correspondendo à repetição na segunda análise) não foi significativo. Desse modo, optou-se pela análise segundo o modelo fatorial-aninhado (hierárquico) (Montgomery, 2001), sendo um experimento fatorial em parcelas subdivididas com fator A= temperatura e B = espécies, com isolados aninhados dentro da espécie (Figura 1.2).

Cálculos estatísticos foram realizados com o programa SAS (SAS Institute, 2002) e as médias comparadas pelo teste Fisher-LSD.

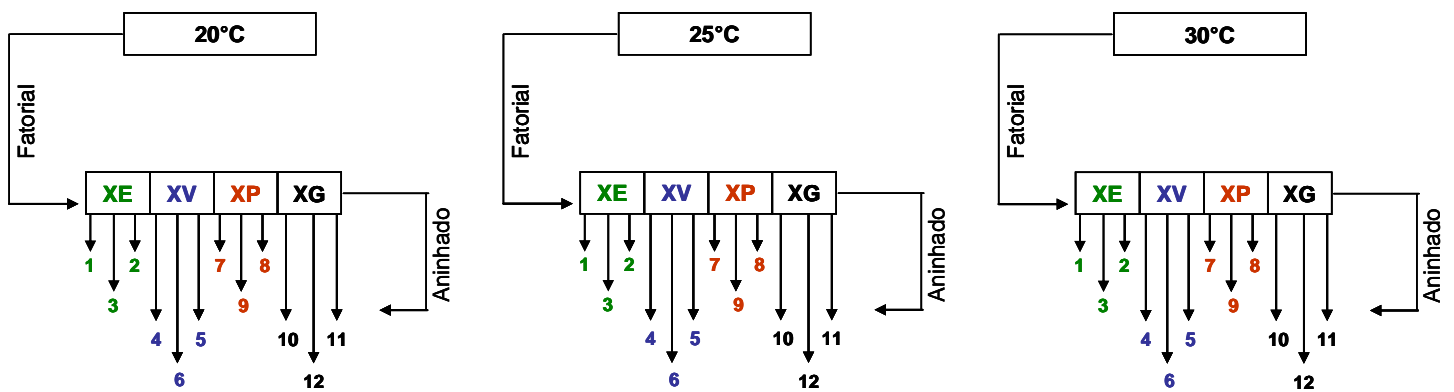


Figura 1.2: Esquema do experimento ilustrando a relação fatorial entre temperatura e espécies e de aninhamento de isolados, representados pelos respectivos números, dentro da espécie.

Competição entre *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*

O experimento foi conduzido em casa de vegetação entre os meses de agosto a outubro de 2009, com temperatura média de 28,7°C no interior da casa, registrada por termohigrógrafo devidamente calibrado. Isolados de *X. perforans* (XP) e de *X. gardneri* (XG) foram inoculados individualmente e em combinação de ambas as espécies (Tabela 1.2). Após ajuste da concentração da suspensão bacteriana para aproximadamente 5×10^8 UFC/mL, misturou-se em um mesmo recipiente, volumes equivalentes de inóculo de um isolado de XP e um isolado de XG com as mesmas concentrações, de modo que a concentração final da combinação foi a mesma das inoculações individuais. A inoculação procedeu-se da mesma maneira que a anterior no que diz respeito ao uso de borrifador e câmara úmida. Doze dias após a inoculação, retirou-se dez folíolos de cada parcela útil composta por cinco plantas para posterior quantificação de sintomas utilizando o programa QUANT. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com isolados aninhados dentro da espécie, tendo 12 tratamentos e duas repetições.

Tabela 1.2: Relação dos isolados de *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri* inoculados individualmente ou em combinação em plantas de tomate suscetível.

<i>Isolados</i>	<i>Combinações</i>
XP1998-436	
XP2006-44	XP2006-44 + XG2006-21
XP2008-13	
XP2008-16	XP2008-13 + XG2007-41
XG2006-17	
XG2006-21	XP2008-16 + XG2006-52
XG2006-52	
XG2007-41	XP1998-436 + XG2006-17

Recuperação das espécies de *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*

Isolados obtidos das combinações das inoculações conjuntas entre isolados das espécies XP e XG foram recuperados a partir das lesões foliares em meio NA com amido (1%), pois este permite uma diferenciação preliminar das espécies, uma vez que XP é amidolítica positiva e XG negativa. Duas amostras compostas com três folíolos sintomáticos foram retiradas das plantas que compunham a parcela, para a recuperação das espécies originalmente inoculadas. Para o isolamento foi retirada uma seção de tecido foliar com 8 mm de diâmetro na intersecção entre as áreas sadias e lesionadas. A assepsia foi feita em câmara de fluxo laminar, com submersão por dez segundos em álcool etílico 70%, trinta segundos em água sanitária 10% e tríplice lavagem com solução de sulfato de magnésio 10mMol/L para retirar o excesso de álcool e de água sanitária. Após este procedimento, macerou-se os pedaços com auxílio de um bastão de vidro devidamente flambado e resfriado.

Após a obtenção do macerado, fez-se diluição seriada até 10^{-5} da concentração inicial, que foi a concentração onde a contagem de colônias foi possível. Uma alíquota de 100 μ l desta concentração foi depositada, com auxílio de uma micropipeta nas placas com NA + amido e espalhada em toda a placa com alça de Drigalsky. Após 48 horas de incubação a 28°C, contou-se as colônias que eram amidolíticas positivas ou negativas. Adicionou-se uma solução de iodo ao meio para facilitar a visualização dos halos (Figura 1.8). Foram feitas quatro repetições, sendo duas para cada amostra composta da combinação de isolados.

Confirmação das espécies

Foram selecionadas dez colônias individuais amidolíticas positivas ou negativas para repicagem em meio NA, com auxílio de uma alça de platina devidamente flambada e resfriada, das diferentes combinações, para realização de extração de DNA segundo protocolo proposto por Wilson (1999). Os perfis gerados com a técnica de BOX-PCR por estas colônias foram comparados com aqueles gerados pelos isolados de referência IBSBF 2370 de XP e IBSBF 2373 de XG.

Produção de Bacteriocinas

Para verificação de produção de bacteriocinas adotou-se a metodologia da sobrecamada (Mayr-Harting et al., 1972). Riscou-se os isolados (possíveis produtores de bacteriocina) do tampão fosfato em meio de cultura NA. Após a obtenção de colônias puras do isolado, fez-se a repicagem em meio NA para posterior aplicação ao meio de uma massa bacteriana em pontos circulares com auxílio de alça de platina no mesmo tipo de meio. As placas foram então incubadas por 48 horas em câmara de crescimento (BOD) a 28°C. Após esse período, antes da deposição da sobrecamada, as colônias bacterianas já crescidas foram inativadas expondo-se as placas abertas à radiação UV por 40 minutos. Os isolados (possíveis indicadores de bacteriocina) foram cultivados em meio caldo nutriente em agitador magnético por 16 horas. Uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana foi adicionada a 5 ml de meio semi-sólido de NA (ágar 0,5%) e uma sobrecamada desse meio acrescido da suspensão foi depositada nas

placas onde isolados desafiantes (candidatos a produtores de bacteriocina) já haviam crescido. As bactérias foram incubadas por 3 dias a 28°C.

Como controle de que a metodologia estava sendo executada de forma correta, utilizou-se a combinação dos isolados de referência IBSBF 2370 de *X. perforans*, como desafiante, e IBSBF 2363 de *X. euvesicatoria*, como desafiado, já que a produção de bacteriocina do primeiro com ação sobre o segundo isolado foi relatada por Jones et al. (1998). A produção de bacteriocina foi identificada pela formação de halos de inibição.

Resultados & Discussão

Efeito da temperatura na severidade e período de incubação

Foram significativos o efeito de espécie e interação temperatura \times espécie para a severidade da doença (Tabela 1.3). As demais análises preliminares encontram-se no anexo I. De maneira global, as espécies XP e XV apresentaram, em média, maiores severidades em relação à XG e XE. Este efeito, entretanto, está dependente da temperatura uma vez que a interação temperatura \times espécie foi significativa.

Tabela 1.3: Análise de variância do modelo fatorial-aninhado (hierárquico) utilizado para análise estatística do experimento que avalia o efeito da temperatura sobre a severidade da doença.

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F tabelado	F calculado
Repetição	1	2,4017014	2,4017014	0,55	0,4651
Temperatura	2	69,4885683	34,7442842	4,55	0,1803
Rep*Temp	2	15,2817137	7,6408568	1,74	0,1917
Espécie	3	286,8296190	95,6098730	21,74	< ,0001
Temp*Esp	6	334,7723334	55,7953889	12,69	< ,0001
Isol(Esp)	8	72,1878816	9,0234852	2,05	0,0704
Temp*Isol(Esp)	16	255,0777830	15,9423614	3,63	0,0009
Erro	33	145,112914	4,397361		
Total	71	1181,152514			

Rep*Temp = interação entre repetição e temperatura.

Temp*Esp = interação entre temperatura e espécie.

Isol(Esp) = interação de isolados aninhados dentro da espécie.

Temp*Isol(Esp) = interação entre temperatura, espécie e isolados aninhados dentro da espécie.

No desdobramento da interação espécie por temperatura, pôde-se observar que na menor temperatura (20°C), a espécie *X. gardneri* apresentou diferença das demais, no que diz respeito à severidade, uma vez que sua porcentagem de área foliar lesionada foi maior. Quando as quatro espécies foram submetidas à temperatura de 25°C,

observou-se um grau de severidade que não foi significativamente diferente entre elas, à exceção de *X. euvesicatoria*, que apresentou severidade inferior às demais espécies em todas as temperaturas avaliadas, indicando assim, uma desvantagem competitiva natural desta espécie, como já observado por Jones et al. (1998). A espécie *X. vesicatoria* apresentou um comportamento constante, quanto à capacidade de ocasionar doença nas três temperaturas avaliadas. Quando as espécies foram submetidas à temperatura mais elevada do ensaio, 30°C, *Xanthomonas perforans* destacou-se como a espécie mais agressiva, enquanto *X. gardneri* apresentou seus menores índices de severidade (Figura 1.3). Isto é, para a menor temperatura, *X. gardneri* apresentou-se significativamente mais agressiva que *X. perforans*, já para a maior temperatura, *X. perforans* foi quem se destacou como a espécie de maior agressividade. Este resultado indica que a temperatura exerce papel importante na determinação de qual espécie será prevalecente numa determinada região, principalmente em se tratando de XP e XG, uma vez que cada uma destas espécies mostra-se mais adaptada a uma faixa térmica.

As temperaturas médias anuais no Cerrado variam de 18 a 28 °C, e a precipitação pluviométrica oscila entre 800 e 2000 mm com uma forte estação seca de variada amplitude durante o inverno (Dias, 1996). Como a maior parte da produção de tomate do país se encontra nesse bioma, é possível que essa amplitude térmica permita a presença de mais de uma espécie de *Xanthomonas* causadora da mancha bacteriana numa determinada área de produção.

Marcuzzo et al. (2009), quando observaram em condições de câmara climatizada, a influência da temperatura e do molhamento foliar na severidade da mancha bacteriana do tomateiro incitada por *Xanthomonas* spp., perceberam que a doença era mais severa na temperatura de 25°C e que existia um decréscimo da doença quando a temperatura aumentava a 30°C para um período contínuo de molhamento

foliar. Como os autores trataram os agentes causais da doença como um grupo único e utilizaram apenas um isolado, estes resultados podem ter sido gerados como resposta de uma determinada espécie. Como aqui relatado, este decréscimo na quantidade de doença pode ser observado para *X. gardneri*.

A temperatura pode influenciar diretamente a severidade da doença neste patossistema, assim como foi observado por Nayudu & Walker (1960), que constataram uma redução de 25% no desenvolvimento da doença quando a temperatura passou de 24°C para 28°C. Provavelmente, esta resposta de decréscimo da severidade relacionada ao aumento de temperatura, não esteja relacionada com a espécie *X. perforans*, uma vez que os autores trataram o patógeno como um grupo mais homogêneo. Nos resultados aqui apresentados, *X. perforans* é favorecida com o aumento da temperatura.

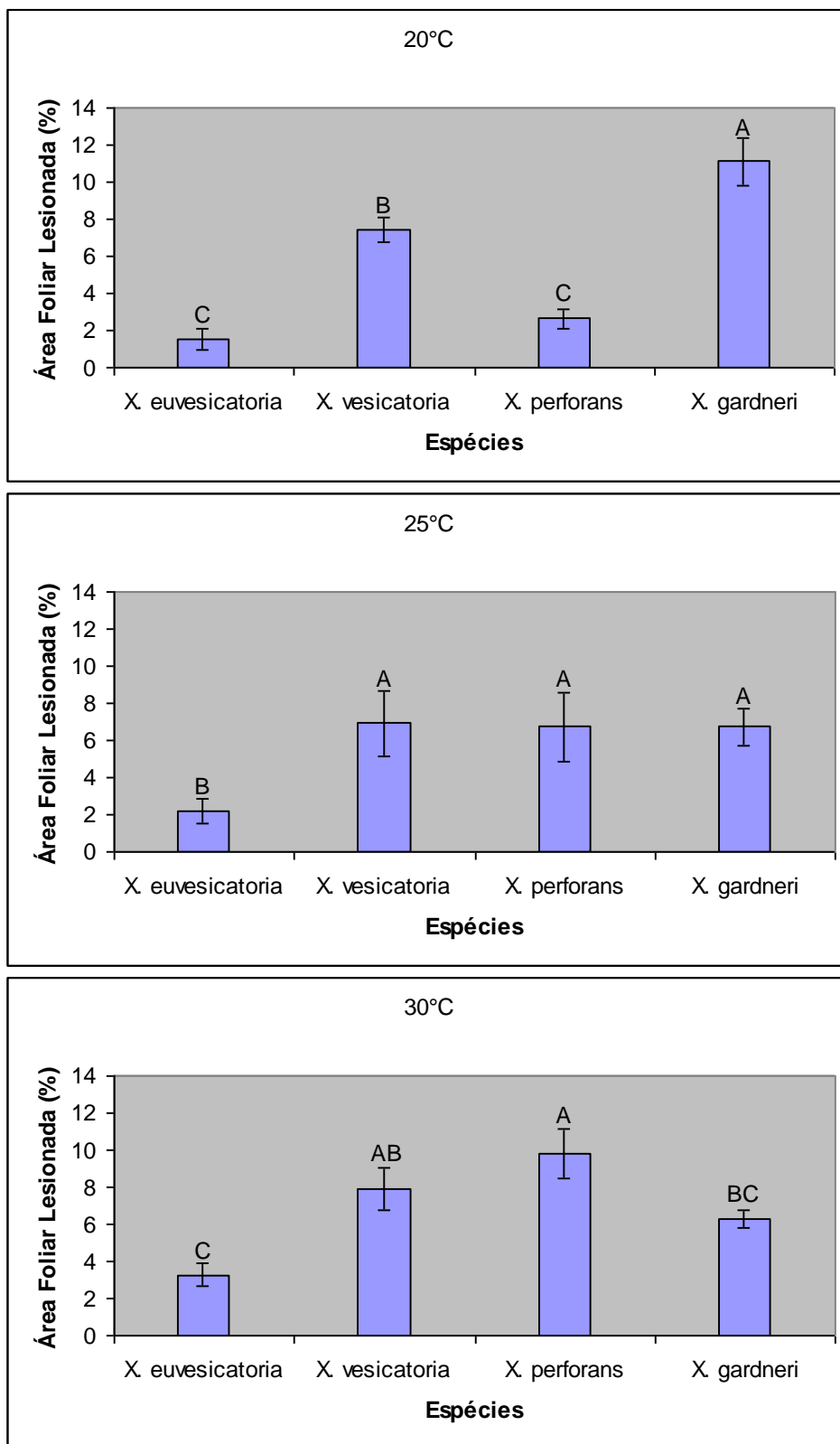


Figura 1.3: Percentual de área foliar lesionada em plantas de tomate, 10 dias após a inoculação com diferentes espécies de *Xanthomonas* e mantidas em diferentes temperaturas. Barras que apresentam a mesma letra não diferem significativamente (LSD, $p \leq 0,05$).

No desdobramento de temperatura por espécie, *Xanthomonas euvesicatoria* teve comportamento constante. Observou-se que XP e XG, ambos com $P \ll .0001$, apresentaram diferenças de severidade entre as temperaturas, enquanto XE ($P = 0,3131$) e XV ($P = 0,098$) não apresentaram este comportamento (Figura 1.4). De modo geral, os efeitos da temperatura são mais evidentes para as espécies de *X. perforans* e *X. gardneri*.

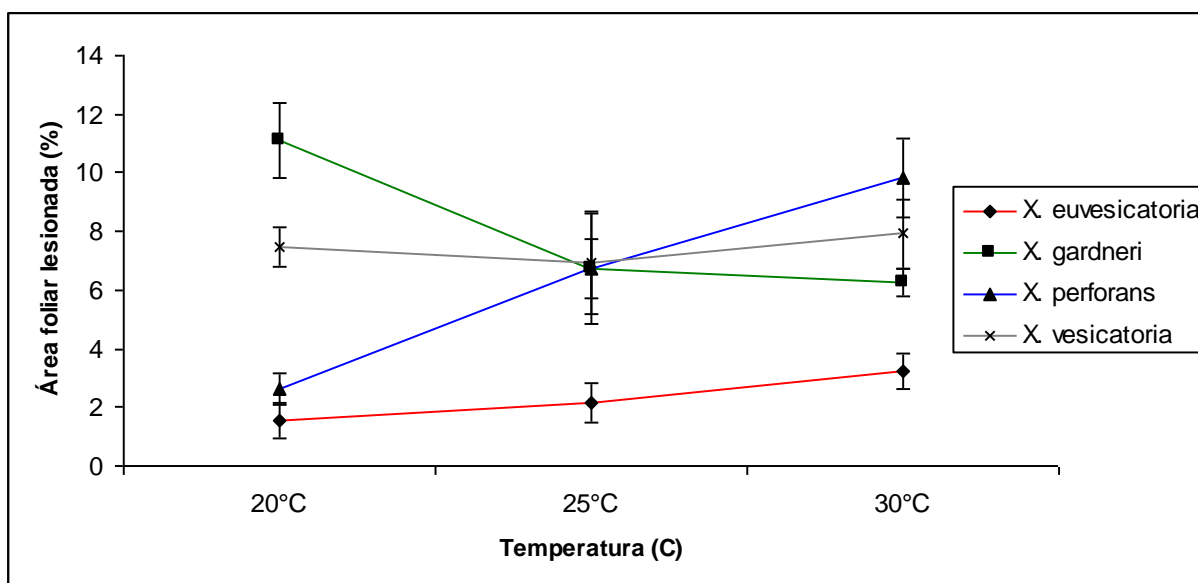


Figura 1.4: Resposta das diferentes espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro a três diferentes temperaturas sob condições controladas.

Folhas de gerânio (*Pelargonium hortorum*) inoculadas com *Pseudomonas cichorii* e submetidas a diferentes temperaturas apresentaram número e tamanho de lesões crescentes a partir da temperatura de 16°C até aos 28 °C. Porém, em temperaturas superiores a 28°C, as lesões reduziram-se significativamente, indicando que a resposta de doenças bacterianas apresenta um ponto ótimo de temperatura e que desvios deste ponto, tanto para mais ou menos, reduzem a intensidade do processo da doença. É evidente que outros fatores abióticos como a umidade, podem interferir diretamente nesta interação (Jones et al., 1984).

Segundo Robinson (2006), a temperatura é fundamental no processo de infecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, tanto para sua hospedeira principal, como para possíveis hospedeiras alternativas, induzindo sintomas sob determinadas condições nestes hospedeiros.

O período de incubação também foi variável de acordo com a temperatura (Tabela 1.4). De forma geral, houve um retardamento do aparecimento dos sintomas quando da exposição à menor temperatura (20°C), bem como da maior (30°C), quando comparadas com a temperatura de maior severidade da doença, ou seja, 25°C.

O crestamento bacteriano (morte das flores) da pêra, causado por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* se manifesta tipicamente a baixas temperaturas e pode apresentar taxas de infecção e períodos de incubação variáveis de acordo com a temperatura e concentração de inóculo utilizados. O período de incubação pode ser prolongado em condições térmicas que reduzam as taxas de infecção da doença (Latorre, et al., 2002).

Tabela 1.4: Período de incubação de isolados de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro em diferentes temperaturas.

Isolado	Espécie	Período de Incubação (número de dias)		
		20°C	25°C	30°C
EH 411T	<i>X. euvesicatoria</i>	-	7	-
UENF 4135	<i>X. euvesicatoria</i>	-	7	-
EH 1995-109	<i>X. euvesicatoria</i>	8	5	8
EH 1990-154	<i>X. vesicatoria</i>	8	5	8
EH 1995-95	<i>X. vesicatoria</i>	8	7	7
EH 89T	<i>X. vesicatoria</i>	8	7	7
EH 2006-44	<i>X. perforans</i>	-	6	7
EH 2008-13	<i>X. perforans</i>	8	5	7
EH 2008-16	<i>X. perforans</i>	8	5	7
EH 2006-17	<i>X. gardneri</i>	6	5	7
EH 2006-21	<i>X. gardneri</i>	6	6	8
EH 2006-52	<i>X. gardneri</i>	6	6	8

- = Ausência de sintomas durante os 10 dias avaliados após a inoculação.

Para todas as espécies, o período de incubação variou de 5 a 8 dias de acordo com a temperatura, onde os menores períodos foram registrados com a temperatura de 25°C e o maior período com as temperaturas que se encontravam abaixo ou acima do ótimo para o desenvolvimento da doença. Indicando uma relação direta entre temperatura de desenvolvimento ideal da doença e redução do período de incubação.

Para a temperatura de 20°C, *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria* e *X. perforans* apresentaram um período de incubação médio de 8 dias, de acordo com os isolados que demonstraram sintomas na avaliação, enquanto *X. gardneri* apresentou média de seis dias para a mesma variável. Já para 30°C, *Xanthomonas gardneri* teve seu período de incubação elevado para o valor médio de 7,7 dias, enquanto *X. perforans* reduziu para 7 dias o valor do mesmo parâmetro. *Xanthomonas euvesicatoria* manteve o mesmo valor e *X. vesicatoria* apresentou redução para 7,3 dias.

Diferenças no período de incubação refletem diferenças na taxa de crescimento do patógeno no hospedeiro, e, conseqüentemente, na taxa de progresso da epidemia, sendo um importante componente monocíclico (Parlevliet, 1979; Vanderplank, 1963). Entretanto, o período de incubação pode sofrer influências de outros fatores além da temperatura, tais como umidade do ar, idade da planta e concentração de inóculo do patógeno (Kong et al., 1997).

Pria et al. (2006) constataram que a temperatura pode ter ação inibitória no desenvolvimento do cancro cítrico. Temperaturas iguais ou superiores a 42°C inibiram o desenvolvimento da doença. As variações de temperatura interferiram diretamente também no período de incubação da doença.

Competição entre *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*

Nas quantificações de sintomas feitas entre isolados de *X. perforans* (XP) e *X. gardneri* (XG) em casa de vegetação, pode-se perceber que, nestas condições, não existiram diferenças significativas entre as duas espécies, à exceção do isolado de XP 2008-16, que foi mais agressivo que o isolado de XG 2006-17. Porém, quando se observou as inoculações conjuntas correspondentes às combinações de seus respectivos isolados, em nenhuma delas a combinação apresentou diferença significativa comparativamente ao seu respectivo isolado de XP (Figura 1.5).

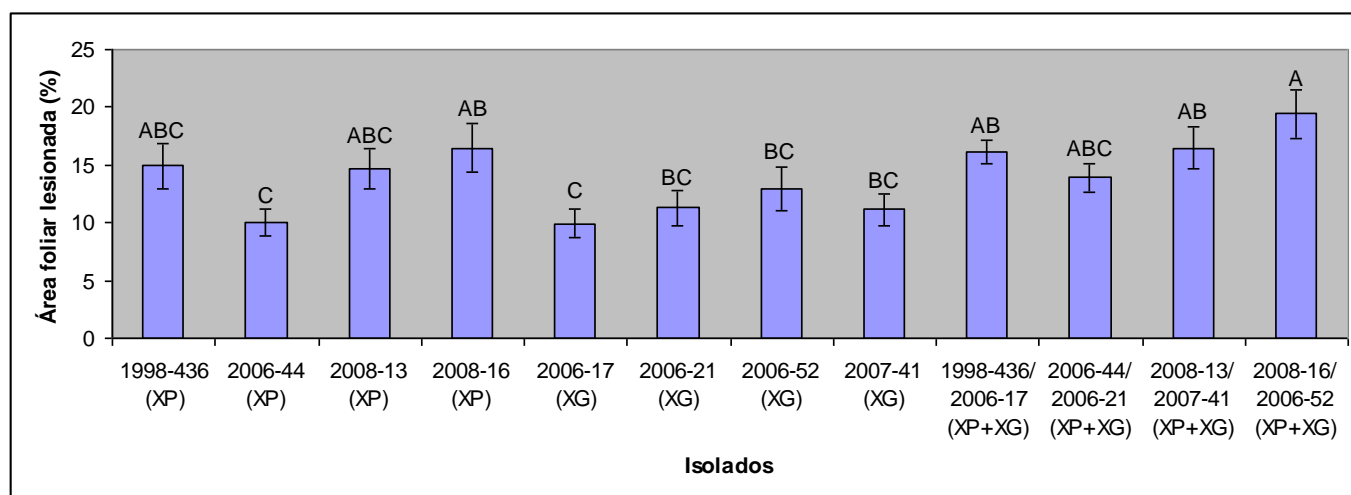


Figura 1.5: Percentual de área foliar lesionada em plantas de tomate, 12 dias após a inoculação com isolados de *Xanthomonas perforans*, *X. gardneri* e combinação de ambas em casa de vegetação, com temperatura média de 28,7°C durante o período do ensaio. Barras que apresentam a mesma letra não diferem significativamente (LSD, $p \leq 0,05$). XP = *Xanthomonas perforans*. XG = *Xanthomonas gardneri*. XP+XG = combinação de um isolado de *X. perforans* e um isolado de *X. gardneri*.

A inoculação conjunta dos isolados não demonstrou evidências de efeitos aditivos ou sinérgicos entre as espécies. Um incremento na quantidade de sintomas não foi observado quando comparado às inoculações de isolados individuais de XP. Estes resultados sugerem que as espécies XP e XG possuem nichos ecológicos sobrepostos e

que a competição entre elas pode decorrer da necessidade de ambas por um mesmo substrato finito, como sítios de infecção, portas de entrada, entre outros.

Jones et al. (1995) verificaram que *X. perforans* apresentava uma característica típica de sintoma nas lesões foliares, que era a perfuração no local destas lesões. Algumas plantas que foram inoculadas com as combinações dos isolados, apresentaram estes sintomas típicos nos locais das lesões foliares (Figura 1.6).

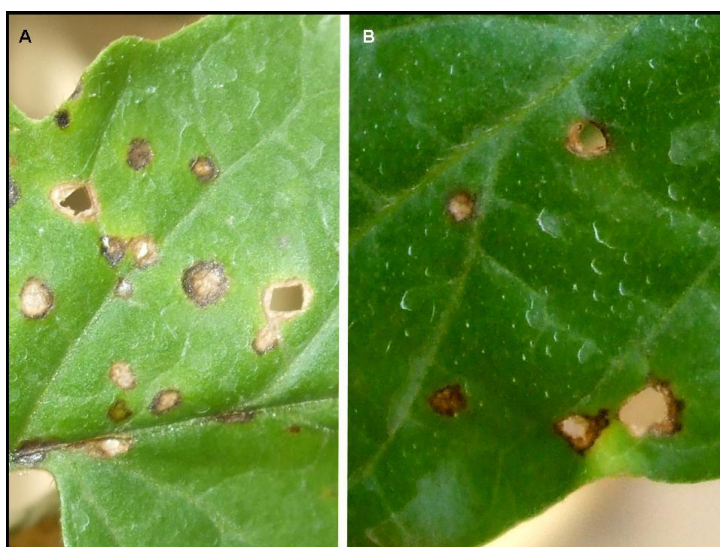


Figura 1.6: Lesões foliares com perfurações características de *Xanthomonas perforans*. **A** – Sintomas apresentados a partir da inoculação com a combinação XP2006-44+XG2006-21. **B** – Sintomas apresentados a partir da inoculação com a combinação XP2007-26+XG2006-21. XP: *X. perforans*; XG: *X. gardneri*

Inoculações conjuntas de isolados de XP e XE em plantas de tomates suscetíveis demonstraram uma vantagem competitiva exercida por XP, uma vez que, quando as duas espécies eram inoculadas conjuntamente em uma variedade suscetível a XE e resistente a XP, a quantidade de lesões e a população de XE eram reduzidas significativamente comparadas à inoculação de apenas XE na mesma variedade. Desta forma, XP caracterizou-se como antagonista a XE (Jones et al., 1998).

Recuperação das espécies de *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*

Em três das seis combinações de inoculações conjuntas de XP e XG, não se encontrou colônias bacterianas de *X. gardneri*, isto é, não foi observada nenhuma colônia que não degradava amido. Já nas demais combinações, onde foram observadas colônias amidolíticas positivas (*X. perforans*) e amidolíticas negativas (*X. gardneri*), percebeu-se uma diferença significativa entre o número de colônias entre as espécies (Figura 1.7), onde *X. perforans* sempre aparece em quantidades significativamente superiores.

Estes resultados sugerem a existência de uma vantagem competitiva de *X. perforans* em relação a *X. gardneri* *in planta*.

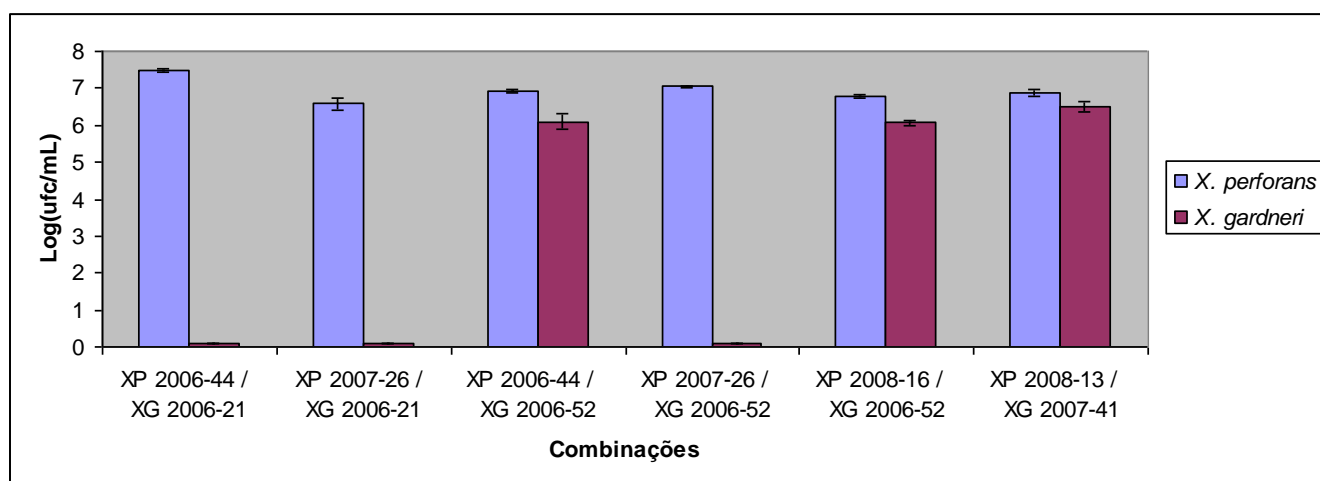


Figura 1.7: Recuperação de isolados de *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri* em meio NA+amido(1%) a partir de lesões foliares de plantas de tomate inoculadas com ambas as espécies e mantidas em casa de vegetação, com temperatura média de 28,7°C durante o período do ensaio.

Uma variedade de fatores ecológicos pode determinar padrões de diversidade de um determinado táxon. Entre os principais, pode-se considerar: oportunidade ecológica (espaço de nicho vago) e a competitividade. De forma mais simples, para que uma única espécie possa entrar em um ambiente primitivo faz-se necessário a existência de nichos

desocupados. A competitividade entre espécies funciona como um motor de divergência, auxiliando no próprio processo evolutivo e seletivo de cada indivíduo. Apesar do pequeno tamanho das bactérias, as populações bacterianas estão sujeitas às mesmas forças de evolução as quais os organismos superiores são submetidos, conforme discutido por Spiers et al. (2000) para o gênero *Pseudomonas*.

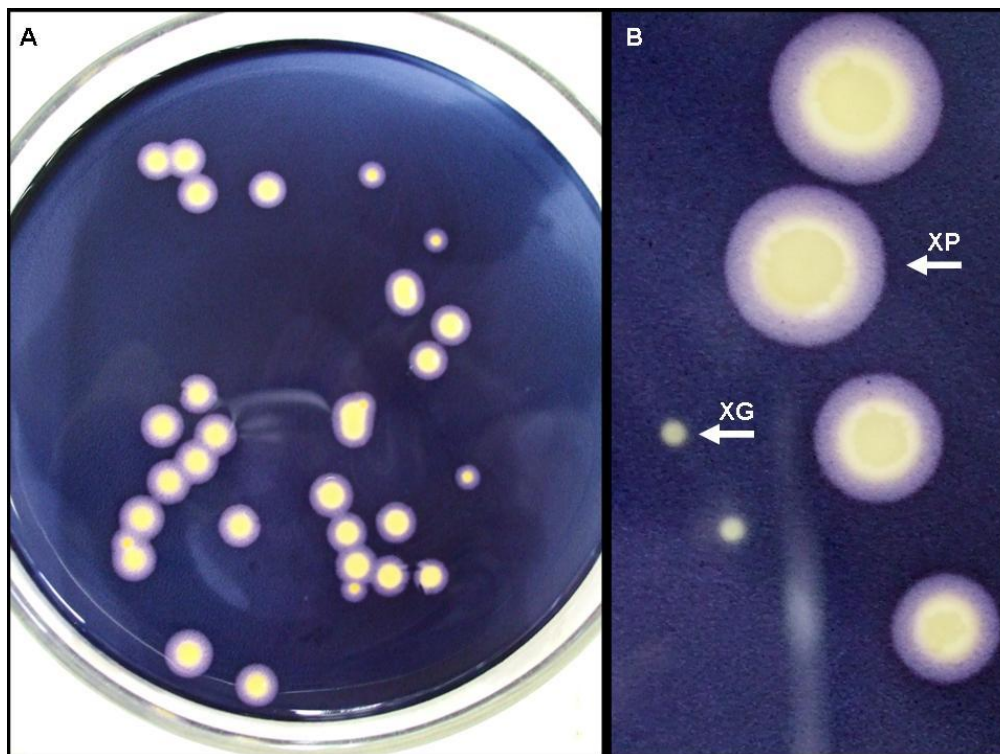


Figura 1.8: Colônias de *Xanthomonas* isoladas em meio NA + amido(1%). A – Colônias de *X. perforans* formando halos da combinação 2006-44+2006-21. B – Detalhe de colônias amidolíticas positivas e negativas, respectivamente *X. perforans* e *X. gardneri* da combinação 2008-16+2006-52.

Os resultados aqui relatados ampliam as conclusões dos testes *in vitro* e *in vivo* de Jones et al. (1998), que já sugeriram uma possível vantagem competitiva de *X. perforans* sobre *X. euvesicatoria*, o que auxiliaria na explicação para o surgimento e predominância dessa espécie nos campos de produção de tomate da Flórida. No

presente trabalho, observa-se a vantagem competitiva de *X. perforans* sobre *X. gardneri*, que pode estar relacionada com a temperatura média elevada na casa de vegetação durante o período do experimento, ou até mesmo, à metodologia padrão de incubação de bactérias em meio de cultura, que no caso, foi de 28°C em câmara de crescimento. A prevalência de *Xanthomonas perforans* em campos de produção de tomate destinados ao processamento também já foi observada em levantamento realizado pela ESALQ e CNPH nos anos de 2002 e 2003 (Quezado-Duval, 2005), o que sugere que esta espécie possa vir a ser a prevalente entre as espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Brasil. É evidente que para a confirmação desta hipótese faz-se necessário um amplo levantamento e caracterização dos campos brasileiros de tomate atualmente existentes.

Confirmação das espécies

As colônias que degradavam amido apresentaram perfil genômico gerado pela técnica de BOX-PCR similar ao isolado IBSBF 2370, que é um isolado de referência da espécie *X. perforans*. Já as colônias que não degradavam o amido apresentaram perfil genômico similar ao isolado IBSBF 2373, que é um isolado tipo da espécie *X. gardneri* (Figura 1.9). Esta similaridade confirma a identidade das colônias recuperadas em meio de cultura, bem como a recuperação das espécies inicialmente inoculadas, e descarta a possibilidade de interferência de contaminantes na avaliação dos resultados.

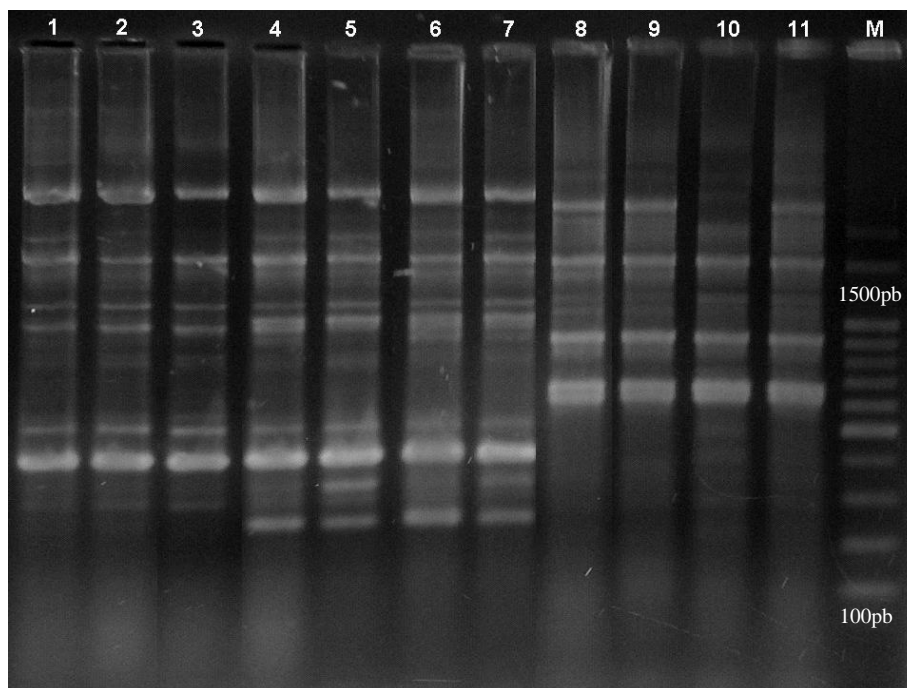


Figura 1.9: Perfil BOX-PCR dos isolados. 1 – IBSBF 2370 de referência de *X. perforans*. 2 – *X. perforans* da combinação XP2006-44+2006-21. 3 – *X. perforans* da combinação XP2006-44+XG2006-52. 4 – *X. perforans* da combinação XP2007-26+XG2006-21. 5 – *X. perforans* da combinação XP2007-26+XG2006-52. 6 – *X. perforans* da combinação XP2008-16+XG2006-52. 7 – *X. perforans* da combinação XP2008-13+XG2007-41. 8 – *X. gardneri* da combinação XP2006-44+XG2006-52. 9 – *X. gardneri* da combinação XP2008-16+XG2006-52. 10 – *X. gardneri* da combinação XP2008-13+XG2007-41. 11 – IBSBF 2373 de referência de *X. gardneri*. M – 100pb DNA Ladder.

Produção de Bacteriocinas

A observação de halos de inibição em meio NA indicou que, dos isolados brasileiros de *X. perforans* testados, apenas o XP2008-13 produziu bacteriocina (Tabela 1.5). Os isolados 518T; 529T e UENF 4135, todos representantes de *X. euvesicatoria*, apresentaram-se como tipos indicadores de bacteriocinas, uma vez que apresentaram inibição de seu crescimento tanto na presença do isolado 2008-13, como do isolado testemunha IBSBF 2370 (Figura 1.10). Este é o primeiro relato de isolados de *X. euvesicatoria* brasileiros atuando como indicadores de bacteriocina, bem como a

primeira observação de um isolado nacional do grupo *Xanthomonas vesicatoria* atuando como produtor de bacteriocina.

Para confirmação que o efeito inibitório era devido à produção de bacteriocinas, todos os isolados foram testados contra eles mesmos ou contra isolados da mesma espécie. Não sendo apresentado nenhum efeito nestes casos, confirmou-se a afirmação de produção de bacteriocinas por parte dos isolados assim avaliados (Riley & Wertz, 2002).

Isolados de *Xanthomonas perforans* mutantes podem apresentar redução na agressividade da espécie e ainda assim produzir bacteriocinas com efeito inibitório para *X. euvesicatoria*, indicando uma possibilidade de utilização num manejo integrado da doença, mais especificamente, no controle biológico (Hert et al., 2009).

A atividade da glicinecina A, bacteriocina produzida por *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, apresentou ação sobre *X. campestris* pv. *vesicatoria*, efeito este que provavelmente está relacionado à alteração da permeabilidade da membrana plasmática da bactéria, local de ação deste tipo de bacteriocina (Pham et al., 2004).

Tabela 1.5: Isolados de *Xanthomonas perforans*, *X. gardneri* e *X. euvesicatoria* avaliados quanto à produção de bacteriocinas.

Isolado	Espécie	Resposta à produção de bacteriocina												
		2006-44	2007-26	2008-13	2008-16	2370	2006-17	2006-21	2006-52	2007-41	529T	UENF 4135	518T	2363
2006-44	<i>X. perforans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2007-26	<i>X. perforans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2008-13	<i>X. perforans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2008-16	<i>X. perforans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2370	<i>X. perforans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2006-17	<i>X. gardneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2006-21	<i>X. gardneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2006-52	<i>X. gardneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2007-41	<i>X. gardneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
529T	<i>X. euvesicatoria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UENF4135	<i>X. euvesicatoria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
518T	<i>X. euvesicatoria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2363	<i>X. euvesicatoria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- = ausência de halo de inibição

+ = presença de halo de inibição

Na Flórida, onde a espécie *X. perforans* tem se mostrado predominante entre as espécies de causadoras da mancha bacteriana do tomateiro, pode-se observar que isolados de *X. perforans* tiveram efeito inibitório *in vitro* sobre isolados de *X. euvesicatoria*, formando halos de inibição que variavam de menos de 5 mm a mais de 10 mm. Em contrapartida, nenhum dos isolados de *X. euvesicatoria* da Flórida exibiram efeito inibitório sobre *X. perforans* (Jones et al., 1998). A produção de bacteriocinas também foi observada por Tudor - Nelson et al. (2003), quando isolados representantes da raça T3(XP) apresentaram efeito inibitório sobre todos os isolados testados da raça T1(XE), sendo este efeito variável para representantes da raça T2.

Avaliando os efeitos promovidos pelos componentes dos meios de cultura na produção de nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, Li et al. (2002) observaram que o meio de cultura que não era tão vantajoso para o crescimento celular, era o que produzia uma alta concentração de nisina, demonstrando que as condições ótimas para o crescimento celular podem não serem as mesmas para a produção de bacteriocinas, o que pode estar relacionado com a ausência de efeito inibitório entre *X. perforans* e *X. gardneri*.

Isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foram testados quanto à produção e ação de bacteriocinas sobre cepas de outras espécies de *Xanthomonas*, incluindo *X. vesicatoria*, porém não houve efeito inibitório sobre os isolados de *X. vesicatoria* testados, bem como os isolados de *X. vesicatoria* não tiveram ação de inibição sobre as cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Bonini et al., 2007).

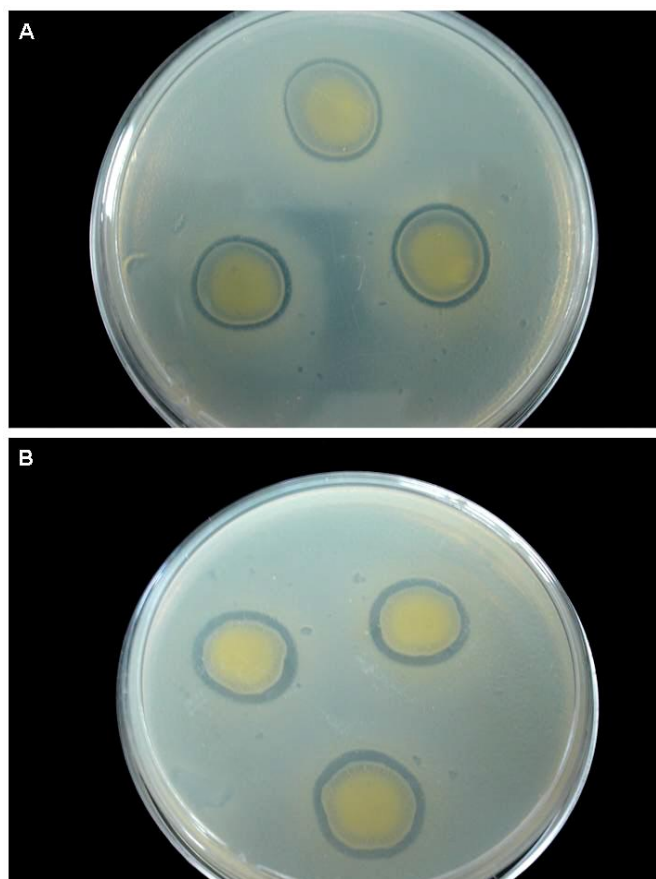


Figura 1.10: Halos de inibição produzidos por isolados de *Xanthomonas perforans*. A – Halo produzido pelo isolado 2008-13 de *X. perforans*, ocasionando inibição no isolado 529T de *X. euvesicatoria*. B – Halo produzido pelo isolado IBSBF 2370 de *X. perforans*, ocasionando inibição no isolado 529T de *X. euvesicatoria*.

Xanthomonas perforans desenvolve-se melhor em maiores temperaturas, enquanto *X. gardneri* é favorecida por menores temperaturas. Esta melhor adaptabilidade a diferentes temperaturas influencia diretamente o período de incubação de cada espécie. Sob condições controladas, em casa de vegetação, isolados de *X. perforans* foram mais competitivos que isolados de *X. gardneri*. A utilização de meio NA acrescido de amido é uma ferramenta útil para diferenciação entre *X. perforans* e *X. gardneri* no processo de recuperação destas espécies. Isolados brasileiros de *Xanthomonas* que causam a mancha bacteriana do tomateiro podem atuar como produtores ou indicadores de bacteriocinas.

Referências Bibliográficas

ANDRIVON, D. Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology* 83:889-890. 1993.

BARRETO, M.; SCALOPPI, E.A.G. Sistema de Previsão de Doenças de Hortaliças. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). Manejo integrado – doenças, pragas e plantas daninhas. Viçosa:UFV. p.169-189. 2000.

BIAGI, C.M.R.; & AZEVEDO, J.L. Detecção de bacteriocinas produzidas por bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. *Scientia Agrícola* 49:1-8. 1992.

BONINI, M.; MARINGONI, A.C. & RODRIGUES NETO, J. Characterization of *Xanthomonas* spp. strains by bacteriocins. *Summa Phytopathologica* 33:24-29. 2007.

BOTTONE, E.; ALLERHAND, J.; PISANO, M.A. Characteristics of a bacteriocin derived from *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes* antagonistic to *Diplococcus pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology* 22:200-204. 1971.

CARDOSO, E.J.B.N. Relações ecológicas entre microrganismos. In: GALLI, F (Ed.) Manual de Fitopatologia , v. 1.. São Paulo, SP, Editora Agronômica Ceres. p. 373. 1978.

COLHOUN, J. Effects of environmental factors on plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 11:343-364. 1973.

COX, R.S. The role of bacterial spot in tomato production in south Florida. *Plant Disease Reporter* 50:699-700. 1966.

GANGLIANO, V.J. & HINS DILL, R.D. Characterization of *Staphylococcus aureus* bacteriocin. *Journal of Bacteriology* 104:117-125. 1970.

HERT, A.P.; MARUTANI, M.; MOMOL, M.T.; ROBERTS, P.D. & JONES, J.B. Analysis of pathogenicity mutants of a bacteriocin producing *Xanthomonas perforans*. *Biological Control* 51:362-369. 2009.

HOOVER, D.G. & HARLANDER, S.K. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In: HOOVER, D.G. & STEENSON, L.R (Eds). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press. p. 23–29. 1993.

JONES, A. L.; JONES, J.P.; STALL, R. E.; ZITTER, T.A. *Compendium of Tomato Diseases*. St Paul: APS Press. 1991. p.73.

JONES, J.B.; BOUZAR, H.; SOMODI, G.C.; STALL, R.E.; PERNEZNY, K.; ELMORSY, G. & SCOTT, J.W. Evidence for the preemptive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. *Phytopathology* 88:33-38. 1998.

JONES, J.B.; LACY, G.H.; BOUZAR, H.; STALL, R.E.; SCHAAD, N.W. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27:755-762. 2004.

JONES, J.B.; RAJU, B.C. & ENGELHARD, A.W. Effects of temperature and leaf wetness on development of bacterial spot of geraniums and chrysanthemums incited by *Pseudomonas cichorii*. Plant Disease 68:248-251. 1984.

JONES, J.B. & STALL, R.E. Diversity among Xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. Annual Review Phytopathology 36:41-58. 1998.

JONES, J.B.; STALL, R.E.; SCOTT, J.W.; SOMODI, G.C.; BOUZAR, H. & HODGE, N.C. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Plant Disease 79:395-398. 1995.

KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K. & SANDS, D.C. Methods in Phytobacteriology. Budapest. Akadémia Kiadó, p. 568. 1990.

KONG, G.A.; SIMPSON, G.B.; KOCHMAN, J.K. & BROWN, J.F. Components of quantitative resistance in sunflower to *Alternaria helianthi*. Annals of Applied Biology 130:439-451. 1997.

LATORRE, B.A.; RIOJA, M.E. & LILLO, C. The effect of temperature on infection and a warning system for pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Crop Protection 21:33-39. 2002.

LI, C.; BAI, J.; CAI, Z & OUYANG, F. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. J. Biotechnol 93:27-34. 2002.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, M.A.; Doenças bacterianas. In: LOPES, C. A.; ÀVILA, A. C. Doenças do Tomateiro. Brasília: EMBRAPA-CNPq, p.62-64. 2005.

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. Doenças do tomateiro. Brasília: Embrapa-CNPq, p. 51-58. 1994.

MARCUZZO, L.L.; FERNANDES, J.M.C. & BECKER, W.F. Influência da temperatura e da duração do molhamento foliar na severidade da mancha bacteriana do tomateiro. *Summa Phytopathologica* 35:229-230. 2009.

MARIANO, R.. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. In: LUZ, W.C. (Ed.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo, RS, Gráfica Editora Pe. Berthier. 1993. p. 416.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R.C.W. Methods for studying bacteriocins. In: MORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. *Methods in Microbiology* 7A:315 – 422. 1972.

MONTGOMERY, D.C. Design and Analysis of Experiments. 5ª edição. John Wiley & Sons, Inc. New York. p 557-589. 2001

NAYUDU, M.V. & WALKER, J.C. Bacterial spot of tomato as influenced by temperature and by age and nutrition of the host. *Phytopathology* 50:360-364. 1960.

PARLEVLIET, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology* 17:203-222. 1979.

PHAM, H.T.; RIU, K.Z.; JANG, K.M.; CHO, S.M. & CHO, M. Bactericidal activity of Glycinecin A, a bacteriocin derived from *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4486–4490. 2004.

PRIA, M.D.; CHRISTIANO, R.C.S. FURTADO, E.L.; AMORIM, L. & BERGAMIN FILHO, A. Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. *Plant Pathology* 55:657–663. 2006.

QUEZADO-DUVAL, A.M.; LOPES, C.A.; LEITE JUNIOR, R.P.; LIMA, M.F.; CAMARGO, L.E.A. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. In: M.T. Momol, P. Ji & J.B. Jones (Eds). *Acta Hort.* 695:101-108. 2005.

REEVES, P. The Bacteriocins. In: KLEINZELLER, A.; SPRINGER, G.F.; WITTMANN, H.G. (Eds.). *Molecular Biology Biochemistry and Biophysics*. New York: Springer-Verlag, p. 115. 1972.

RILEY, M.A. & WERTZ, J.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review Microbiology* 56:117–137. 2002.

ROBINSON, P.E. Bacterial leaf spot of lettuce: relationship of temperature to infection and potential host range of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. Plant Disease 90:465-470. 2006.

ROMEIRO, R.S. Bactérias Fitopatogênicas. Viçosa, Imprensa Universitária – UFV, 367 p. 1995.

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

SPIERS, A.J.; BUCKLING, A. & RAINEY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. Microbiology 146:2345–2350. 2000.

STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associates with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS. Microbiology Reviews 24:487-506. 2000.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.M. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. Bacteriology Review 40:722–756. 1976.

TUDOR-NELSON, S.M.; MINSAVAGE, G.V.; STALL, R.E. & JONES, J.B. Bacteriocin-like substances from tomato race 3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology 93:1415-1421. 2003.

VALE, F.X.R., FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. & ZAMBOLIM, L. Quant. – a software to quantify plant disease severity. Resumos, VIII International workshop on plant disease epidemiology, Ouro Preto – MG. p.160. 2001

VANDERPLANK, J.E. Host-Pathogen Interactions in Plant Disease. New York, USA: Academic Press. 1982.

VANDERPLANK, J.E. Plant Diseases: Epidemics and Control. Academic Press. New York. 1963.

VIDAVER, A.K. Bacteriocins: the lure and the reality. *Plant Disease* 67:471–475. 1983.

VILLAS BÔAS, G.L.; MELO, P.E.; CASTELO BRANCO, M.; GIORDANO, L.B.; MELO, W.F. Desenvolvimento de um modelo de produção integrada de tomate indústria – PITI. In: ZAMBOLIM, L.; LOPES, C.A.; PICANÇO, M.C.; COSTA, H. (Eds.). *Manejo Integrado de Doenças e Pragas – Hortaliças*. UFV/Embrapa Hortaliças. p. 349-362. 2007.

WILSON, K. Preparation of genomic bacteria. In: AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed). *Short Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley. p. 2-14. 1999.

CAPÍTULO II
Competitividade entre isolados de *Xanthomonas*
***perforans* resistentes e sensíveis a cobre**

Resumo

Competitividade entre isolados de *Xanthomonas perforans* resistentes e sensíveis a cobre

A utilização de antibióticos e produtos à base de cobre para o controle da mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas* spp., não tem demonstrado efeito adequado quando empregados isoladamente, podendo haver relação com uma baixa sensibilidade dos agentes causais a esses produtos. Em alguns patossistemas, isolados que adquiriram resistência a algum produto químico, demonstram redução ou alteração de sua competitividade na condição de ausência do produto. O objetivo deste capítulo foi avaliar a competitividade entre isolados de *Xanthomonas perforans* sensíveis e resistentes a cobre. Primeiramente, realizou-se uma seleção de isolados de acordo com sua sensibilidade a diferentes concentrações de sulfato de cobre. Isolados resistentes e sensíveis foram inoculados em plantas de tomate da variedade Yuba individualmente e em combinações para posterior quantificação de sintomas e recuperação de colônias em meio MMCC (Minimal Medium Complexing Copper) acrescido ou não de sulfato de cobre. Apenas dois dos isolados avaliados não se desenvolveram *in vitro* na concentração de 50 ppm e nenhum conseguiu se desenvolver na concentração de 200 ppm, demonstrando que a espécie *X. perforans* pode ser eficazmente controlada a esta concentração. A severidade dos sintomas ocasionada pelos isolados sensíveis mostrou-se maior que a dos isolados resistentes, indicando redução de competitividade na ausência de sulfato de cobre. A recuperação de colônias em meio de cultura também indicou uma vantagem competitiva dos isolados sensíveis a cobre em relação àqueles resistentes.

Palavras-chaves: mancha bactéria; *Xanthomonas perforans*; cobre; competitividade.

Abstract

Fitness among isolates of *Xanthomonas perforans* resistant and sensitive to copper

The use of antibiotics and products based on copper for the control of bacterial spot caused by *Xanthomonas* spp., has not shown a significant field effect when applied alone. This may be related to reduced sensitivity of the causal agents of bacterial spot to these products. In some pathosystems, isolates that have acquired resistance to some chemical, display a concurrent reduction or change in fitness when in the absence of the product. The purpose of this study was to evaluate the fitness of isolates of *Xanthomonas perforans* sensitive and resistant to copper. Firstly, a collection of isolates was classified according to their respective sensitivity to different concentrations of copper sulfate. Then, selected resistant and sensitive isolates were inoculated into tomato plants of the cv. Yuba individually and in combinations for aggressiveness assessment and recovery of colonies in the MMCC (Minimal Medium Complexing Copper) amended or not with copper sulphate. Only two of the isolates did not grow *in vitro* at 50 ppm of copper sulphate, and none managed to grow at 200 ppm, showing that the *X. perforans* can be effectively controlled at higher concentrations. The severity of symptoms caused by the sensitive isolates was higher than those caused by the resistant isolates, indicating a reduction of competitiveness of the resistant isolates in the absence of copper sulphate. The recovery of colonies in the culture medium also indicated a competitive advantage isolates sensitive to copper in relation to those resistant.

Key words: bacterial spot; *Xanthomonas perforans*; copper; fitness

Introdução

A mancha bacteriana do tomateiro, causada por diferentes espécies de *Xanthomonas*, é um sério problema nos campos brasileiros de tomate (*Solanum lycopersicum*) destinados ao processamento devido às condições ambientais favoráveis, indisponibilidade de cultivares resistentes e a ausência de controle químico eficiente (Quezado-Duval et al., 2005).

Apesar de amplamente empregados em lavouras de tomate para processamento industrial no Brasil, fungicidas cúpricos e antibióticos registrados para uso agrícola nem sempre resultam em controle eficiente das bacterioses que afetam a cultura. O aparecimento de estirpes resistentes aos defensivos químicos é uma das causas dessa baixa eficiência. A coleta de diferentes espécies de *Xanthomonas*, causadora da mancha bacteriana no Brasil e de testes de sensibilidade a produtos cúpricos, evidenciou que todos os isolados do grupo “C”, aqui tratados como *Xanthomonas perforans*, foram sensíveis à estreptomicina e 97% destes sensíveis ao cobre (Quezado-Duval et al., 2003).

Tanto em espécies superiores quanto entre os microrganismos, a diversidade genética é originada e mantida devido a fatores genéticos e ecológicos (Spiers et al., 2000). As principais estratégias genéticas responsáveis pelo surgimento e ampliação da diversidade genética são mutação, recombinação e aquisição de seqüências de DNA de outros microrganismos, as chamadas transferências gênicas horizontais (Arber, 2000). Os fatores ecológicos estão ligados à oportunidade em colonizar um hospedeiro e à competição entre isolados (Spiers et al., 2000).

Alguns trabalhos têm demonstrado que isolados fitopatogênicos que adquirem resistência a determinados produtos químicos têm sua competitividade reduzida quando comparados com isolados sensíveis ao mesmo produto, desde que ambos estejam

sujeitos à condição de ausência do produto. Pode-se observar que determinados isolados de fungos fitopatogênicos sensíveis a fungicidas são capazes de produzir maior quantidade de esporos em meio de cultura, maiores raios de micélio ou ocasionar lesões em maior número que aqueles resistentes ao mesmo produto, indicando uma perda na agressividade destes organismos (Webber, 1988; Sanoamuang & Gaunt, 1995).

Já para outros patossistemas, a mutação para aquisição de resistência por parte de um organismo não acarretou a redução do seu potencial competitivo, podendo inclusive, estes apresentarem maior agressividade que isolados da mesma espécie sensíveis ao mesmo produto (Café Filho & Ristaino, 2008; Hu et al., 2008; Shabi & Katan, 1980; Kadish & Cohen, 1988).

Em campos de pimentão (*Capsicum annuum*) na Austrália, observou-se a incidência de isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* tolerantes à produtos cúpricos em diferentes campos de produção. Antes de 1987, apenas um em cada doze isolados era considerado tolerante, já nas coletas correspondentes aos anos de 1999 e 2000, essa proporção passou para uma em cada quatro, indicando seleção de isolados, em favor da resistência ao cobre, devido à pressão de seleção exercida pelas constantes aplicações em campo. Os produtores locais informaram que utilizavam apenas as doses recomendadas dos produtos indicados. Percebeu-se também que aplicações contínuas de produtos à base de cobre podiam elevar a população de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de uma determinada área, quando já se sabia que esta era resistente ao bactericida (Martin et al., 2004).

Este capítulo teve por objetivo avaliar a competitividade entre isolados de *Xanthomonas perforans* que apresentam sensibilidade ou resistência a cobre, observando a capacidade de ocasionar doença de cada grupo.

Material & Métodos

Seleção de isolados de *X. perforans* quanto à resistência a cobre

Foram selecionados isolados da coleção de trabalho da Embrapa Hortaliças (EH) previamente identificados para seleção quanto à sensibilidade a sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Tabela 2.1). Para verificação de sensibilidade ou resistência dos isolados, foi utilizado o meio MMCC – Minimal Medium Complexing Copper (Pohronezny et al., 1992), que possui baixa capacidade de complexar os íons de cobre.

Os isolados foram recuperados do tampão-fosfato (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 pH 7) em meio Nutriente Agar (NA) e incubados por quatro dias a 28°C. Fez-se a repicagem de colônias isoladas para proceder o preparo da solução bacteriana em sulfato de magnésio 10 mMol/L. Após ajuste da concentração da solução em espectrofotômetro $\text{OD}_{600} = 0,3$ (5×10^8 UFC/mL), depositou-se alíquotas de 10 µl com tripla repetição em placas contendo meio MMCC com sulfato de cobre nas concentrações de 50; 100 e 200 ppm (µg/mL).

As placas foram incubadas por 48 horas a 28 °C. Foi considerado resistente o isolado que apresentou crescimento confluyente da massa bacteriana.

Tabela 2.1: Isolados de *Xanthomonas perforans* e respectivos locais de origem utilizados para teste de sensibilidade a cobre.

<i>Isolado</i>	<i>Local de Origem</i>
EH 2005-30	Vicentinópolis – GO
EH 2005-54	Goiânia – GO
EH 2005-60	Patos de Minas – MG
EH 2006-44	Itaberaí – GO
EH 2007-09	Itaberaí – GO
EH 2007-26	Joviânia – GO
EH 2008-13	Rio Verde – GO
EH 2008-14	Rio Verde – GO
EH 2008-16	Rio Verde – GO
EH 2008-19	Rio Verde – GO
EH 2008-20	Rio Verde – GO
EH 2008-28	Luziânia – GO
EH 2009-10	Goiânia – GO
EH 2009-11	Goiânia – GO

Competição entre isolados de *X. perforans* resistentes e sensíveis a cobre

Foram selecionados isolados que apresentaram sensibilidade à concentração de 100 ppm de cobre (sensíveis), e os que apresentavam crescimento confluyente a 100 ppm (resistentes) e então utilizados para observação de competitividade e agressividade ocasionada por ambos os grupos. Os isolados foram riscados de tampão-fosfato (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 pH 7) em meio NA e incubados por 4 dias a 28°C. Fez-se a repicagem de colônias isoladas para proceder o preparo do inóculo. Utilizou-se uma solução de sulfato de magnésio de 10mMol/L (Sigma Cell Culture $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) para preparo da solução bacteriana e ajustou-se a concentração em espectrofotômetro $OD_{600} = 0,3$ (5×10^8 UFC/mL).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, onde isolados de *X. perforans* sensíveis e resistentes a cobre foram inoculados individualmente e em combinações em plantas de tomate da variedade Yuba (CNPQ 851). Para a inoculação conjunta, após ajuste da concentração da solução bacteriana para 5×10^8 UFC/mL, misturou-se em um mesmo recipiente, volumes equivalentes de inóculo de um isolado de XP resistente e um isolado de XP sensível na mesma concentração já citada. Fez-se a inoculação da solução bacteriana utilizando borrifadores manuais, distribuindo homogeneamente a solução de inóculo por toda superfície foliar, até o início do escorrimento das folhas. Após a inoculação, realizou-se câmara úmida em cada uma das plantas por 48 horas com o auxílio de sacos plásticos umedecidos.

Doze dias após a inoculação, coletou-se 5 folíolos de cada tratamento, anexando-os com auxílio de fita dupla face em folha branca com régua milimetrada para posterior digitalização da imagem. Utilizou-se o programa QUANT (Vale et al., 2001) – software para quantificação de doenças de plantas V. 1.0 – UFV, que diferencia área lesionada de área sadia por distinção de cores para quantificar a severidade de cada um dos isolados e das combinações. Considerou-se como sintomas da doença a presença de manchas características e tecido necrótico, não sendo consideradas as áreas cloróticas.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, tendo nove tratamentos (três isolados sensíveis, três resistentes e três combinações) e duas repetições. Cálculos estatísticos foram realizados com o programa SAS (SAS Institute, 2002) e as médias comparadas pelo teste Fisher-LSD.

Recuperação dos isolados de *Xanthomonas perforans* resistentes e sensíveis a cobre

A recuperação dos isolados resultantes da combinação entre isolados de XP resistentes e sensíveis a cobre se deu a partir das lesões foliares em meio MMCC com cobre na concentração de 100 ppm e meio MMCC sem cobre.

Duas amostras compostas com três folíolos sintomáticos foram retiradas das plantas que compunham a parcela para a recuperação dos isolados presentes. Para o isolamento foi retirada uma seção de tecido foliar com 8 mm de diâmetro na intersecção entre as áreas sadias e lesionadas. A assepsia foi feita em câmara de fluxo laminar, por um processo de submersão por dez segundos em álcool etílico 70%, trinta segundos em água sanitária 10% e tríplice lavagem com solução de sulfato de magnésio 10mMol/L para retirar o excesso de álcool e de água sanitária. Após este procedimento, macerou-se os pedaços com auxílio de um bastão de vidro devidamente flambado e resfriado.

Após a obtenção do macerado, fez-se diluição seriada até 10^{-5} a partir da concentração inicial, que foi a concentração onde a contagem de colônias foi possível. 100 µl desta solução foi depositada, com auxílio de uma micropipeta nas placas com os diferentes tipos de meio e espalhada com alça de Drigalsky. Após 72 horas, contou-se as colônias nos meios com presença e ausência do cobre. Foram feitas três repetições para cada combinação.

Resultados & Discussão

Seleção de isolados quanto à resistência a cobre

Do total de isolados testados, apenas dois (2008-13; 2008-16) mostraram-se sensíveis a concentração de 50 ppm de sulfato de cobre *in vitro*. Já para a concentração de 100 ppm, quatro isolados apresentaram crescimento confluyente (2008-14; 2008-19; 2008-28 e 2009-11) e foram considerados resistentes. Nenhum isolado cresceu na concentração de 200 ppm (Tabela 2.2), indicando que esta é uma concentração eficiente no controle desta espécie de *Xanthomonas*.

Apesar de amplamente empregados em lavouras de tomate para processamento industrial no Brasil, fungicidas cúpricos e antibióticos registrados para uso agrícola nem sempre resultam em controle eficiente das bacterioses que afetam a cultura. O aparecimento de estirpes resistentes é uma das causas dessa baixa eficiência. Entretanto, até recentemente, todos os isolados avaliados do grupo “C” (*X. perforans*) foram sensíveis à estreptomicina e, 97% destes, sensíveis ao cobre (Quezado-Duval et al., 2003).

As concentrações utilizadas para o teste apresentam relação direta com àquelas utilizadas em campo, uma vez que para o controle da mancha bacteriana do tomateiro, utiliza-se em média, uma concentração de 2000 a 3000 ppm para produtos cúpricos em campo, segundo Andrei (2005). Nos testes *in vitro*, normalmente utiliza-se uma concentração 10 vezes menor que a utilizada em campo, logo, a concentração de 200 ppm condiz com a realidade das medidas de controle.

Em experimentos de campo, utilizando formulações cúpricas e cuprorgânicas (sulfato de cobre, oxiclreto de cobre, óxido cuproso e óxido cuproso+mancozeb) visando a redução de populações de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* presentes

no filoplano do pimentão, isolados considerados resistentes ao cobre, com base em testes *in vitro* não apresentaram redução significativa da doença quando realizado teste em campo, indicando que as concentrações de Cu nos produtos utilizados, que variaram de 20,2 a 112,5 ppm, foram insuficientes para promover controle satisfatório após o estabelecimento da doença (Aguiar et al., 2003).

Nos Estados Unidos e Canadá, práticas de manejo da mancha bacteriana, baseadas essencialmente em bactericidas à base de cobre não demonstraram proteção e controle eficaz (Abbasi et al., 2002). Isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* coletados em diferentes países da América Central, mostraram-se em sua maioria, quase 90% do total, resistentes a cobre. Com ocorrência de maior variabilidade quanto à resposta a estreptomicina (Bouzar et al., 1999).

Tabela 2.2: Reação de isolados de *Xanthomonas perforans* a sulfato de cobre em três diferentes concentrações.

<i>Isolado</i>	<i>Cobre 50 ppm</i>	<i>Cobre 100 ppm</i>	<i>Cobre 200 ppm</i>
2005-30	+	-	-
2005-54	+	-	-
2005-60	+	-	-
2006-44	+	-	-
2007-09	+	-	-
2007-26	+	-	-
2008-13	-	-	-
2008-14	+	+	-
2008-16	-	-	-
2008-19	+	+	-
2008-20	+	-	-
2008-28	+	+	-
2009-10	+	-	-
2009-11	+	+	-

+ = Crescimento bacteriano

- = Ausência de crescimento

Por ser *X. perforans* a espécie predominante em campos de produção de tomate na Flórida (Jones et al., 1998) e estar presente em diversas áreas de produção no Brasil (Quezado-Duval, 2003), o conhecimento da resposta a produtos utilizados no controle da doença, como o cobre, se faz importante para um melhor manejo do patossistema,

Competição entre isolados de *Xanthomonas perforans* resistentes e sensíveis a cobre

Os isolados considerados sensíveis (S) provocaram uma maior porcentagem de área foliar lesionada, logo se apresentaram mais agressivos quando comparados àqueles considerados resistentes (R). Os isolados 2008-13 e 2008-16, ambos sensíveis a cobre apresentaram significativamente maior severidade que os isolados considerados resistentes. O isolado 2008-13 (S) ocasionou, em porcentagem geral, maior área foliar lesionada, se destacando significativamente por sua agressividade, quando comparado à média dos isolados resistentes (Figura 2.1).

Em outro patossistema, entre isolados de *Phytophthora nicotianae* resistentes e sensíveis a metalaxyl, observou-se que isolados resistentes podiam ser igualmente competitivos com aqueles considerados sensíveis ao produto (Timmer & Graham, 1998).

Vantagens competitivas entre isolados de uma determinada espécie resistentes ou sensíveis a um produto específico utilizado no seu controle mostra-se variável de acordo com o patossistema analisado. Para agentes patogênicos do gênero *Phytophthora*, de forma geral, quando estes isolados são testados quanto à sua competitividade na ausência do produto de controle, pode-se observar que os isolados resistentes são tão competitivos ou até mais agressivos que os sensíveis, no que diz

respeito à produção de esporos, crescimento micelial e capacidade de ocasionar danos diretos às plantas hospedeiras (Hu et al., 2008; Café-Filho & Ristaino, 2008; Kadish et al., 1990).

Para outros patossistemas, pode-se observar a situação contrária, ou seja, isolados sensíveis a um determinado produto, apresentam vantagens competitivas em relação aos resistentes da mesma espécie (Sanoamuang & Gaunt, 1995; Webber, 1988).

A severidade para as inoculações conjuntas não apresentou efeito somatório de sintomas entre os isolados, ou seja, não houve um acréscimo na severidade quando comparado à severidade média dos isolados sensíveis. Das três combinações avaliadas, duas (2007-26+2005-54; 2005-30+2008-16) apresentaram porcentagem de área foliar lesionada significativamente superior aos isolados 2005-30 (R) e 2007-26 (R). Porém, nenhuma das combinações apresentou maior severidade significativa em relação aos isolados sensíveis.

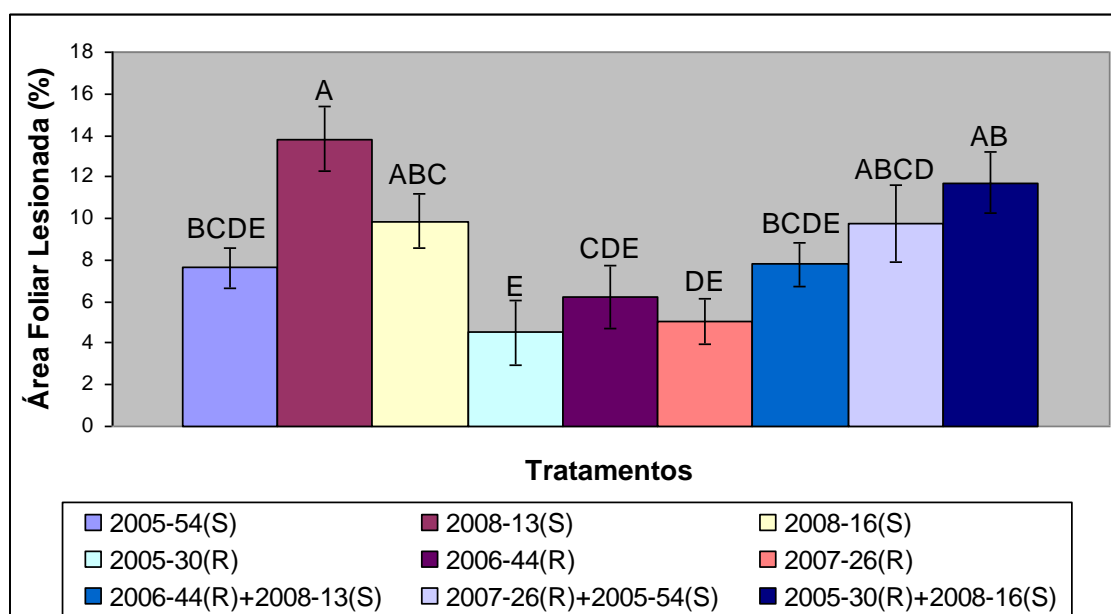


Figura 2.1: Percentual de área foliar lesionada em plantas de tomate, 12 dias após a inoculação com diferentes isolados de *Xanthomonas perforans* resistentes ou sensíveis a cobre e combinações de ambos. Barras que apresentam a mesma letra não diferem significativamente (LSD, $p \leq 0,05$). (R) = resistente a 100 ppm de sulfato de cobre. (S) = sensível a 100 ppm de sulfato de cobre.

Sabe-se que o excesso de cobre no interior de células bacterianas pode ocasionar toxidez nas mesmas, afetando simultaneamente diversas funções metabólicas. Para a sobrevivência em um ambiente com alta concentração desse produto, a bactéria necessita ativar diferentes mecanismos de regulação deste excesso de cobre, que estão diretamente relacionados com a aquisição de genes de resistência localizados na região plasmidial. Estes mecanismos ainda não foram bem elucidados (Teixeira et al., 2008; Rensing & Grass, 2003). É possível que este gasto metabólico adicional ocasione uma perda de competitividade daqueles isolados que adquiriram tal resistência, quando na ausência da pressão de seleção de um produto cúprico.

Estes resultados indicam que existe vantagem competitiva dos isolados sensíveis a cobre, no que diz respeito à capacidade de produção de lesões ou doença, com relação àqueles isolados resistentes ao mesmo produto. Isto é, ocorre perda de “fitness” associada ao ganho de resistência ao cobre.

Recuperação dos isolados de *Xanthomonas perforans* resistentes e sensíveis a cobre

A partir da contagem das colônias em meio MMCC acrescido de cobre, pode-se notar que houve uma redução significativa no número de colônias, indicando que esta redução seja a parte representada por aqueles isolados sensíveis. Na combinação 2007-26(R) + 2005-54(S), observou-se que no meio com cobre não houve crescimento de colônias bacterianas em nenhuma das três repetições (Figura 2.2). Este resultado sugere que os isolados recuperados desta combinação representaram predominantemente o isolado sensível à concentração de cobre presente no meio. Já para as outras duas

combinações, nota-se que a parcela de isolados sensíveis e resistentes mostram-se significantes na recuperação entre os isolados da combinação.

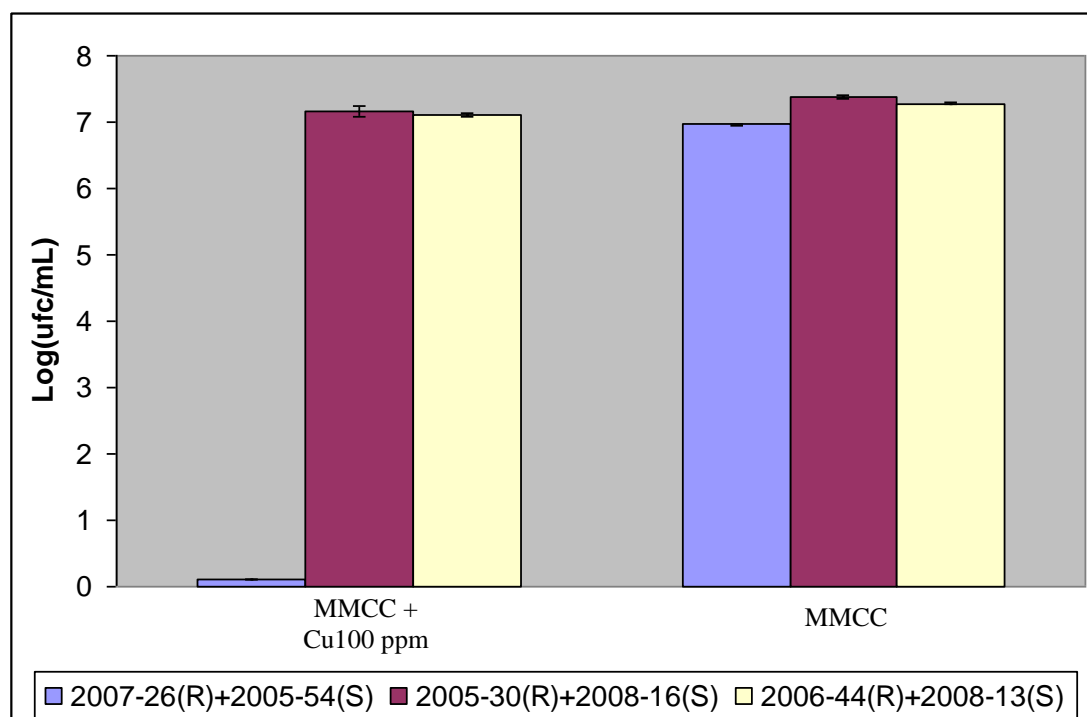


Figura 2.2: Recuperação em meio MMCC acrescido ou não com sulfato de cobre (100ppm) de isolados de *Xanthomonas perforans* resistentes e sensíveis a cobre, 12 dias após a inoculação destes isolados em diferentes combinações. (R) = isolado resistente a 100 ppm de sulfato de cobre. (S) = isolado sensível a 100 ppm de sulfato de cobre.

Isolados de *X. perforans* mostram-se sensíveis a concentrações de 200 ppm de sulfato de cobre. A competitividade entre isolados resistentes e sensíveis a cobre para este patossistema mostra-se variável, principalmente para a recuperação dos isolados nas respectivas combinações, mas de forma geral, isolados sensíveis a cobre foram capazes de causar maior quantidade de doença, apresentando uma maior competitividade. Esta informação aponta para uma cuidadosa utilização de produtos cúpricos para o controle da mancha bacteriana, uma vez que o favorecimento de indivíduos resistentes pode ser revertido pela retirada programada do produto, favorecendo os indivíduos sensíveis e promovendo novamente sua eficiência de controle.

Referências Bibliográficas

ABBASI, P. A.; SOLTANI, N.; CUPPELS, D. A.; LAZAROVITS, G. Reduction of bacterial spot disease severity on tomato and pepper plants with foliar applications of ammonium lignosulfonate and potassium phosphate. *Plant Disease* 86:1232-1236. 2002.

AGUIAR, L.A.; KIMURA O.; CASTILHO, A.M.C.; CASTILHO, K.S.C.; RIBEIRO, R.L.D., AKIBA, F.; CARMO, M.G.F. Efeito de formulações cúpricas e cuprorgânicas na severidade da mancha-bacteriana e na população residente de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão. *Horticultura Brasileira* 21: 44-50. 2003.

ANDREI, E. *Compêndio de Defensivos Agrícolas*. Andrei Editora. 7º edição. 2005. 1141 p.

ARBER, W. Genetic variation: molecular mechanism and impact on microbial evolution. *FESM Microbiology Reviews* 24:1-7. 2000.

BOUZAR, H.; JONES, J. B.; STALL, R. E.; LOUWS, F. J.; SCHNEIDER, M.; RADEMAKER, J. L. W.; de BRUIJN, F. J.; JACKSON, L. E. Multiphasic analysis of *Xanthomonas* 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. 1999.

CAFÉ-FILHO, A.C. & RISTAINO, J.B. Fitness of isolates of *Phytophthora capsici* resistant to mefenoxam from squash and pepper fields in North Carolina. *Plant Disease* 92:1439-1443. 2008.

DYE, D.W. Cultural and biochemical reaction of additional *Xanthomonas* species. *New Zealand Journal of Science* 9:913-919. 1966.

HU, J.H.; HONG, C.X.; STROMBERG, E.L. & MOORMAN, G.W. Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA. *Plant Pathology* 57:728–736. 2008.

JONES, J. B.; STALL, R. E.; BOUZAR, H. Diversity among Xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annual Review of Phytopathology* 36:41-58. 1998.

KADISH, D. & COHEN, Y. Competition between metalaxyl-sensitive and metalaxyl resistant isolates of *Phytophthora infestans* in the absence of metalaxyl. *Plant Pathology* 37:558-564. 1988.

KADISH, D.; GRINBERGER, M. & COHEN, Y. Fitness of metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* on susceptible and resistant potato cultivars. *Phytopathology* 80:200-205. 1990.

MARTIN, H. L.; HAMILTON, V. A. & KOPITTKER, R. A. Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. *Plant Disease* 88:921-924. 2004.

POHRONEZNY, K.; SOMMERFELD, M. & RAID, R.N. Streptomycin resistance and copper tolerance among strain of *Pseudomonas cichorii* in commercial celery seedbeds. *Phytopathology* 82:1118. 1992. (Abstract).

QUEZADO-DUVAL, A.M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R. P.; CAMARGO, L.E.A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira* 21:672-677. 2003.

QUEZADO-DUVAL, A.M.; LOPES, C.A.; LEITE JUNIOR, R.P.; LIMA, M.F.; CAMARGO, L.E.A. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. M.T. Momol, P. Ji & J.B. Jones (Eds). *Acta Hort.* 695:101-108. 2005.

RENSING, C. & GRASS, G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *Microbiology Reviews* 27:197-213. 2003.

SANOAMUANG, N. & GAUNT, R.E. Persistence and fitness of carbendazim- and dicarboximideresistant isolates of *Monilinia frudicola* (Wint.) Honey in flowers, shoots and fruit of stone fruit. *Plant Pathology* 44:448-457. 1995.

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

SHABI, E. & KATAN, T. Fitness of *Venturia pirina* isolates resistant to benzimidazole fungicides. *Phytopathology* 70:1172-1174. 1980.

SPIERS, A.J.; BUCKLING, A. & RAINEY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146:2345–2350. 2000.

TEIXEIRA, E.C.; OLIVEIRA, J.C.F.; NOVO, M.T.M. & BERTOLINI, M.C. The copper resistance operon *copAB* from *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*: gene inactivation results in copper sensitivity. *Microbiology* 154:402-412. 2008.

TIMMER, L.W. & GRAHAM, J.H. Metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora nicotianae*: occurrence, sensitivity, and competitive parasitic ability on citrus. *Plant Disease* 82:254-261. 1998.

VALE, F.X.R., FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. & ZAMBOLIM, L. Quant. – a software to quantify plant disease severity. Resumos, VIII International workshop on plant disease epidemiology, Ouro Preto – MG. p.160. 2001.

WEBBER, J.F. Effect of MBC fungicide tolerance on the fitness of *Ophiostoma ulmi*. *Plant Pathology* 37:217-224. 1988.

ANEXO I

TEMPERATURA CONFUNDIDA COM BLOCOS

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TEMP	3	20 25 30
ESP	4	XE XG XP XV
ISOL	3	1 2 3

Number of Observations Read 72
Number of Observations Used 72

TEMPERATURA CONFUNDIDA COM BLOCOS

The GLM Procedure

Dependent Variable: SOMAISOL

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	428.506069	32.962005	2.54	0.0078
Error	58	752.646445	12.976663		
Corrected Total	71	1181.152514			

R-Square 0.362786 Coeff Var 63.89371 Root MSE 3.602314 SOMAISOL Mean 5.637978

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TEMP	2	69.4885683	34.7442842	2.68	0.0772
ESP	3	286.8296190	95.6098730	7.37	0.0003
ISOL(ESP)	8	72.1878816	9.0234852	0.70	0.6941

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TEMP	2	69.4885683	34.7442842	2.68	0.0772
ESP	3	286.8296190	95.6098730	7.37	0.0003
ISOL(ESP)	8	72.1878816	9.0234852	0.70	0.6941

TEMPERATURA CONFUNDIDA COM BLOCOS

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for SOMAISOL

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 58
Error Mean Square 12.97666
Critical Value of t 2.00172
Least Significant Difference 2.4036

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	ESP
A	6.917	18	XV
A	6.733	18	XG
A	6.719	18	XP
B	2.184	18	XE

CADA TEMPERATURA É UM EXPERIMENTO proc sort data=SAuser.ed72

----- TEMP=20 ----- The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
REP	2	1 2
ESP	4	XE XG XP XV
ISOL	3	1 2 3

Number of Observations Read 24
 Number of Observations Used 24

CADA TEMPERATURA É UM EXPERIMENTO proc sort data=SAuser.ed72
 ----- TEMP=20 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: SOMAISOL

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	499.2170051	41.6014171	21.43	<.0001
Error	11	21.3552195	1.9413836		
Corrected Total	23	520.5722247			

R-Square 0.958977
 Coeff Var 24.51856
 Root MSE 1.393335
 SOMAISOL Mean 5.682778

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REP	1	2.3465286	2.3465286	1.21	0.2951
ESP	3	354.7951247	118.2650416	60.92	<.0001
ISOL(ESP)	8	142.0753519	17.7594190	9.15	0.0007

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REP	1	2.3465286	2.3465286	1.21	0.2951
ESP	3	354.7951247	118.2650416	60.92	<.0001
ISOL(ESP)	8	142.0753519	17.7594190	9.15	0.0007

CADA TEMPERATURA É UM EXPERIMENTO proc sort data=SAuser.ed72

----- TEMP=20 ----- The GLM Procedure

t Tests (LSD) for SOMAISOL

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 11
 Error Mean Square 1.941384
 Critical Value of t 2.20099
 Least Significant Difference 1.7706

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	ESP
A	11.1139	6	XG
B	7.4485	6	XV
C	2.6413	6	XP
C	1.5274	6	XE

CADA TEMPERATURA É UM EXPERIMENTO proc sort data=SAuser.ed72

----- TEMP=25 ----- The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
REP	2	1 2
ESP	4	XE XG XP XV
ISOL	3	1 2 3

Number of Observations Read 24
 Number of Observations Used 24

CADA TEMPERATURA É UM EXPERIMENTO proc sort data=SAuser.ed72

12

----- TEMP=25 ----- The GLM Procedure

Dependent Variable: SOMAISOL

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	----------------	-------------	---------	--------

ISOL(ESP)	8	72.3227103	9.0403388	2.55	0.0763
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REP	1	0.0975375	0.0975375	0.03	0.8713
ESP	3	127.3915261	42.4638420	11.97	0.0009
ISOL(ESP)	8	72.3227103	9.0403388	2.55	0.0763

CADA TEMPERATURA É UM EXPERIMENTO proc sort data=SAuser.ed72

----- TEMP=30 -----The GLM
Procedure

t Tests (LSD) for SOMAISOL

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	11
Error Mean Square	3.548895
Critical Value of t	2.20099
Least Significant Difference	2.3939

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	ESP
A	7.688	6	XP
A			
A	5.383	6	XV
B	2.817	6	XG
B			
B	1.764	6	XE