

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

LARA CAROLINE BORGES MOREIRA MOTA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Pseudomonas*  
spp. DO TOMATEIRO TUTORADO NO BRASIL

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2020

LARA CAROLINE BORGES MOREIRA MOTA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Pseudomonas*  
spp. DO TOMATEIRO TUTORADO NO BRASIL

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Doutorado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador: Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nilvanira Donizete  
Tebaldi

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M917 Mota, Lara Caroline Borges Moreira, 1989-  
2020 Caracterização fenotípica e genotípica [recurso eletrônico] : de  
isolados de Pseudomonas spp. do tomateiro tutorado no Brasil /  
Lara Caroline Borges Moreira Mota. - 2020.

Orientadora: José Magno Queiroz Luz.  
Coorientadora: Nilvanira Donizete Tebaldi.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-  
graduação em Agronomia.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.270>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Agronomia. I. Luz, José Magno Queiroz, 1967-, (Orient.). II.  
Tebaldi, Nilvanira Donizete, 1970-, (Coorient.). III. Universidade  
Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU: 631

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
 Rodovia BR 050, Km 78, Bloco 1CCG, Sala 206 - Bairro Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: (34) 2512-6715/6716 - www.ppga.iciag.ufu.br - posagro@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agronomia				
Defesa de:	Tese de Doutorado, 005/2020, PPGAGRO				
Data:	Vinte e um de fevereiro de 2020	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	11:50
Matrícula do Discente:	11613AGR014				
Nome do Discente:	Lara Caroline Borges Moreira Mota				
Título do Trabalho:	Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de Pseudomonas spp. do tomateiro tutorado no Brasil				
Área de concentração:	Fitotecnia				
Linha de pesquisa:	Produção Vegetal em áreas do Cerrado				

Reuniu-se na Sala 212 bloco 1CCG , Campus Glória, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agronomia, assim composta: Professores Doutores: Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU; Alison Talis Martins Lima - UFU; Alice Maria Quezado Duval - EMBRAPA; Igor Souza Pereira - IFTM; e José Magno Queiroz Luz - UFU orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. José Magno Queiroz Luz apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **José Magno Queiroz Luz, Professor(a) do Magistério Superior**, em 21/02/2020, às 11:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Nilvanira Donizete Tebaldi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 21/02/2020, às 11:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Alison Talis Martins Lima, Professor(a) do Magistério Superior**, em 21/02/2020, às 12:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Igor Souza Pereira, Usuário Externo**, em 21/02/2020, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Alice Maria Quezado Duval, Usuário Externo**, em 21/02/2020, às 12:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1750189** e o código CRC **22D81751**.

---

*À comunidade científica,  
Ofereço.*

*À minha família,  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primordialmente a Deus pelo dom da minha vida. Por me fortalecer com saúde, sabedoria, resiliência e fé. Por me fazer acreditar e lutar pelos meus sonhos, me permitindo chegar até aqui.

À minha pequena Cecília, minha filha, luz dos meus olhos! Um amor tão incondicional que me faz seguir adiante com um simples sorriso.

Ao meu esposo Célio, pelo amor, dedicação, compreensão e por ser companheiro em todos os momentos.

Aos meus pais José e Nilza, pelas silenciosas orações e amor, meu refúgio nas horas difíceis.

Aos meus irmãos Rodrigo e Ana Cláudia, às minhas cunhadas Fernanda e Priscila, à minha afilhada Beatriz, aos meus sogros Sônia e Osvaldo e ao meu primo Lucas, pelo afeto e torcida, me dizendo sempre que tudo daria certo.

À minha madrinha Nilda, que me incentiva a seguir em frente com seu exemplo constante de superação e força.

À minha coorientadora, professora Nilvanira Donizete Tebaldi, pela amizade durante todos esses anos de convivência. Por me ensinar com esmero tudo que sei de fitobacteriologia. Pela orientação com paciência e amor que sempre demonstrou durante a execução desta pesquisa.

Ao meu orientador, professor José Magno Queiroz Luz, pela orientação, motivação e financiamento da pesquisa, sempre expressando entusiasmo em cada etapa realizada e vendo o lado bom de tudo.

Aos mestres que tive durante a Pós-Graduação, pelos ensinamentos que serão levados por toda minha vida. Em especial, agradeço à Professora Ana Paula Oliveira Nogueira, pela ajuda nas análises estatísticas e ao Professor Alison Talis Martins Lima, pelos esclarecimentos sobre as análises moleculares.

Às minhas amigas e colegas de Pós-graduação, em especial, Nayara, Morgana, Solange, Luciana e Raquel, pelas horas de estudos compartilhadas e companhia em vários momentos, alegrando sempre os meus dias.

Aos colegas de trabalho e amigos do ICIAG, em especial, à Sandra, Auxiliadora, Júlia, Iara e ao Roberto, que sempre me apoiam, fazem com que problemas cotidianos fiquem mais leves e contribuem para que eu trabalhe cercada de boas energias, amor e amizade.

Aos meus professores da graduação, Bruno Sérgio Veira e Everaldo Antônio Lopes, que me inseriram na área da Fitopatologia, me mostrando novos caminhos e acreditando que eu seria capaz de um dia ser uma pesquisadora. Terei eterna gratidão e carinho por vocês que mudaram os rumos da minha vida como profissional.

Aos técnicos e alunos do Instituto de Biotecnologia, em especial, à Natassia, Luciana, Jéssica e Patrícia, pelos esclarecimentos e ajuda na realização das análises moleculares.

À Fundação de Apoio Universitário, pelo financiamento do sequenciamento genético, permitindo a conclusão da pesquisa.

Enfim, agradeço a todos familiares e amigos que sempre acreditaram que esse dia chegaria e que de alguma maneira contribuíram, seja com ensinamentos, torcida, carinho e, sobretudo, com orações! Muito obrigada!



“Concedei-me senhor,  
Serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar,  
Coragem para modificar as que posso e  
Sabedoria para distinguir umas das outras.”

*Oração da serenidade*  
Reinhold Niebuhr

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. do tomateiro, da haste ou da folha, provenientes de diferentes locais. Uberlândia - MG, 2020. ....	97
<b>Tabela 2.</b> Isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. testados no experimento de agressividade na haste do tomateiro. Uberlândia - MG, 2020. ....	99
<b>Tabela 3.</b> Isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. testados no experimento de agressividade na folha do tomateiro. Uberlândia - MG, 2020. ....	101
<b>Tabela 4.</b> Caracterização morfológica de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. do tomateiro. Uberlândia - MG, 2020. ....	102
<b>Tabela 5.</b> Caracterização bioquímica pelos testes de King B e LOPAT de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. do tomateiro de acordo com Lelliot & Stead (1987) e Schaad et al. (2001). Uberlândia - MG, 2020. ....	105
<b>Tabela 6.</b> Resultado do sequenciamento genético da região 16S de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. do tomateiro. Uberlândia - MG, 2020. ....	108
<b>Tabela 7.</b> Classificação de biovares de <i>P. putida</i> e <i>P. fluorescens</i> pela liquefação da gelatina e produção de ácidos a partir de diferentes fontes de carbono, de acordo com Dimartino et al. (2011). Uberlândia - MG, 2020. ....	112
<b>Tabela 8.</b> Comprimento da necrose na haste de tomateiro (mm) aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. Uberlândia - MG, 2020. ....	114
<b>Tabela 9.</b> Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) na haste de tomateiro após a inoculação de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. Uberlândia-MG, 2020. ....	116
<b>Tabela 10.</b> Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) na folha do tomateiro após a inoculação de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. Uberlândia - MG, 2020. ....	118

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sintomas de necrose da medula no tomateiro e formação de raízes adventícias ocasionada por *Pseudomonas* spp. A - Isolado UFU H5 e B - UFU H6..... 119
- Figura 2.** Variação morfológica de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro em meio de cultura 523..... 119
- Figura 3.** Agrupamento pelo método UPGMA de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro pelos testes bioquímicos, King B e LOPAT..... 120
- Figura 4.** Agrupamento pelo método UPGMA de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro utilizando os primers REP1R e REP2R..... 121
- Figura 5.** Agrupamento pelo método UPGMA de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro utilizando os primers ERIC1R e ERIC2..... 122
- Figura 6.** Agrupamento pelo método UPGMA de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro utilizando o primer BOX AR1. .... 123
- Figura 7.** Agrupamento pelo método UPGMA de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro por rep-PCR (REP, ERIC e BOX-PCR)..... 124
- Figura 8.** Evolução da necrose da haste no tomateiro, aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação com *Pseudomonas* sp., isolado UFU G5. .... 125
- Figura 9.** Necrose na medula do tomateiro, aos 30 dias após inoculação com *Pseudomonas* spp. A), isolados UFU H24; B) UFU H25 e C) UFU G143..... 125
- Figura 10.** Necrose na haste no tomateiro visualizada sob microscópio estereoscópio (40x), aos 20 dias após a inoculação com *Pseudomonas* spp. A) Isolados UFU H24 e B) UFU H25. .... 126
- Figura 11.** Sintomas externos no tomateiro aos 20 dias após a inoculação com *Pseudomonas* sp. isolado UFU H24. A- rachadura externa e secamento da haste; B- murcha da planta nas horas mais quentes do dia..... 126
- Figura 12.** Sintomas foliares na face adaxial da folha do tomateiro, aos 15 dias após a inoculação com *Pseudomonas* sp., isolado UFU E36. .... 127
- Figura 13.** Sintomas foliares na face abaxial e no pedúnculo da folha do tomateiro, aos 18 dias após a inoculação com *Pseudomonas* sp., isolado UFU E36..... 127

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
2.1 Cultura do tomate .....	17
2.2 Fitobacterioses na cultura do tomate .....	17
2.2.1 Espécies do gênero <i>Pseudomonas</i> spp. no tomateiro .....	18
2.2.1.1 Condições favoráveis e controle de <i>Pseudomonas</i> spp. no tomateiro .....	20
2.3 Caracterização morfológica de isolados do gênero <i>Pseudomonas</i> spp. ....	20
2.4 Caracterização fisiológica, nutricional e bioquímica de isolados do gênero <i>Pseudomonas</i> spp. ....	21
2.5 Caracterização molecular de fitobactérias .....	22
2.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase para estudos de diversidade genética .....	23
2.5.2 Sequenciamento gênico de fitobactérias .....	25
2.6 Agressividade de fitobactérias .....	28
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>43</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
4.1 Objetivos gerais .....	44
4.2 Objetivos específicos .....	44
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>45</b>
<b>Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. do tomateiro tutorado no Brasil .....</b>	<b>46</b>
RESUMO .....	47
Palavras-chave .....	49
ABSTRACT .....	50
Keywords .....	51
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>54</b>
Obtenção dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	54
Caracterização morfológica dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	55
Caracterização bioquímica dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	55

Patogenicidade dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	56
Extração de DNA dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	56
Reação em Cadeia da Polimerase para diversidade genética dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	57
Reação em Cadeia da Polimerase com primers específicos para <i>Pseudomonas</i> spp. ....	58
Sequenciamento gênico da região 16S dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	60
Testes bioquímicos para determinação de biovares dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	60
Teste de agressividade dos isolados dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	61
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>62</b>
Caracterização morfológica dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	62
Caracterização bioquímica dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	63
Patogenicidade dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	64
Reação em Cadeia da Polimerase para diversidade genética dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	64
Sequenciamento gênico da região 16S dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	66
Testes bioquímicos para determinação de biovares dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	67
Teste de agressividade dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	68
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>
APÊNDICE A - Chave de identificação de gênero de bactérias fitopatogênicas (Adaptado de Schaad et al., 2001).....	128
APÊNDICE B - Agrupamento de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes pelo teste de LOPAT (Lelliott & Stead, 1987).....	129
APÊNDICE C - Identificação de bactérias fitopatogênicas do gênero <i>Pseudomonas</i> baseados em testes bioquímicos LOPAT (Schaad et al., 2001).....	130
APÊNDICE D - Testes para diferenciação de biovares de <i>P. putida</i> e <i>P. fluorescens</i> no tomateiro. (Dimartino et al.,2011).....	131
APÊNDICE E - Meios de cultura.....	133
APÊNDICE F - Testes.....	139
ANEXO A - Normas para publicação no periódico Tropical Plant Pathology.....	141

## RESUMO

MOTA, L. C. B. M. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro tutorado no Brasil.** 2020. 148 f. Tese. (Doutorado em Agronomia / Fitotecnia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.<sup>1</sup>

A incidência de bacterioses ocasionadas pelas bactérias do gênero *Pseudomonas* causam perdas consideráveis na produtividade no tomateiro. Esse gênero possui populações de isolados com grande diversidade genética, o que pode influenciar diretamente no nível de agressividade do patógeno. O objetivo deste trabalho foi caracterizar 43 isolados de *Pseudomonas* spp. obtidos de amostras de hastes ou folhas de tomateiro com sintomas de necrose da medula ou lesões foliares, respectivamente, quanto à aspectos fenotípicos e genotípicos. Os isolados bacterianos foram caracterizados morfológica e bioquimicamente pelos testes de Gram, crescimento anaeróbico, meio King B e testes LOPAT. A análise molecular foi realizada por rep-PCR (iniciadores REP, ERIC e BOX), iniciadores específicos e sequenciamento genético da região 16S de parte dos isolados. Para avaliar a agressividade, foram conduzidos dois experimentos, um com os isolados provenientes da haste e outro da folha do tomateiro. Em ambos os experimentos as plantas sadias de tomate cv. Santa Clara VF5600 foram inoculadas com suspensão bacteriana na concentração  $1,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, sendo avaliada a severidade da doença com escala diagramática e calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença. Quanto à morfologia, todas as colônias foram circulares e brilhantes, a maioria transparente e com bordas lisas. A elevação variou entre reta, levemente elevada e convexa, e a coloração em nuances de cor palha. Bioquimicamente, os isolados foram classificados nos grupos II, IVb, Va e Vb dos testes LOPAT, um isolado como *P. corrugata* e dois isolados bioquimicamente não determinados. Molecularmente, apresentaram grande diversidade genética por rep-PCR, não sendo possível relacionar as características moleculares com o local de origem. Com os iniciadores específicos apenas o isolado UFU B39 foi identificado como *P. corrugata*. No sequenciamento genético foi possível confirmar a identidade de vários isolados como sendo *P. putida* e *P. fluorescens*, bem como *P. syringae* pv. *tomato*, os quais apresentaram variação bioquímica. Nos testes de agressividade na haste os isolados UFU B39 e UFU H24 foram os mais agressivos, enquanto nos testes de folha não foi observada diferença na agressividade dos isolados. Dessa forma, conclui-se que os isolados apresentaram pouca variação morfológica, muita variação bioquímica e molecular e diferentes níveis de agressividade na haste. Este é o primeiro relato de *P. putida* e *P. fluorescens* causando doença no tomateiro tutorado no Brasil.

**Palavras-chave:** *Solanum lycopersicum* L. Diversidade genética. Necrose da medula. Pinta bacteriana. Queima das folhas.

---

<sup>1</sup> Comitê orientador: Dr. José Magno Queiroz Luz –UFU (Orientador) e Dr.<sup>a</sup> Nilvanira Donizete Tebaldi –UFU

## ABSTRACT

MOTA, L. C. B. M. **Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolates from staked tomato in Brazil.** 2020. (Doctor's Degree in Agronomy / Crop Science)- Federal University of Uberlândia, Uberlândia.<sup>2</sup>

The bacterial incidence caused by the bacteria genus *Pseudomonas* cause considerable losses in tomato yield. This genus has population the isolates with great genetic diversity, it can directly influence the pathogen aggressiveness level. The objective of this work was to characterize 43 isolates of *Pseudomonas* spp. obtained from samples of tomato stems or leaves with symptoms of pith necrosis or leaf lesions, respectively, regarding phenotypic and genotypic aspects. Bacterial isolates were morphological and biochemically characterized by Gram tests, anaerobic growth, King B medium and LOPAT tests. Molecular analysis was performed by rep-PCR (REP, ERIC and BOX primers), specific primers and genetic sequencing of the 16S region of from isolates part. To evaluate aggressiveness, two assays were conducted, one using the isolates from the stem and the another from the tomato leaf. In both experiments healthy tomato plants cv. Santa Clara VF5600 were inoculated with bacterial suspension at a concentration  $1.0 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>, and the severity of the disease was evaluated and the Area Under The Disease Progression Curve calculated. Morfologically, all colonies were circular and bright, most then of transparent and with smooth edges. The elevation varied between straight, slightly elevated and convex, and the coloration in shades of straw color. Biochemically, the isolates were classified into groups II, IVb, Va and Vb the LOPAT tests, one isolate as *P. corrugata* and two biochemically undetermined isolates. Molecularly the isolates shoud high genetic diversity by rep-PCR, and it was not possible to relate the molecular characteristics with the place of origin. With the specific primers only the UFU B39 isolate was identified as *P. corrugata*. Genetic sequencing confirmed the identified of several isolates such as *P. putida* and *P. fluorescens*, and also *P. syringae* pv. *tomato* that presented biochemical variation. In the aggressiveness tests in the stem, the isolates UFU B39 and UFU H24 were the most aggressive, and in the leaf test there was no difference in the isolates aggressiveness. It was concluded that the isolates showed low morfological variation, high biochemical and molecular variation and different levels of stem aggressiveness. This is the first report of *P. putida* and *P. fluorescens* causing disease in staked tomato plants in Brazil.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L. Bacterial speck. Genetical diversity. Leaf blight. Pith necrosis.

---

<sup>2</sup> Supervising Committee: Dr. José Magno Queiroz Luz –UFU (Major Professor) e Dr.<sup>a</sup> Nilvanira Donizete Tebaldi –UFU.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é a segunda olerícola mais cultivada no mundo, tendo grande valor socioeconômico no Brasil. Devido às variações climáticas das regiões onde é produzida, as formas de condução da cultura, dentre outros fatores, mais de 200 doenças bióticas e abióticas já foram relatadas em todo mundo, resultando em diminuição significativa da produtividade (KROSS et al., 2001; PARADELA et al., 2001).

Nesse contexto, as bactérias fitopatogênicas têm grande importância na cultura do tomate por limitarem a produção, dentre esses patógenos está o gênero *Pseudomonas* Migula (SILVA JÚNIOR et al., 2009). No Brasil já foram relatadas no tomateiro a ocorrência de doenças foliares ocasionadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye & Wilkie; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall; *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp e *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens. São relatadas também a ocorrência de necrose da medula causada por *Pseudomonas corrugata* Roberts & Scarlett, *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson e *Pseudomonas mediterranea* Catara et al. (BERIAM, 2007; QUEZADO-DUVAL et al., 2007; RODRIGUES et al., 2010; MONTEIRO et al., 2019). Os sintomas dessas bacterioses variam de acordo com a espécie ou patovar, sendo observados na parte aérea das plantas, incluindo folhas, hastes e frutos.

A identidade do patógeno é feita principalmente com caracterizações morfológicas e bioquímicas da bactéria (Lelliot; Stead, 1987; Schaad et al., 2001). No entanto, nem sempre são suficientes para determinar qual espécie ou patovar de *Pseudomonas* está ocasionando a enfermidade no tomateiro. Isso ocorre devido à grande diversidade genética das espécies, bem como a possibilidade do surgimento de novas espécies ou patovares antes não associados com a cultura. Visto isso, técnicas moleculares, baseadas na análise genômica, podem ser empregadas para avaliação da diversidade genética, relacionamento filogenético e evolucionário do gênero, bem como para variabilidade em nível intraespecífico.

Dentre os métodos moleculares, destaca-se a rep-PCR, técnica que corresponde coletivamente aos protocolos de REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, que pode ser utilizada para determinar a diversidade genética entre as espécies de *Pseudomonas* spp. Cada um desses protocolos refere-se à famílias de sequências de DNA repetitivas e altamente conservadas, e que estão dispersas no genoma de diversas espécies bacterianas (VERSALOVIC et al., 1991; VERSALOVIC et al., 1994; SOUZA et al., 2006).



Por apresentar grande diversidade genética, isolados de espécies do gênero *Pseudomonas* possuem diferentes níveis de agressividade ao hospedeiro. A agressividade está associada à velocidade no aparecimento dos sintomas da doença, ou seja, quanto mais agressivo for determinado isolado, mais rápido será o aparecimento dos sintomas. Isso ocorre devido à diferenciação genética no nível geográfico das populações que são moldadas por diferentes pressões de seleção, dependendo do ambiente que se encontram, com variações no hospedeiro, habitat natural e práticas culturais (JAUNET; WANG, 1999; MICHEREFF, 2001; NAKATANI et al., 2009).

Por isso, o conhecimento da diversidade genética, baseada em caracterizações culturais, bioquímicas e moleculares permite identificar e agrupar isolados do gênero *Pseudomonas* em espécies e/ou patovares, bem como entender os mecanismos de patogenicidade. Isso é de suma importância nos programas de melhoramento genético do tomateiro e manejo integrado da doença, visto que diferentes níveis de agressividade são observados, com perdas consideráveis na produtividade da cultura.

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo caracterizar quanto à aspectos fenotípicos e genotípicos, isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro tutorado no Brasil.

## **CAPÍTULO 1**

### **REFERENCIAL TEÓRICO**

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cultura do tomate

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à ordem Solanales, família Solanaceae e ao gênero *Solanum* (FILGUEIRA, 2013). É nativo da região andina que abrange parte do Chile, Colômbia, Equador, Bolívia e Peru, mas sua ampla domesticação ocorreu no México, seu centro de origem secundário (SANTOS, 2009).

O tomate é a segunda olerícola mais cultivada no mundo, sendo superada apenas pela batata, e junto com a cebola e o alho são os alimentos mais industrializados (FILGUEIRA, 2013). É uma das culturas mais importantes, não apenas em produção, mas também em valor socioeconômico (KROSS et al., 2001).

A safra mundial de tomate em 2017 totalizou 182,30 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 4,84 milhões de hectares com rendimento médio de 37,66 t ha<sup>-1</sup>. O maior produtor mundial de tomate é a China (32,64%), seguida pela Índia (11,35%), Turquia (6,99%) e Estados Unidos (5,98%). O Brasil é o décimo maior produtor mundial, sendo que na safra de 2017 representou 2,30% dessa produção, com área cultivada de 61,53 mil hectares, alcançando o volume de 4,23 milhões de toneladas, porém com rendimento médio de 68,74 t ha<sup>-1</sup>, valor 82,52% superior à média mundial (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2019).

No Brasil o tomateiro é cultivado praticamente em todo território nacional, mas sua produção destaca-se nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, que representam 27,06% da produção. Os Estados com maior participação na produção nacional são Goiás (26%), São Paulo (20,15%) e Minas Gerais (18,79%) (IBGE, 2016). Desta produção, 70% são destinados ao consumo *in natura* e o restante é matéria prima para indústria na produção de diversos produtos como molho, pastas, sucos e outros derivados (MAKISHIMA; MELO, 2005).

### 2.2 Fitobacterioses na cultura do tomate

Devido às variações climáticas das regiões onde o tomate é produzido, bem como as diferentes formas de condução da cultura, entre outros fatores, já foram relatadas em todo mundo mais de 200 doenças provocadas por agentes bióticos e abióticos na cultura do tomate,

contribuindo para uma representativa diminuição da produtividade (PARADELA et al., 2001).

As bactérias fitopatogênicas assumem especial importância na cultura do tomate, podendo se tornar limitantes à produção. Dentre as doenças bacterianas que afetam a cultura no Brasil foram relatadas a ocorrência de: *Rhizobium radiobacter* (Beijerinck e van Delden) Young (sin. *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck e van Delden) Conn), *Dickeya chrysanthemi* (Burkholder et al.) Samson et al., *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al., *Pectobacterium* spp. (Jones) Waldee, *Xanthomonas* spp. (Bergey) Dowson e *Pseudomonas* spp. (PARADELA et al., 2001; MALAVOLTA JÚNIOR et al., 2002; BERIAM, 2007; MALAVOLTA JÚNIOR et al., 2008).

### 2.2.1 Espécies do gênero *Pseudomonas* spp. no tomateiro

Diversas espécies fluorescentes do gênero *Pseudomonas* spp. foram descritas no tomateiro em todo mundo. Dentre as doenças foliares de maior importância para a cultura, está a pinta bacteriana ocasionada por *P. syringae* pv. *tomato* (OKABE, 1933 apud FACKRELL; SINHA, 1983). Outra doença encontrada no tomateiro é a queima bacteriana nas folhas causada por *P. syringae* pv. *syringae*, *P. cichorri* (PEREZ, 1984), *P. marginalis* pv. *marginalis* (LELLIOTT; STEAD, 1987; KARATSU et al., 1995) e *P. viridiflava* (LELLIOTT; STEAD, 1987).

No Brasil já foram relatadas a ocorrência da pinta bacteriana causada por *P. syringae* pv. *tomato* nos estados do Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Roraima e São Paulo (BERIAM, 2007). A doença também conhecida como mancha bacteriana pequena ou pústula bacteriana nas folhas ocasiona sintomas de lesões necróticas, circulares ou irregulares, de coloração pardo-escura a preta com halo amarelado nas folhas e frutos. Com a evolução da doença as lesões coalescem, causando a seca dos folíolos. O caule e os pedúnculos também podem apresentar manchas escuras e provocar a queda de flores e frutos (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Para a espécie *P. syringae* pv. *tomato* são relatadas a ocorrência de duas raças, a raça 0 e a raça 1 (LAWTON; MACNEILL, 1986).

De ocorrência mais esporádica que a pinta bacteriana, a queima bacteriana já foi relatada no Brasil (BERIAM, 2007). A doença apresenta como sintomas lesões necróticas circulares ou irregulares nos folíolos, maiores que a pinta bacteriana, sendo o halo amarelo

pouco acentuado. É observada também intensa necrose nos bordos dos folíolos, sendo as folhas mais velhas e intermediárias as mais atacadas (KIMATI et al., 2005). A queima bacteriana foi relatada pela primeira vez na região de Patos de Minas - MG, em 1993, ocasionada por *P. syringae* pv. *syringae*. (ALMEIDA et al., 1994; MARINGONI et al., 1994). A espécie *P. cichorii* também foi relatada em 2007, em campos comerciais de tomateiro, nas cidades de Bragança Paulista e Mogi Guaçu – SP. Essa descoberta aconteceu após constatarem que se tratava de uma doença que causava queima generalizada nas folhas, mas que não se enquadrava nos sintomas de doenças bacterianas típicas causadas por *P. syringae* pv. *tomato* (SILVA JÚNIOR, 2007; SILVA JÚNIOR et al., 2009). Posteriormente, a espécie também foi relatada nos estados do Ceará em tomate tutorado e em Goiás em tomate rasteiro (QUEZADO-DUVAL et al., 2013).

Várias espécies fluorescentes do gênero *Pseudomonas* spp. podem ocasionar a necrose da medula em tomateiro, outra doença de grande importância para a cultura. A espécie *P. cichorii* também foi relatada causando a doença (WILKIE; DYE, 1974; TRANTAS et al., 2013), bem como *P. marginalis* (BELLA; CATARA, 2010; KUDELA et al., 2010) e *P. viridiflava* (ALIVIZATOS, 1986; MALATHRAKIS, GOUMAS, 1987; ALIPPI et al. 2003; AYSAN; UYGUR, 2005). Outras espécies descritas são: *Pseudomonas fluorescens* Migula (MALATHRAKIS; GOUMAS, 1987; LO CANTORE; IACOBELLIS, 2002; SAYGILI et al., 2004; POLIZZI et al., 2007), *Pseudomonas mediterranea* (CATARA et al. 2002; PENTARI et al., 2012; TRANTAS et al., 2015), *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula (POLIZZI et al., 2007; DIMARTINO et al., 2011) e *Pseudomonas citronellolis* Seubert (AIELLO et al., 2013) e *Pseudomonas protegens* Ramette (AIELLO et al., 2017).

Algumas espécies de *Pseudomonas* não fluorescentes também causam necrose da medula em tomateiro, sendo relatadas as espécies *P. corrugata* (SCARLETT et al., 1978; CLARK; WATSON, 1986) e *Pseudomonas straminea* Iizuka & Komagata (AIELLO et al., 2013).

No Brasil foi relatada a ocorrência de necrose da medula do tomateiro ocasionada por *P. corrugata* em 1989, em São Paulo (RODRIGUES NETO et al., 1989); em 1990, no Rio Grande do Sul (MARTINS et al., 1990) e em 2007, no estado de Goiás (QUEZADO-DUVAL et al., 2007). Também foi relatada a presença de *P. mediterranea* no estado de São Paulo (RODRIGUES et al., 2010) e *P. viridiflava* em Santa Catarina (MONTEIRO et al., 2019). A necrose da medula no tomateiro apresenta sintomas de descoloração, necrose da medula e tecidos vasculares, associadas ao amarelecimento das folhas, murcha e morte prematura das plantas (TRANTAS et al., 2013).

### 2.2.1.1 Condições favoráveis e controle de *Pseudomonas* spp. no tomateiro

A incidência de *Pseudomonas* spp. no tomateiro é favorecida por condições amenas com temperaturas de 20 a 25°C e alta umidade relativa do ar. A sobrevivência de espécies de *Pseudomonas* spp. como epífitas em plantas de tomate assintomáticas, restos culturais, plantas daninhas, outras culturas hospedeiras, solo ou água de irrigação é um fator que dificulta o controle com métodos culturais (SILVA; LOPES, 1995; KIMATI, 2005; JI et al., 2006).

Nesse sentido as estratégias para controle de doenças bacterianas ocasionadas por espécies do gênero *Pseudomonas* spp. são limitadas. As práticas culturais não fornecem controle satisfatório de doenças e geralmente não são adotadas pelos produtores comerciais. Em relação à aplicação de produtos, poucos são registrados para o controle químico de bacterioses em tomate, sendo muito utilizados no campo compostos à base de cobre (oxiclureto de cobre) (JI et al., 2006; CLEMENTE; BOITEUX, 2012).

Para controle da pinta bacteriana, cultivares resistentes podem ser empregadas por possuírem o gene Pto que confere resistência a *P. syringae* pv. *tomato* raça 0, expressando o gene avrPto (MARTIN et al., 1993). No entanto, a ocorrência da raça 1 em isolados do patógeno sem o avrPto podem dificultar a liberação de Pto em cultivares comerciais. No Brasil, a maioria das cultivares de tomate para processamento industrial apresentam resistência a este patógeno conferida pelo gene Pto (JI et al., 2006).

## 2.3 Caracterização morfológica de isolados do gênero *Pseudomonas* spp.

Após obtenção da colônia bacteriana individualizada, a caracterização morfológica das células bacterianas é estudada por meio da observação visual ou ao microscópio óptico, uso de colorações, e as observações comumente feitas são: tamanho, forma, arranjo, flagelação, presença de esporos, presença de cápsula, grânulos de substância de reserva e reação de Gram (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

Dessa forma, na caracterização morfológica é observada as colônias bacterianas individualizadas em tubos ou em placas de Petri, em meio de cultura. Nos tubos com colônia em estria podem ser observadas: quantidade de crescimento, margem ou bordos, consistência e cromogênese. Em placas de Petri, mais rotineiramente utilizado, podem ser observados: tamanho, cor, forma, bordos ou margem, elevação, textura ou consistência, pigmentação ou cromogênese e detalhes ópticos (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

Morfologicamente o gênero *Pseudomonas* apresenta colônias circulares, com bordas lisas, levemente elevada, opacas, brilhantes e de coloração branco-palha, podendo ocorrer variações dentro do gênero ou mesmo em espécies. A caracterização morfológica é uma etapa fundamental na confirmação identidade da bactéria isolada em meio de cultura, pois cada gênero de fitobactéria tem características culturais específicas (SCHAAD et al., 2001; MARIANO; SILVEIRA, 2005).

#### **2.4 Caracterização fisiológica, nutricional e bioquímica de isolados do gênero *Pseudomonas* spp.**

A caracterização fisiológica dos isolados bacterianos é baseada na utilização ou não de oxigênio, na temperatura e no pH necessário para o crescimento em meio de cultura. A caracterização nutricional é baseada no uso de compostos como CO<sub>2</sub>, aminoácidos, fontes de carbono, de nitrogênio, entre outras. E as bioquímicas na liquefação da gelatina, redução de nitratos, fermentação de carboidratos, entre outras (MARIANO; SILVEIRA, 2005). Baseados em todos esses testes, Schaad et al. (2001) apresentaram uma chave de identificação de gêneros de bactérias fitopatogênicas (Apêndice A). Diante disso, o gênero *Pseudomonas* é caracterizado como bactérias Gram negativas, crescimento anaeróbico negativo e fluorescimento positivo em meio de cultura King B (KING et al., 1954 apud MALATHRAKIS; GOUMAS, 1987) (Apêndice E), com exceção de *P. corrugata* e *P. straminea* (AIELLO et al., 2013).

Nesse contexto, Lelliott e Stead (1987) propuseram a classificação de espécies de *Pseudomonas* fluorescentes, incluindo espécies saprofíticas, em oito grupos de acordo com o Apêndice B. A identificação das espécies é baseada principalmente nos testes LOPAT, que incluem a produção de levana em meio com sacarose, reação de oxidase, atividade pectolítica em discos de batata, atividade de arginina dihidrolase e a reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de fumo (Apêndices E e F). Incluem-se também características confirmatórias com os testes de produção de 2-ketoglucanato, reação da gema de ovo, redução do nitrato e produção de ácido a partir da sacarose.

Além da chave de identificação de gêneros de fitobactérias (Apêndice A), Schaad et al. (2001) também relataram testes bioquímicos LOPAT, para identificação de espécies de *Pseudomonas* fitopatogênicas, incluindo além das espécies descritas por Lelliott e Stead

(1987), as espécies de *Pseudomonas fuscovaginae* (ex Tanii et al.) Miyajima et al. e *P. corrugata* (Apêndice C).

Quando comparado os testes propostos por Lelliott e Stead (1987) (Apêndice B) e Schaad et al. (2001) (Apêndice C), observa-se variação dos resultados de HR para *P. marginalis*; teste de arginina dihidrolase para *Pseudomonas tolaasii* Paine e atividade pectolítica para *Pseudomonas savastanoi* (Janse) Gardan et al. (sin. *P. syringae* subsp. *savastanoi*). É importante ressaltar que existem variações dos isolados testados dentre as espécies e que as reações positivas ou negativas para os testes bioquímicos supracitados representam cerca de 80% dos resultados para os isolados testados, conforme mencionado por Schaad et al. (2001).

Sendo assim, as espécies *P. fluorescens* e *P. putida*, anteriormente tidas apenas como bactérias saprófitas habitantes do solo (LELLIOTT; STEAD, 1987), foram caracterizadas como bactéria fitopatogênica causando necrose da medula na haste do tomateiro (POLIZZI et al., 2007). Nesse sentido, Dimartino et al. (2011) descreveram vários testes bioquímicos para identificação das espécies e biovars de *P. fluorescens* e *P. putida* no tomateiro (Apêndice D).

## 2.5 Caracterização molecular de fitobactérias

Para a caracterização de bactérias fitopatogênicas, além de características morfológicas e bioquímicas, várias técnicas moleculares têm sido usadas, principalmente com o avanço da biotecnologia, em procedimentos de detecção e caracterização do patógeno.

As técnicas moleculares, baseadas na análise genômica, são métodos rápidos, simples e reprodutíveis que têm sido empregados para avaliação da diversidade genética de fitobactérias. Dentre esses métodos destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR é uma técnica mais simples, de baixo custo e que proporciona resultados rápidos. A metodologia com diferentes grupos de iniciadores, aleatórios e/ou degenerados, os chamados primers, são empregados para amplificar regiões do DNA, produzindo um padrão de bandeamento. Polimorfismos no padrão de bandas possibilitam o agrupamento de amostras idênticas ou similares e a diferenciação daquelas não relacionadas (BEDENDO; PIGNATARI, 2002).

Para a amplificação é necessário conhecimento prévio da sequência alvo ou, pelo menos, parte dela, pois dois primers são utilizados para definir de forma específica o fragmento a ser amplificado. Os primers funcionam como os iniciadores da reação de



polimerização, se anelando especificamente às suas sequências complementares na fita molde, e delimitando o fragmento de DNA que se deseja amplificar em uma reação com repetitivos ciclos de temperatura previamente definidos, na presença de bases nitrogenadas e da enzima Taq DNA polimerase (SILVA-PEREIRA, 2003; FERNANDES, 2005).

Existem recomendações específicas para construção de primers, tais como: tamanho entre 18 e 24 bases para minimizar anelamentos inespecíficos; relação de 40 a 60% entre purinas e pirimidinas para maximizar a especificidade da reação, evitando concentrações inferiores a 50% de Guanina/Citosina (G/C), para não prejudicar o cálculo da temperatura de anelamento; sequência com maior concentração G/C na extremidade 5' e menor concentração na porção 3'; evitar trincas de bases repetidas; evitar complementaridade inter e intramolecular, principalmente na extremidade 3', a fim de impedir formação de estruturas secundárias, como a ocorrência de dímeros; arranjo de bases que permita temperatura de anelamento entre 52 °C e 65 °C (FERNANDES, 2005).

### **2.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase para estudos de diversidade genética**

Várias técnicas moleculares são utilizadas em estudos da diversidade genética de isolados bacterianos, dentre elas a rep-PCR. Essa técnica corresponde coletivamente aos protocolos das técnicas de REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR. Cada uma das técnicas referem-se à famílias de sequências de DNA repetitivas e altamente conservadas, que estão dispersas no genoma de diversas espécies bacterianas (VERSALOVIC et al., 1991; VERSALOVIC et al., 1994; SOUZA et al., 2006).

A família de sequência de DNA REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) foi estudada por Stern et al. em 1984, ao descreverem uma sequência de nucleotídeos notavelmente conservada de cerca de 1% dos genomas de *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers e *Salmonella typhimurium* (Loeffler) Castellani & Chalmers. A sequência tem cerca de 35 nucleotídeos de comprimento, inclui uma repetição invertida e pode ocorrer isoladamente ou em múltiplas cópias adjacentes. Para isso, são usadas as sequências REP1R e REP2R.

A técnica de ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) foi descrita por Hulton et al. em 1991. Os autores descreverem uma família de sequências altamente conservadas, das quais 14 foram identificadas em *E. coli* e *S. typhimurium* e outras três em outras espécies de enterobactérias (*Yersinia pseudotuberculosis* (Pfiffer) Smith & Thal, *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan e *Vibrio cholerae* Pacini). As sequências

ERIC têm 126 pb de comprimento e estão restritas às regiões transcritas do genoma. As sequências ERIC são altamente conservadas ao nível da sequência de nucleotídeos, mas as suas localizações cromossômicas diferem entre as espécies. Várias características das sequências ERIC assemelham-se às sequências REP (STERN et al., 1984), embora a sequência nucleotídica seja inteiramente diferente. São usados os primers: ERIC1R e ERIC2.

O BOX-PCR (BOX element) foi descrito pela primeira vez em 1992 por Martin et al. Os autores relataram a descoberta de um grupo de sequências de DNA altamente conservadas localizadas, nos casos estudados, dentro de regiões intergênicas do cromossomo da bactéria Gram positiva *Streptococcus pneumoniae* (Klein) Chester. O genoma do *S. pneumoniae* contém cerca de 25 destes elementos chamados BOX. De 5' a 3', os elementos BOX são compostos de três subunidades (boxA, boxB e boxC) que têm 59, 45 e 50 nucleotídeos de comprimento, respectivamente. Esses elementos não estão relacionados com as duas famílias de sequências de DNA REP e ERIC. As sequências de BOX têm o potencial de formar estruturas de tronco-laço estáveis e uma delas, pelo menos, é transcrita. Para essa análise é usado o primer BOX A1R.

A utilização da técnica rep-PCR com esses iniciadores é um método reproduzível e confiável para estudos de relacionamento filogenético entre fitobactérias. Os produtos de amplificação podem mostrar um perfil de bandas específico a nível de espécie, sub-espécie, patovar ou mesmo de isolados (SOUZA et al., 2006). Versalovic et al. (1991), ao utilizarem esses iniciadores em várias espécies de bactérias, verificaram maior afinidade de hibridização dos oligonucleotídeos REP e ERIC para bactérias Gram negativas.

Essas técnicas têm sido utilizadas com sucesso em estudos de diversidade e variabilidade genéticas, bem como para identificação e classificação de diversas bactérias como *R. solanacearum* (SILVEIRA et al., 2005; COSTA et al., 2007), *Curtobacterium flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones (SOUZA et al., 2006), *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Amaral et al.) Young et al. (MACIEL et al., 2018). Os coeficientes de similaridade gerados entre os grupos refletem um provável relacionamento filogenético ou evolucionário, sendo a origem geográfica dos isolados a característica mais fortemente correlacionada (SILVEIRA et al., 2005).

A variabilidade genética de isolados de *R. solanacearum*, oriundos da cultura da batata no Rio Grande do Sul, foi verificada pelas técnicas de rep-PCR (ERIC e BOX) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), sendo diferenciadas as biovars 1 e 2 pelo primeiro método, porém sem variabilidade entre isolados. Já com RAPD foi possível a separação das

biovars, que apresentam um perfil característico dependente da região da qual os isolados foram obtidos (SILVEIRA et al., 2005).

A diversidade de isolados de *R. solanacearum* no tomateiro e de outros hospedeiros foi avaliada por Costa et al. (2007), que encontraram cinco grupos distintos com alto grau de polimorfismo entre os isolados, mas sem correlação entre hospedeiro de origem, biovar, ecossistema ou local de coleta quando comparados por BOX-PCR. Os autores não observaram nenhuma banda com os primers REP e ERIC ou, quando houve amplificação, as bandas foram de baixa intensidade.

Isolados de *C. flaccumfaciens* foram separados em quatro grupos distintos por rep-PCR, sendo a unidade repetitiva REP efetiva para poucos isolados, enquanto com ERIC obteve-se amplificação do DNA para a maioria dos isolados. No entanto, o número de padrões de bandas foi significativamente pequeno quando comparado aos oligonucleotídeos BOX, demonstrando, assim, a importância da utilização conjunta dos iniciadores REP, ERIC e BOX na avaliação da variabilidade genética de fitobactérias (SOUZA et al., 2006).

A variabilidade genética de isolados de *P. syringae* pv. *garcae* do café obtidos entre 1958 e 2011 em São Paulo, Minas Gerais e no Quênia foram avaliadas por rep-PCR. Os primers ERIC e REP-PCR separaram os isolados quenianos dos brasileiros, sendo possível agrupar também os isolados mais antigos (1958 a 1978) dos mais recentes, correlacionando-os com a região de origem e a altitude de cultivo (MACIEL et al., 2018).

Para algumas espécies de *Pseudomonas* do tomateiro primers específicos já foram desenhados. Para *P. corrugata* são utilizados os primers PC5/1 e PC5/2 (CATARA et al., 2000). Para *P. syringae* pv. *tomato*, os primers 1 e 2 (BERESWILL et al., 1994). Para *P. syringae* pv. *syringae*, primers PF e PR (HAMEDAN; HARIGHI, 2014). Para *P. putida*, os primers XylR-F1 e XylR-R1 (KUSKE et al., 1998). E para *P. fluorescens*, os primers 16SPSEfluF e 16SPSER (SCARPELLINI et al., 2004).

## 2.5.2 Sequenciamento gênico de fitobactérias

Os mecanismos genéticos pelos quais os agentes fitopatogênicos atacam seus hospedeiros são fundamentais nos estudos da patologia das plantas, que poderá ser compreendido pelo sequenciamento do genoma do patógeno. À medida que aumenta a disponibilidade do número de seqüências completas do genoma de um patógeno, sua comparação com outros patógenos torna-se uma abordagem poderosa para deduzir a

relevância e importância de genes e famílias de genes envolvidos em processos de patogenicidade (SLUYS et al., 2002).

Dessa forma, o alinhamento do genoma pode ser usado para identificar organismos que filogeneticamente não foram descritos e fornecer pistas importantes sobre evolução, revelando a conservação de grandes ordens de genes. Ao passo que mais genomas se tornam disponíveis, é possível associar genes específicos à bactérias que causam sintomas semelhantes, que possuem o mesmo hospedeiro ou que habitam o mesmo nicho. Com o sequenciamento genético completo é possível verificar o tamanho do genoma (número total de pares de bases- bp), tipo de cromossomo, presença ou não de plasmídeos, porcentagem de guanina e citosina, além da elucidação dos papéis funcionais dos genes associados à patogênese (SLUYS et al., 2002).

A primeira sequência completa do genoma de uma fitobactéria foi publicada em 2000 por Simpson et al., tratando-se da bactéria *Xylella fastidiosa* Wells et al. estirpe 9a5C, agente causal da clorose variegada de citros. As próximas sequências descritas foram referentes a simbiontes de plantas para fixação de nitrogênio, *Mesorhizobium loti* (Jarvis et al.) Jarvis et al. da flor de lótus (KANEKO et al., 2000) e *Sinorhizobium meliloti* (Dangeard) De Lajudie et al. isolado 1021 da alfafa (GALIBERT et al., 2001); em seguida *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn estirpe C58, agente causal da galha da coroa do tabaco (GOODNER et al., 2001); *R. solanacearum* estirpe GMI1000, agente causal da murcha bacteriana no tomateiro (SALANOUBAT et al., 2002), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Starr & Garces) (Hasse) Dye, agente causal da Clorose Variegada do Citros e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson, agente causal da podridão negra das crucíferas (SILVA et al., 2002).

Atualmente muitas outras fitobactérias já possuem seu genoma completo sequenciado no GenBank. O GenBank é um banco de dados onde são depositadas todas as seqüências de nucleotídeos publicamente disponíveis, possuindo acesso aberto. Este banco de dados é produzido e mantido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), localizado no National Institutes of Health (NIH), nos Estados Unidos (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2019).

Os estudos evolutivos de sequenciamento de genes ribossomais consistem também na amplificação parcial do gene ribossomal 16S (16S rRNA) utilizando iniciadores universais para este gene, conforme sugerido pelo comitê de sistemática bacteriana em 2002 (STACKEBRANDT et al., 2002). A comparação das seqüências de nucleotídeos do DNA na região que codifica o gene 16S rRNA é utilizada por ser considerada conservada entre as

bactérias, mas, ao mesmo tempo, com variabilidade e quantidade de informações suficientes para revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (WOESE; FOX, 1977 apud CARVALHO NETTO, 2007).

O sequenciamento genético pode identificar também a ocorrência de novas espécies e/ou patovares, ou infecção em novos hospedeiros. Para confirmar a identidade de *P. viridiflava* e *P. corrugata* como agentes causais da necrose da medula do tomateiro, Alippi et al. (2003), realizaram o sequenciamento genético, amplificando o gene 16S rRNA com os primers Y1 e Y2 (YOUNG et al., 1991). Foi verificada similaridade de 100% entre o isolado Pvir9 e o isolado de referência de *P. viridiflava* (Acesso GenBank PVZ76671), e similaridade de 99,54% para os isolados Pc23 e 100% para Pc22 e Pc27 em relação ao isolado de referência de *P. corrugata* (Acesso GenBank D84012).

Estudando a patogenicidade de *Xanthomonas perforans* Jones et al. isolado NCPPB 4321, agente causal da necrose da medula em tomateiro, na Itália, Aiello et al. (2013) utilizaram para o sequenciamento genético os primers 10f e 534r (MUYZER et al., 1993) para a amplificação do gene 16S rRNA, confirmando a identidade do patógeno.

O sequenciamento de genes específicos também tem contribuído para elucidação da evolução e patogenicidade de certas espécies. Há casos em que diferentes tipos de patovares afetam as mesmas espécies de plantas com sintomas semelhantes, devido à presença dos mesmos genes relacionados à patogenicidade, resultado da transferência horizontal de genes (SAWADA et al., 2002).

A análise filogenética de quatro genes (*gyrB*, *rpoD*, *hrpL* e *hrpS*) de 56 isolados pertencentes a 19 patovares de *P. syringae* feita por Sawada et al. (1999) mostrou que a espécie divergiu em pelo menos três grupos monofiléticos durante sua evolução. Os resultados sugeriram que o grupo de genes envolve a síntese de faseolotoxina, que pode ter sido transferida horizontalmente para os genomas dos patovares *actinidiae* e *phaseolicola*, associados ao kiwi e ao feijão, respectivamente, devido à faseolotoxina ser um fator de virulência que causa clorose e inibe a atividade enzimática nas plantas hospedeiras.

Sete genes de manutenção, dispersos no genoma de *P. syringae*, de diversos patovares e diferentes hospedeiros, foram sequenciados por Sequência de múltiplos locus (MLST), sendo identificadas 40 sequências únicas e revelando alta congruência, indicando uma história evolutiva comum. Sendo assim, foi possível inferir que a associação específica em relação ao hospedeiro dos patovares estudados ocorre por uma pequena variação genética (SARKAR; GUTTMAN, 2004).

Liu et al. (2016) identificaram a espécie *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (van Hall) Takikawa et al. em hospedeiros alternativos, encontrados nas proximidades de plantas de kiwi afetadas pela bactéria. Para isso, além de testes bioquímicos e ensaios específicos de PCR, foram feitas análise de sequência de genes efetores únicos e genes *cts*, *gapA*, *gyrB*, *pfke* e *rpoD* por MLST.

A análise de 124 isolados *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Janse) Gardan et al. (Psav), agente causal da tuberculose na oliveira, de 15 países por rep-PCR, resultou em 113 sequências distintas, agrupando-as em dois grupos e quatro subgrupos associados à origem geográfica dos isolados. Os genes *gapA*, *gltA*, *gyrB* e *rpoD* apresentaram variação, em que os isolados mais agressivos tiveram sequências com peso 10 vezes superior aos gerados pelos menos agressivos, sugerindo que a população de Psav é o resultado da expansão clonal de um único indivíduo e que as mudanças na virulência surgiram durante sua evolução (MORETTI et al., 2017).

## 2.6 Agressividade de fitobactérias

As populações de fitopatógenos são moldadas por diferentes pressões de seleção (direcional, estabilizadora ou disruptiva), dependendo do ambiente que se encontram, com variações no hospedeiro, habitat natural e práticas culturais. A diversidade do ambiente pode explicar a diferenciação genética no nível geográfico das populações, implicando de forma direta na agressividade dos isolados (JAUNET; WANG, 1999).

A agressividade é a resposta da interação do patógeno com a planta hospedeira, sendo normalmente avaliada de forma quantitativa. Nesse sentido, a agressividade está associada ao tempo no aparecimento dos sintomas da doença, ou seja, quanto mais agressivo for determinado isolado, mais rápido será o aparecimento dos sintomas. Estudos que correlacionem à variabilidade genética e a agressividade de isolados bacterianos são importantes na seleção dos isolados para testes de resistência genética e desenvolvimento de variedades resistentes (MICHEREFF, 2001; NAKATANI et al., 2009).

A avaliação da severidade da doença reflete o grau de susceptibilidade do hospedeiro e de agressividade do patógeno. Pode ser realizada através da utilização de chaves descritivas, de escalas diagramáticas e de análises de imagens com auxílio de programas computacionais específicos. Em avaliação de doenças foliares há predomínio de escalas diagramáticas, que são representações ilustradas de uma série de plantas ou partes de plantas com sintomas em

diferentes níveis de severidade. Estas escalas são utilizadas como principal ferramenta de avaliação da severidade de muitas doenças (AMORIM, 1995).

Após caracterização bioquímica e molecular por rep-PCR, Alippi et al. (2003) confirmaram a identidade de *P. corrugata*, *P. viridiflava* e *Pseudomonas* spp. causando necrose da medula em plantas de tomate e pimenta na Argentina. A patogenicidade dos isolados foi avaliada em tomateiro, pimenta, crisântemo e tabaco, sendo observados sintomas típicos de cavidades negras na medula em todos os hospedeiros, com exceção de *P. corrugata* que não produziu sintomas em crisântemo.

Natalini et al. (2006) encontraram variações na agressividade de *P. syringae* pv. *garcae* obtidas a partir de um pomar de pêra. Os isolados foram agrupados em quatro grupos distintos por BOX-PCR e os que possuíam o gene *syrB* foram os mais agressivos em testes de patogenicidade. Vicente e Roberts (2007) agruparam por rep-PCR a maioria dos isolados mais agressivos de *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (Wormald) Young et al. raça 1 oriundos de cerejeiras. Mirik et al. (2011) observaram que isolados de *P. cichorii*, obtidas a partir de alface, tomate e cheflera, eram mais agressivos aos hospedeiros dos quais haviam sido isolados, embora fossem patogênicos para todos os hospedeiros testados.

Confrontando a variabilidade genética com uso de marcadores moleculares RAPD e agressividade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye em maracujazeiro, Nakatani et al. (2009) agruparam os isolados em sete grupos distintos, não relacionados com o local de coleta. Nesse experimento, ocorreu maior variabilidade genética dentro das populações, demonstrando grande fluxo gênico entre isolados e diferenças na agressividade.

Por meio de BOX e ERIC-PCR, Rodrigues (2010) observou grande diversidade genética entre de isolados *R. solanacearum* provenientes de solanáceas, plantas ornamentais e eucalipto, sendo possível a distinção de biovars. Os isolados foram muito agressivos em plantas de batata e tomate, mas com baixa severidade da doença em fumo.

Após caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica de isolados do tomateiro como *P. fluorescens* e *P. putida*, Dimartino et al. (2011) avaliaram a patogenicidade e constataram a capacidade dos isolados de induzir descoloração vascular de plantas de tomate, porém sem clorose foliar e necrose. Trantas et al. (2013) caracterizaram bioquímica e molecularmente por BOX-PCR isolados de *P. cichorii* do tomateiro e por MLST os genes *gyrB*, *rpoD* e *rpoB*. Os autores verificaram a patogenicidade por inoculação foliar em berinjela, crisântemo e alface, e inoculação na haste do tomateiro, sendo mensurada a descoloração da medula a partir do ponto de inoculação. Em todos os isolados foram

observados sintomas idênticos, independentemente da planta hospedeira que foram inoculados.

Aiello et al. (2013) verificaram a patogenicidade de *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. marginalis*, *P. citronellolis*, *P. straminea*, *Pantoea agglomerans* (Beijerinck) Gavini et al. e *X. perforans* em tomateiro na Itália, causando sintomas de necrose da medula. Foram avaliados o comprimento da necrose da medula e a descoloração vascular, clorose e morte das folhas basais. Os tipos de sintomas foram variáveis, dependendo da espécie bacteriana testada, sendo os sintomas de *X. perforans* mais agressivos em relação às espécies de *Pseudomonas* spp.

Testes bioquímicos confirmaram a identidade de *P. syringae* pv. *syringae* como agente da necrose apical bacteriana em plantas de manga na Itália (AIELLO et al., 2015). A variabilidade genética dos isolados, avaliada por rep-PCR, foi distinta em relação aos isolados do mesmo patovar obtidos de outros hospedeiros, e os testes de patogenicidade realizados em vagens de feijão, frutos de limões, haste de tomate e brotos de manga mostraram diferentes tipos de sintomas, que variaram entre manchas escuras com margens avermelhadas, lesões necróticas profundas, murcha e manchas necróticas em feijão, limão, tomate e manga, respectivamente.

A associação de *Pseudomonas* spp. e *X. perforans*, causando necrose de medula de tomate, foi estudada por Aiello et al. (2017), que confirmaram a patogenicidade de *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. citronellolis* e *P. protegens*. Os autores mensuraram a necrose da medula e descoloração vascular, cujo comprimento foi variável dependendo do isolado testado. Além disso, as espécies de *Pseudomonas* aumentaram significativamente os sintomas de necrose e descoloração vascular quando co-inoculadas com *X. perforans*, sendo destacada a necessidade de avaliação cuidadosa dos agentes de controle biológico em procedimentos de triagem e antes da comercialização, a fim de evitar riscos de introdução de isolados que possam ser patogênicas em plantas de tomateiro.

A variabilidade de isolados de *P. syringae* pv. *garcae* do café foram avaliadas por ERIC-PCR, REP-PCR e divididos em quatro classes de agressividade. Entretanto, o agrupamento genético não mostrou correlação com a agressividade dos isolados (MACIEL et al., 2018).



## REFERÊNCIAS

- AIELLO, D.; FERRANTE, P.; VITALE, A.; POLIZZI, G.; SCORTICHINI, M.; CIRVILLERI, G. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from mango in Sicily and occurrence of copper-resistant strains. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 97, n. 2, p. 273-282, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I2.015>. Disponível em: <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3319>. Acesso em: 1 mar. 2018.
- AIELLO, D.; SCUDERI, G.; VITALE, A.; FIRRAO, G.; POLIZZI, G.; CIRVILLERI, G. A pith necrosis caused by *Xanthomonas perforans* on tomato plants. **European Journal of Plant Pathology**, Berlim, v. 137, p. 29-41, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0214-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10658-013-0214-7>. Acesso em: 18 mai 2019.
- AIELLO, D.; VITALE, A.; LA RUOTA, A. D.; POLIZZI, G.; CIRVILLERI, G. Synergistic interactions between *Pseudomonas* spp. and *Xanthomonas perforans* in enhancing tomato pith necrosis symptoms. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 99, n. 3, p. 731-740, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3957>. Disponível em: <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3957>. Acesso em: 24 mar. 2019.
- ALIPPI, A. M.; DAL BO, E.; RONCO, L. B.; LOPEZ, M. V.; LOPEZ, A. C.; AGUILAR, O. M. *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. **Plant Pathology**, Londres, v. 52, p. 287-302, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00850.x>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-3059.2003.00850.x>. Acesso em: 3 mar. 2018.
- ALIVIZATOS, A. S. Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas viridiflava*. **Annales de l'Institut phytopathologique Benaki**, Atenas, v. 15, p. 41-47, 1986.
- ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L. O. S. Ocorrência de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 20, n. 1, p. 47, 1994.
- AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 647-671.
- AYSAN, Y.; UYGUR, S. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava*, causal agent of pith necrosis of tomato, on weeds in Turkey. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 87, p. 135-139, 2005.
- BEDENDO, J.; PIGNATARI, A. C. C. Tipagem de *Enterococcus faecalis* por pulsed-field gradient gel electrophoresis e reação em cadeia da polimerase. **Revista Ciência, Cuidado e Saúde**, Maringá, v. 1, n. 1, p. 117-122, 2002.
- BELLA, P.; CATARA, V. Occurrence of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas marginalis* in Italy. **Plant Pathology**, Londres, v. 59, p. 402, 2010.

DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02185.x>. Disponível em:  
<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2009.02185.x>.  
 Acesso em: 4 dez. 2018.

BERESWILL, S.; BUGERT, P.; VOLKSCH, B.; ULLRICH, M.; BENDER, C. L.; GEIDER, K. Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 8, p. 2924-2930, 1994.  
 DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.60.8.2924-2930.1994>. Disponível em:  
<https://aem.asm.org/content/60/8/2924>. Acesso em: 14 mar. 2019.

BERIAM, L. O. S. Doenças bacterianas em hortaliças. **Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 81-84, 2007.

CARVALHO NETTO, O. V. **Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça por sequenciamento do gene 16S rDNA**. 2007. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

CATARA V.; ARNOLD D.; CIRVILLERI G.; VIVIAN A. Specific oligonucleotide primers for the rapid detection of the causal agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugata*: evidence for two genomic groups. **European Journal of Plant Pathology**, Berlim, v. 106, p. 753-762, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1026507423848>. Disponível em:  
<https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1026507423848>. Acesso em: 13 mar. 2018.

CATARA, V.; SUTRA, L.; MORINEAU, A.; ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; GARDAN, L. Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 52, p. 1749-1758, 2002.  
 DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1749>. Disponível em:  
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-52-5-1749>.  
 Acesso em: 24 mar. 2018.

CLARK, R. G.; WATSON, D. R. W. New plant disease record in New Zealand: Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata*. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 29, p. 105-109, 1986.  
 DOI: <https://doi.org/10.1080/00288233.1986.10417981>. Disponível em:  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00288233.1986.10417981>. Acesso em: 13 out. 2019.

CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. **Produção de tomate para processamento industrial**. 1. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2012.

COSTA, S. B.; FERREIRA, M. A. S.V.; LOPES, C. A. Diversidade patogênica e molecular de *Ralstonia solanacearum* da região amazônica brasileira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 285-294, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000400002>.  
 Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-41582007000400002&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582007000400002&lng=pt&tlng=pt). Acesso em: 23 jan. 2019.

DIMARTINO, M.; PANEBIANCO, S.; VITALE, A.; CASTELLO, I.; LEONARDI, C.; CIRVILLERI, G.; POLIZZI, G. Occurrence and pathogenicity of *Pseudomonas fluorescens*

and *P. putida* on tomato plants in Italy. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 93, n. 1, p. 79-87, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1400/169640>. Disponível em: <https://www.torrossa.com/en/resources/an/2466167>. Acesso em: 3 mar. 2019.

FACKRELL, H. B.; SINHA, R. C. Serological analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, p. 178-181, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-73-178>. Disponível em: [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Abstracts/Phyto73\\_178.htm](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Abstracts/Phyto73_178.htm). Acesso em: 13 mar. 2018.

FERNANDES, P. R. **Construção de primers e otimização de ensaios de PCR e de nested-PCR para a detecção específica de *Trichomonas foetus***. 2005. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa- MG: Ed. UFV, 3. ed. rev. amp., 2013, 421 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistic of agricultural production 2017**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 21 nov. 2019.

GALIBERT, F.; FINAN, T. M.; LONG, S. R.; PUHLER, A.; ABOLA, P.; AMPE, F.; BARLOY-HUBLER, F.; BARNETT, F.; BECKER, A.; BOISTARD, P.; BOTHE, G.; BOUTRY, M.; BOWSER, L.; BUHRMESTER, J.; CADIEU, E.; CAPELA, D.; CHAIN, P.; COWIE, A.; DAVIS, R. W.; DREANO, S.; FEDERSPIEL, N. A.; FISHER, R. F.; GLOUX, S.; GODRIE, T.; GOFFEAU, A.; GOLDING, B.; GOUZY, J.; GURJAL, M.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; HONG, A.; HUIZAR, L.; HYMAN, R. W.; JONES, T.; DANIEL, K.; KAHN, M. L.; KALMAN, S.; KEATING, D. H.; KISS, E.; KOMP, C.; LELAURE, V.; MASUY, D.; PALM, C.; PECK, M. C.; POHL, T. M.; PORTETELLE, D.; PURNELLE, B.; RAMSPERGER, U.; SURZYCKI, R.; THEBAULT, P.; VANDENBOL, M.; VORHOLTER, F. J.; WEIDNER, S.; WELLS, D. H.; WONG, K.; YEH, K. C.; BATUT, J. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Science**, Washington, v. 293, p. 668- 672, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1060966>. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/293/5530/668>. Acesso em: 10 set. 2018.

GOODNER, B.; HINKLE, G.; GATTUNG, S.; MILLER, N.; BLANCHARD, M.; QUROLLO, B.; GOLDMAN, B.S.; CAO, Y.; ASKENAZI, M.; HALLING, C.; MULLIN, L.; HOUMIEL, K.; GORDON, J.; VAUDIN, M.; IARTCHOUK, O.; EPP, A.; LIU, F.; WOLLAM, C.; ALLINGER, M.; DOUGHTY, D.; SCOTT, C.; LAPPAS, C.; MARKELZ, B.; FLANAGAN, C.; CROWELL, C.; GURSON, J.; LOMO, C.; SEAR, C.; STRUB, L.; CIELO, C.; SLATER, S. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, Washington, v. 14, n. 294, p. 2323-2328, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1066803>. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/294/5550/2323>. Acesso em: 13 mar. 2019.

HAMEDAN, E.; HARIGHI, B. Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains, causing bacterial stem blight disease of alfalfa in the kurdistan province of Iran. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 96, n. 2, p. 303-307, 2014.

DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V96I2.030>. Disponível em: <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3131>. Acesso em: 13 mar. 2019.

HULTON, C. S.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 825-834, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x>. Acesso em: 11 set. 2019.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola. TOMATE- SAFRA 2016**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/lspa/tabelas>. Acesso em: 21 nov. 2018.

JAUNET, T. X.; WANG, J. F. Variation in genotype and aggressiveness diversity of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. 320-327, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.4.320>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.1999.89.4.320>. Acesso em: 7 dez. 2018.

JI, P.; CAMPBELL, H. L.; KLOEPPER, J. W.; JONES, J. B.; SUSLOW, T. V.; WILSON, M. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, Amsterdã, v. 36, p. 358-367, 2006. DOI: [doi:10.1016/j.biocontrol.2005.09.003](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.09.003). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964405002379>. Acesso em: 7 dez. 2019.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; KATO, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KIYOKAWA, C.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MOCHIZUKI, Y.; NAKAYAMA, S.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKEUCHI, C.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, Oxford, v. 7, p. 331-338, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1093/dnares/7.6.331>. Disponível em: <https://academic.oup.com/dnaresearch/article/7/6/331/471076>. Acesso em: 13 ago. 2018.

KARATSU, T.; SHIRAKAWA, T.; OZAKI, K.; KOHASHIGUCHI, S. **Occurrence of bacterial rot of tomato [*Lycopersicon esculentum*] caused by *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Brown 1918) Stevens 1925**. 1995. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP9603518>. Acesso em: 4 nov. 2018.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. 663p.

KROSS, R. K.; CAVALCANTI-MATA, M. E. R. M.; BRAGA, E. M. Influência da epiderme do tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) na transferência de massa durante o tratamento osmótico. SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS (SLACA), 4., 2001. Campinas, **Anais [...]** Campinas: UNICAMP, 2001.

- KUDELA, V.; KREJZAR, V.; PÁNKOVÁ, I. *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas marginalis* associated with the collapse of tomato plants in rockwool slab hydroponic culture. **Plant Protection Science**, Praga, v. 46, p. 1-11, 2010.  
DOI: <https://doi.org/10.17221/44/2009-PPS>. Disponível em:  
<https://www.agriculturejournals.cz/web/pps.htm?volume=46&firstPage=1&type=publishedArticle>. Acesso em: 12 jul. 2018.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p.607-626.
- KUSKE, C. R.; BANTON, K. L.; ADORADA, D. L.; STARK, P. C.; HILL, K. K.; JACKSON, P. J. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 7, p. 2463-2472, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.64.7.2463-2472.1998>. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/64/7/2463>. Acesso em: 8 ago. 2018.
- LAWTON, M. B.; MACNEILL, B. H. Occurrence of race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. tomato on field tomato in southwestern Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Londres, v. 8, p. 85-88, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060668609501847>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07060668609501847>. Acesso em: 13 dez. 2019.
- LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. **Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987. v. 2. 216 p.
- LIU, P.; XUE, S.; HE, R.; HU, J.; WANG, X.; JIA, B.; GALLIPOLI, L.; MAZZAGLIA, A.; BALESTRA, G. M.; ZHU, L. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated from non-kiwifruit plant species in China. **European Journal of Plant Pathology**, Berlim, v. 145, n. 4, p. 743-754, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0863-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10658-016-0863-4>. Acesso em: 3 mar. 2018.
- LO CANTORE, P.; IACOBELLIS, N. S. Necrosi corticale e delmidollo del pomodoro causata da *Pseudomonas fluorescens* in Puglia. **Informatore Fitopatologico**, Bolonha, v. 52, n. 4, p. 54-57, 2002.
- MACIEL, K. W.; DESTEFANO, S. A. L.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; PATRICIO, F. R. A.; RODRIGUES, L. M. R.; GUERREIRO FILHO, O. Bacterial halo blight of coffee crop: aggressiveness and genetic diversity of strains. **Bragantia**, Campinas, v. 77, n. 1, p. 96-106, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2016267>. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0006-87052018000100096&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052018000100096&lng=en&tlng=en). Acesso em: 20 mar. 2019.
- MAKISHIMA, N.; MELO, W. F. O rei das hortaliças. **Cultivar**. Pelotas, RS, v. 5, n. 29, p. 28-32, 2005.
- MALATHRAKIS, N. E.; GOUMAS, D. E. Bacterial soft rot of tomato in plastic greenhouses in Crete. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 111, p. 115-123, 1987.

DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1987.tb01438.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7348.1987.tb01438.x>. Acesso em: 13 ago. 2018.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L. O. S.; MELO, L. C. P. Caracterização de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em tomateiro no Brasil e reação de cultivares/genótipos de tomateiro a esse patovar e ao patovar *tomato*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 63-66, 2002.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J.; RERIAM, L. O. S. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, 2008. 88p. Suplemento.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. 184 p.

MARINGONI, A. C.; KUROZAWA, C.; BARBOSA, V. Ocorrência de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em tomateiro na região de Pato de Minas, MG. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 20, n. 1, p. 49, 1994.

MARTIN, B.; HUMBERTO, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERY, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 20, n. 13, p. 3479-3483, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/20.13.3479>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/20/13/3479/2383509?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 20 out. 2018.

MARTIN, G. B.; BROMMONSCHENKEL, S.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M. W.; SPIVEY, R.; WU, T.; EARLE, E. D.; TANKSLEY, S. D. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, Washington, v. 262, p. 1432-1436, 1993. DOI: 10.1126/science.7902614. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/262/5138/1432>. Acesso em: 22 out. 2019.

MARTINS, O. M.; COUTO, M. E.; PATELLA, A. E. C. Occurrence of *Pseudomonas corrugata* on tomato in Rio Grande do Sul, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 125, 1990.

MICHEREFF, S. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2001. 150 p. Apostila.

MIRIK, M.; AYSAN, Y.; SAHIN, F. Characterization of *Pseudomonas cichorii* isolated from different Hosts in Turkey. **International Journal of Agriculture e Biology**, Faisalabad, v. 13, p. 203-209, 2011.

MONTEIRO, F. P.; OGOSHI, C.; BECKER, W. F.; WAMSER, A. F.; VALMORBIDA, J. Pith necrosis associated with *Pseudomonas viridiflava* in tomato plants in Brazil. **Plant Pathology & Quarantine**, Guizhou, v. 9, p. 1-5, 2019. DOI: 10.5943/ppq/9/1/1. Disponível em: [https://plantpathologyquarantine.org/pdf/PPQ\\_9\\_1\\_1.pdf](https://plantpathologyquarantine.org/pdf/PPQ_9_1_1.pdf). Acesso em: 10 jan. 2020.

MORETTI, C.; VINATZER, B. A.; ONOFRI, A.; VALENTINI, F.; BUONARIO, R. Genetic and phenotypic diversity of Mediterranean populations of the olive knot pathogen, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. **Plant Pathology**, Londres, v. 66, n. 4, p. 595-605, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12614>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.12614>. Acesso em: 10 dez. 2018.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.59.3.695-700.1993>. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/59/3/695>. Acesso em: 3 nov. 2019.

NAKATANI, A. K.; LOPES, R.; CAMARGO, L. E. A. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 2, p. 116-120, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052009000200006>. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-54052009000200006&lng=pt&tln=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052009000200006&lng=pt&tln=pt). Acesso em: 10 mar. 2019.

NATALINI, E.; ROSSI, M. P.; BARIONOVI AND, D.; SCORTICHINI, M. Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates associated with bud necrosis and leaf spot of pear in a single orchard. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 88, n. 2, p. 219-223, 2006.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank**. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em: 4 dez. 2019.

PARADELA, A. L.; SCACHETTI, A. P.; MUNHOZ, R.; BORIM JUNIOR., N.; CALAFIORI, M. H.; GALLI, M. A. Eficiência de Bion (acibenzolar-s-methyl) como indutor de resistência para o complexo bacteriano (*Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Clavibacter michiganense* pv. *michiganense*) e insetos vetores na cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). **Revista Ecosistema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 26, n. 1, 2001.

PENTARI, M. G.; MPALANTINAKI, E. E.; SARRIS, P. F.; TRANTAS, E. A.; VERVERIDIS, F. N.; GOUMAS, D. E. Characterization of bacterial isolates from pith necrosis disease of tomato. 16<sup>th</sup> Hellenic Phytopathological Congress, p.43. , 2012. Thessaloniki, **Anais [...]** Thessaloniki, Greece, 2012.

PEREZ, R. L. El tomate, nuevo hospedante de *Pseudomonas cichorii* en Cuba. **Protección de plantas**, Havana, v. 7, n. 2, p. 27-35, 1984.

POLIZZI, G.; DIMARTINO, M. A.; PANEBIANCO, S.; CIRVILLERI, G. A new emergence on soilless tomato cultures in Sicily: vascular and pith discoloration caused by *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 89, p. 54-55, 2007.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; GUIMARÃES, C. M. N.; MARTINS, O. M. Occurrence of *Pseudomonas corrugata* causing pith necrosis on tomato plants in Goiás, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000600014>. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-41582007000600014&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582007000600014&lng=en&tlng=en). Acesso em: 20 jan. 2019.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; INOUE-NAGATA, A. K.; REIS, A.; PINHEIRO, J. B.; LOPES, C. A.; ARAÚJO, E. R.; FONTENELLE, M. R.; COSTAJ. R.; GUIMARÃES, C. M. N.; ROSSATO, M.; BECKER, W. F.; COSTA H.; FERREIRA, M. A. S. V.; DESTÉFANO, S. A. L. **Levantamento de doenças e mosca branca em tomateiro em regiões produtoras no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013. 36 p. (Boletim Pesquisa e Desenvolvimento).

RODRIGUES, L. M. R. **Avaliação da agressividade e caracterização genética de linhagens de *Ralstonia solanacearum* isoladas de diferentes plantas hospedeiras**. 2010. 68 f. 2010. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

RODRIGUES, L. M. R.; DESTÉFANO, S. A. L.; BERIAM, L. O. S.; RODRIGUES-NETO, J. Occurrence of *Pseudomonas mediterranea* on tomato in Brazil. **Plant Pathology**, Londres, v. 59, p. 797, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02237.x. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2009.02237.x>. Acesso em: 10 jan. 2020.

RODRIGUES-NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; RAMOS, R. Ocorrência de *Pseudomonas corrugata* em tomateiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 15, p. 20, 1989.

SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULTK, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J. C.; CATTOLICO, L.; CHANDLER, M.; CHOISNE, N.; CLAUDEL-RENARDI, C.; CUNNAC, S.; DEMANGE, N.; GASPIN, C.; LAVIE, M.; MOISAN, A.; ROBERT, C.; SAURIN, W.; SCHIEX, T.; SIGUIER, P.; THEÂBAULT, P.; WHALEN, M.; WINCKER, P.; LEVY, M.; WEISSENBACH, J.; BOUCHER, C. A. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, Berlim, v. 415, n. 31, p. 497-502, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/415497a>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/415497a>. Acesso em: 12 set. 2019.

SANTOS, F. F. B. **Obtenção e seleção de híbridos de tomate visando à resistência ao *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV)**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2009.

SARKAR, S. F.; GUTTMAN, D. S. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n.4, p. 1999–2012, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1999-2012.2004>. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/70/4/1999>. Acesso em: 3 mar. 2018.

SAWADA, H.; KANAYA, S.; TSUDA, M.; SUZUKI, F.; AZEGAMI, K.; SAITOU, N. A Phylogenomic study of the octase genes in *Pseudomonas syringae* pathovars: the horizontal transfer of the argk-tox cluster and the evolutionary history of OCTase genes on their genomes. **Journal of Molecular Evolution**, Berlim, v. 54, p. 437-457, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00239-001-0032-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00239-001-0032-y>. Acesso em: 8 abr. 2019.



SAWADA, H.; SUZUKI, F.; MATSUDA, I.; SAITOU, N. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of argK and the evolutionary stability of hrp gene cluster. **Journal of Molecular Evolution**, Berlim, v. 49, p. 627-644, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1007/PL00006584>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FPL00006584>. Acesso em: 10 dez. 2018.

SAYGILI, H.; AYSAN, Y.; SAHIN, F.; USTUN, N.; MIRIK, M. Occurrence of pith necrosis caused by *Pseudomonas fluorescens* on tomato plant in Turkey. **Plant Pathology**, Londres, v. 53, p. 803, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01092.x>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2004.01092.x>. Acesso em: 12 nov. 2018.

SCARLETT, C. M.; FLETCHER, J. T.; ROBERTS, P.; LELLIOT, R. A. Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* nov. sp. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 88, p. 105-14, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1978.tb00684.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7348.1978.tb00684.x>. Acesso em: 8 jun. 2018.

SCARPELLINI, M.; FRANZETTI, L.; GALLI, A. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 236, n. 2, 1 p. 257-260, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09655.x>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/236/2/257/536896>. Acesso em: 6 dez. 2019.

SCHAAD, N. M.; JONES, J.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul, Minnessota: APS Press, 2001. 373p.

SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K. OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; SANTOS, M. T.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, Berlim, v. 417, n. 23, p. 459-463, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/417459a>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/417459a>. Acesso em: 13 mar. 2018.

SILVA JÚNIOR, T. A. F. ***Pseudomonas cichorii* em tomateiro: ocorrência no estado de São Paulo, gama de hospedeiras e reação de genótipos**. 2007. 586 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

SILVA JÚNIOR, T. A. F.; AZEVEDO, S. M.; GIORIA, R.; ALMEIDA, I. M. G.; MARINGONI, A. C. Ocorrência de *Pseudomonas cichorii* em tomateiro no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 285-290, 2009.

SILVA-PEREIRA, I. Amplificação de DNA por PCR. *In*: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, M. T. (ed). **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. 1.ed. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. cap. 6, p. 99-110.

SILVEIRA, J. R. P.; DUARTE, V.; MORAES, M. G.; OLIVEIRA, A. M. R.; BARNI, V.; MACIEL, J. L. N. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-rep e RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 615-622, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000600008>. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-41582005000600008&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582005000600008&lng=pt&tlng=pt). Acesso em: 3 mar. 2018.

SIMPSON, A. J. G.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L. M. C.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.; BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; BOVE, J. M.; BRIONES, M. R. S.; BUENO, M. R. P.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, L. E. A.; CARRARO, D. M.; CARRER, H.; COLAUTO, N. B.; COLOMBO, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C. R.; COSTA-NETO, C. M.; COUTINHO, L. L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A.P.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, V. C. A.; FERRO, J. A.; FRAGA, J. S.; FRANCA, J. S.; FRANCO, M. C.; FROHME, M.; FURLAN, L. R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S.; GOMES, S. L.; GRUBER, A.; HO, P. L.; HOHEISEL, J. D.; JUNQUEIRA, M. L.; KEMPER, E. L.; KITAJIMA, J. P.; KRIEGER, J. E.; KURAMAE, E. E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M. R.; LEITE, L. C. C.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOPES, S. A.; LOPES, C. R.; MACHADO, J. A.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MADEIRA, H. M. F.; MARINO, C. L.; MARQUES, M. V.; MARTINS, E. A. L.; MARTINS, E. M. F.; MATSUKUMA, A. Y.; MENCK, C. F. M.; MIRACCA, E. C.; MIYAKI, C. Y.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; MOON, D. H.; NAGAI, M. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; NETTO, L. E. S.; NHANI JR, A.; NOBREGA, F. G.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, M. A.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, R. C.; PALMIERI, D. A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B. R.; PEREIRA, G. A. G.; PEREIRA JUNIOR, A. H.; PESQUERO, J. B.; QUAGGIO, R. B.; ROBERTO, P. G.; RODRIGUES, V.; ROSA, A. J. M.; ROSA JUNIOR, V. E.; SA, R. G.; SANTELLI, R. V.; SAWASAKI, H. E.; SILVA, A. C. R.; SILVA, A. M.; SILVA, F. R.; SILVA JUNIOR, W. A.; SILVEIRA, J. F.; SILVESTRI, M. L. Z.; SIQUEIRA, W. J.; SOUZA, A. A.; SOUZA, A. P.; TERENCEZI, M. F.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; TSUHAKO, M. H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A. L. ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J. C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, Berlim, v. 406, n. 13, p. 151-159, 2000.

SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E. A.; MENCK, C. F. M.; SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. P.; KITAJIMA, J. P.; SIMPSON, J. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 169-189, 2002.

DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.030402.090559>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.40.030402.090559>. Acesso em: 22 ago. 2019.

SOUZA, V. L.; MARINGONI, A. C.; KRAUSE-SAKATE, R. Variabilidade genética em isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 170-176, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052006000200012>. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-54052006000200012&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052006000200012&lng=pt&tlng=pt). Acesso em: 10 mar. 2019.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A. D.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C. J.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 52, p. 1043-1047, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-1043>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-52-3-1043>. Acesso em: 11 mar. 2019.

STERN, M. J.; AMES, G. F. L.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, Washington, v. 37, n. 3, p. 1015-1026, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90436-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90436-7). Disponível em: [https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(84\)90436-7.pdf?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867484904367%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(84)90436-7.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867484904367%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 22 abr. 2019.

TRANTAS, E. A.; SARRIS, P. F.; MPALANTINAKI, E. E.; PENTARI, M. G.; VERVERIDIS, F. N.; GOUMAS, D. E. A new genomovar of *Pseudomonas cichorii*, a causal agent of tomato pith necrosis. **European Journal of Plant Pathology**, Berlim, v. 137, p. 477-493, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0258-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10658-013-0258-8>. Acesso em: 14 jun. 2019.

TRANTAS E. A.; SARRIS, P. F.; PENTARI, M.G.; MPALANTINAKI, E. E.; VERVERIDIS, F. N.; GOUMAS, D. E. Diversity among *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* isolated from tomato and pepper showing symptoms of pith necrosis in Greece. **Plant Pathology**, Londres, v. 64, p. 307-318, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12261>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12261>. Acesso em: 16 dez. 2018.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPISKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 19, p. 6823-6831, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12261>. Acesso em: 13 dezmar. 2018.

VERSALOVIC, J.; SCHENEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPISKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Celular Biology**, Washington, v. 5, p. 25-40, 1994.

VICENTE, J. G.; ROBERTS, S. J. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Berlim, v. 117, p. 383-392, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9107-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10658-007-9107-y>. Acesso em: 9 mar. 2019.

WILKIE, P.; DYE, D. W. *Pseudomonas cichorii* causing tomato and celery diseases in New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 17, p. 123-130, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1080/00288233.1974.10420990>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00288233.1974.10420990>. Acesso em: 14 jun. 2019.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain btail by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 7, p. 2271-2277, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.173.7.2271-2277.1991>. Disponível em: <https://jb.asm.org/content/173/7/2271>. Acesso em: 12 ago. 2018.

### 3 JUSTIFICATIVA

O tomateiro é uma cultura de grande importância socioeconômica no Brasil. A incidência de doenças na cultura representa perdas consideráveis de produtividade, sendo as doenças bacterianas cada vez mais incidentes e de difícil controle. Dentre essas bacterioses, as ocasionadas por espécies do gênero *Pseudomonas*, seja com sintomas na haste, folhas ou frutos, estão sendo cada vez mais relatadas no campo.

Isolados de espécies do gênero *Pseudomonas* apresentam grande diversidade genética, o que pode influenciar no nível de agressividade do patógeno. O conhecimento dessa diversidade, baseado em caracterizações morfológicas, bioquímicas e moleculares, permite identificar e agrupar essas bactérias em uma mesma espécie e/ou patovar e entender os mecanismos de patogenicidade envolvidos na infecção. Esse tipo de estudo é importante para programas de melhoramento genético e manejo integrado da doença, evitando assim a identificação errônea da etiologia e perdas na produção.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos gerais

- Caracterizar aspectos fenotípicos e genotípicos de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro tutorado no Brasil.

### 4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente os isolados de acordo com a cor, forma, bordos ou margem, elevação, textura ou consistência, além de detalhes óticos da bactéria;
- Caracterizar bioquimicamente os isolados com os testes específicos de LOPAT (levan, oxidase, podridão em batata, arginina dihidrolase e hipersensibilidade em plantas de fumo); liquefação da gelatina e produção de ácidos a partir de fontes de carbono;
- Caracterizar molecularmente os isolados com rep-PCR (REP, ERIC e BOX), agrupando-os de acordo com similaridades genéticas com elaboração de dendrogramas;
- Após agrupamento com similaridades genéticas, confirmar a identidade de *P. corrugata*, *P. putida*, *P. syringae* pv. *syringae* e *P. syringae* pv. *tomato* com primers específicos disponíveis para as espécies e/ou patovares.
- Sequenciar geneticamente a região 16S de isolados selecionados com primers 27F e 1492R.
- Avaliar a agressividade dos isolados de *Pseudomonas* spp. em plantas de tomate, na folha ou haste da planta, de acordo com sua origem.

## CAPÍTULO 2

### CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE

### *Pseudomonas* spp. DO TOMATEIRO TUTORADO NO BRASIL<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup>Artigo redigido de acordo com as normas do periódico Tropical Plant Pathology (Anexo A)

1 **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro**  
2 **tutorado no Brasil**

3  
4 **Lara C.B.M. Mota<sup>1</sup> & Nilvanira D. Tebaldi<sup>1</sup> & José M.Q. Luz<sup>1</sup>**

5  
6 <sup>1</sup> Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Amazonas, s/n,  
7 Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP: 38400-902.

8  
9 Autor para correspondência: Lara Caroline Borges Moreira Mota, e-mail:  
10 lara.moreira@ufu.br

11



12 **RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi caracterizar 43 isolados de *Pseudomonas* spp.  
13 obtidos de amostras de hastes ou folhas de tomateiro com sintomas de necrose da medula ou  
14 lesões foliares, respectivamente, quanto à aspectos fenotípicps e genotípicos. Os isolados  
15 bacterianos foram caracterizados morfológica e bioquimicamente pelos testes de Gram,  
16 crescimento anaeróbico, meio King B e testes LOPAT. A análise molecular foi realizada por  
17 rep-PCR (iniciadores REP, ERIC e BOX), iniciadores específicos e sequenciamento genético  
18 da região 16S de parte dos isolados. Para avaliar a agressividade, foram conduzidos dois  
19 experimentos, um com os isolados provenientes da haste e outro da folha do tomateiro. Em  
20 ambos os experimentos as plantas sadias de tomate cv. Santa Clara VF5600 foram inoculadas  
21 com suspensão bacteriana na concentração  $1,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, sendo avaliada a severidade  
22 da doença com escala diagramática e calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da  
23 Doença. Quanto à morfologia, todas as colônias foram circulares e brilhantes, a maioria  
24 transparente e com bordas lisas. A elevação variou entre reta, levemente elevada e convexa, e  
25 a coloração em nuances de cor palha. Bioquimicamente, os isolados foram classificados nos  
26 grupos II, IVb, Va e Vb dos testes LOPAT, um isolado como *P. corrugata* e dois isolados  
27 bioquimicamente não determinados. Molecularmente, apresentaram grande diversidade  
28 genética por rep-PCR, não sendo possível relacionar as características moleculares com o  
29 local de origem. Com os iniciadores específicos apenas o isolado UFU B39 foi identificado  
30 como *P. corrugata*. No sequenciamento genético foi possível confirmar a identidade de vários  
31 isolados como sendo *P. putida* e *P. fluorescens*, bem como *P. syringae* pv. *tomato*, os quais  
32 apresentaram variação bioquímica. Nos testes de agressividade na haste os isolados UFU B39  
33 e UFU H24 foram os mais agressivos, enquanto nos testes de folha não foi observada  
34 diferença na agressividade dos isolados. Dessa forma, conclui-se que os isolados  
35 apresentaram pouca variação morfológica, muita variação bioquímica e molecular e diferentes

- 36 níveis de agressividade na haste. Este é o primeiro relato de *P. putida* e *P. fluorescens*
- 37 causando doença no tomateiro tutorado no Brasil.
- 38

- 39 **Palavras-chave:** *Solanum lycopersicum* L. Diversidade genética. Necrose da medula. Pinta
- 40 bacteriana. Queima das folhas.
- 41

42 **ABSTRACT:** The objective of this work was to characterize 43 isolates of *Pseudomonas* spp.  
43 obtained from samples of tomato stems or leaves with symptoms of pith necrosis or leaf  
44 lesions, respectively, regarding phenotypic and genotypic aspects. Bacterial isolates were  
45 morphological and biochemically characterized by Gram tests, anaerobic growth, King B  
46 medium and LOPAT tests. Molecular analysis was performed by rep-PCR (REP, ERIC and  
47 BOX primers), specific primers and genetic sequencing of the 16S region of from isolates  
48 part. To evaluate aggressiveness, two assays were conducted, one using the isolates from the  
49 stem and the another from the tomato leaf. In both experiments healthy tomato plants cv.  
50 Santa Clara VF5600 were inoculated with bacterial suspension at a concentration  $1.0 \times 10^8$   
51 CFU mL<sup>-1</sup>, and the severity of the disease was evaluated and the Area Under The Disease  
52 Progression Curve calculated. Morfologically, all colonies were circular and bright, most then  
53 of transparent and with smooth edges. The elevation varied between straight, slightly elevated  
54 and convex, and the coloration in shades of straw color. Biochemically, the isolates were  
55 classified into groups II, IVb, Va and Vb the LOPAT tests, one isolate as *P. corrugata* and  
56 two biochemically undetermined isolates. Molecularly the isolates showed high genetic  
57 diversity by rep-PCR, and it was not possible to relate the molecular characteristics with the  
58 place of origin. With the specific primers only the UFU B39 isolate was identified as *P.*  
59 *corrugata*. Genetic sequencing confirmed the identified of several isolates such as *P. putida*  
60 and *P. fluorescens*, and also *P. syringae* pv. *tomato* that presented biochemical variation. In  
61 the aggressiveness tests in the stem, the isolates UFU B39 and UFU H24 were the most  
62 aggressive, and in the leaf test there was no difference in the isolates aggressiveness. It was  
63 concluded that the isolates showed low morfological variation, high biochemical and  
64 molecular variation and different levels of stem aggressiveness. This is the first report of *P.*  
65 *putida* and *P. fluorescens* causing disease in staked tomato plants in Brazil.

67 **Keywords:** *Solanum lycopersicum* L. Bacterial speck. Genetical diversity. Leaf blight. Pith  
68 necrosis.

## INTRODUÇÃO

69

70 A cultura do tomate (*Solanum lycopersicum* L) é a segunda olerícola mais cultivada no  
71 mundo, tendo grande valor socioeconômico no Brasil. Devido às variações climáticas das  
72 regiões onde é produzida, as formas de condução da cultura, dentre outros fatores, mais de  
73 200 doenças bióticas e abióticas já foram relatadas em todo mundo, resultando em diminuição  
74 significativa da produtividade (Kross et al., 2001; Paradela et al., 2001).

75 Diante desse cenário, as bactérias fitopatogênicas têm grande importância no  
76 tomateiro por limitarem à produção, e dentre esses patógenos, está o gênero *Pseudomonas*  
77 Migula (Silva Júnior et al., 2009). No Brasil já foram relatadas no tomateiro a ocorrência de  
78 doenças foliares ocasionadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye &  
79 Wilkie; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall; *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp  
80 e *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens. São relatadas também a ocorrência de necrose  
81 da medula causada por *Pseudomonas corrugata* Roberts & Scarlett, *Pseudomonas viridiflava*  
82 (Burkholder) Dowson e *Pseudomonas mediterranea* Catara et al. (Beriam, 2007; Quezado-  
83 Duval et al., 2007; Rodrigues et al., 2010; Monteiro et al., 2019). Os sintomas dessas  
84 bacterioses variam de acordo com a espécie ou patovar, sendo observados na parte aérea das  
85 plantas, incluindo folhas, hastes e frutos (Kurozawa & Pavan, 2005).

86 A identificação do patógeno é baseada principalmente em caracterizações  
87 morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da bactéria. Testes bioquímicos denominados  
88 LOPAT são recomendados para o gênero (Lelliott & Stead 1987; Schaad et al., 2001), no  
89 entanto, nem sempre são suficientes para determinar qual espécie ou patovar de *Pseudomonas*  
90 está ocasionando a enfermidade no tomateiro. Isso ocorre devido à grande diversidade  
91 bioquímica e genética das espécies, bem como o possível surgimento de novas espécies ou  
92 patovares antes não associados com a cultura. Visto isso, técnicas moleculares, baseadas na  
93 análise genômica, podem ser empregadas.

94           Dentre os métodos moleculares destaca-se a rep-PCR, técnica que corresponde  
95   coletivamente aos protocolos de REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR. Cada uma das técnicas  
96   se refere à famílias de sequências de DNA repetitivas e altamente conservadas, e que estão  
97   dispersas no genoma de diversas espécies bacterianas (Versalovic et al., 1991; Versalovic et  
98   al., 1994; Souza et al., 2006). Com esse método é possível avaliar a diversidade genética,  
99   relacionamento filogenético e evolucionário do gênero, bem como a variabilidade em nível  
100   intraespecífico.

101           Além da técnica de rep-PCR, primers específicos para determinadas espécies como *P.*  
102   *corrugata*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *syringae* e *Pseudomonas putida* (Trevisan)  
103   Migula já foram desenhados e podem ser usados para identificação do patógeno (Bereswill et  
104   al., 1994; Kuske et al., 1998; Catara et al., 2000; Hamedan & Harighi, 2014). Quando essa  
105   identificação não é possível, o sequenciamento genético da região 16S (16S rRNA) com  
106   primers universais, conforme sugerido pelo comitê de sistemática bacteriana em 2002  
107   (Stackebrandt et al., 2002), permite a identificação da bactéria, bem como as relações  
108   filogenéticas entre as espécies. A comparação das sequências de nucleotídeos da região que  
109   codifica o gene 16S rRNA é utilizada por ser considerada conservada entre as bactérias, mas,  
110   ao mesmo tempo, com variabilidade genética (Woese & Fox, 1977 apud Carvalho Netto,  
111   2007).

112           Devido a essa grande diversidade genética, isolados de espécies do gênero  
113   *Pseudomonas* possui diferentes níveis de agressividade ao hospedeiro. Essa variação está  
114   associada à velocidade no aparecimento dos sintomas da doença, ou seja, quanto mais  
115   agressivo for determinado isolado, mais rápido será o aparecimento dos sintomas. Isso ocorre  
116   devido à diferenciação genética no nível geográfico das populações que são moldadas por  
117   diferentes pressões de seleção (direcional, estabilizadora ou disruptiva), dependendo do

118 ambiente que se encontram, com variações no hospedeiro, habitat natural e práticas culturais  
119 (Jaunet & Wang, 1999; Michereff, 2001; Nakatani et al., 2009).

120 Assim, o conhecimento da diversidade genética, com base em caracterizações  
121 culturais, bioquímicas e moleculares, permite identificar e agrupar essas bactérias em uma  
122 mesma espécie e/ou patovar, bem como compreender os mecanismos de patogenicidade  
123 envolvidos na infecção. Isso é de suma importância nos programas de melhoramento genético  
124 do tomateiro e manejo integrado da doença, pois permite a identificação correta do patógeno,  
125 dado que diferentes níveis de agressividade são observados, com perdas consideráveis na  
126 produtividade.

127 Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo caracterizar quanto à aspectos  
128 fenotípicos e genotípicos, isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro tutorado no Brasil.

129

## 130 MATERIAL E MÉTODOS

131 O trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LABAC) e na casa  
132 de vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia,  
133 *campus* Umuarama, Uberlândia-MG, no período de novembro de 2016 a dezembro de 2019.

134

### 135 **Obtenção dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

136 Os 43 isolados de *Pseudomonas* ssp. deste trabalho fazem parte da coleção de trabalho  
137 do LABAC. Esses isolados foram obtidos de plantas de tomate com sintomas de necrose na  
138 haste, que por vezes apresentavam formação de raízes adventícias (Figura 1) ou com lesões  
139 necróticas na folha ou fruto, oriundos de plantios tutorados de várias regiões do Brasil (Tabela  
140 1).

141 Para obtenção de cada isolado foi realizado isolamento indireto em meio de cultura  
142 523 Kado & Heskett (Kado & Heskett, 1970) (Apêndice E). Para isso, o tecido da planta que



143 apresentava sintoma da doença foi lavado com água e sabão neutro e seco em papel toalha.  
144 Com bisturi, foram retirados fragmentos de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm na borda da lesão,  
145 colocados em álcool 50% por 20 a 30 segundos e, em seguida, desinfestados em solução de  
146 hipoclorito de sódio (1%) por 3 minutos. O excesso de desinfetante foi removido lavando os  
147 fragmentos com água destilada esterilizada por três vezes (Romeiro, 2001). Os fragmentos  
148 foram depositados diretamente sobre o meio de cultura. As placas de Petri foram incubadas a  
149 28°C por dois dias, sendo observado o crescimento da bactéria no meio de cultura. Os  
150 isolados obtidos foram mantidos na coleção do LABAC preservados em água, glicerol e papel  
151 de filtro, segundo metodologia descrita por Alfenas e Mafia (2007).

152

### 153 **Caracterização morfológica dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

154 Após a recuperação do isolado preservado, a colônia bacteriana foi semeada com alça  
155 de repicagem em meio de cultura 523 pelo método de estrias simples, possibilitando o  
156 crescimento de colônias individualizadas para caracterização morfológica da bactéria. Essa  
157 caracterização foi feita por meio da observação visual ou, quando necessário, com  
158 microscópio estereoscópio. Foram observadas características como: cor, forma, bordos ou  
159 margem, elevação, textura ou consistência e detalhes óticos (Mariano & Silveira, 2005).

160

### 161 **Caracterização bioquímica dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

162 A identidade dos isolados como sendo do gênero *Pseudomonas* foi feita pela chave de  
163 identificação proposta por Schaad et al. (2001) (Apêndice A), em que são classificadas como  
164 Gram negativas, crescimento anaeróbico e fluorescência em meio King B, com exceção de  
165 *P. corrugata* e *Pseudomonas straminea* Iizuka & Komagata (Aiello et al., 2013). Para  
166 identificação das espécies de *Pseudomonas* foram realizados os testes específicos de LOPAT:  
167 levan, oxidase, podridão em batata, arginina dihidrolase e hipersensibilidade em plantas de

168 fumo (Apêndices E e F), conforme descritos por Lelliott e Stead (1987) e Schaad et al. (2001)  
169 (Apêndices B e C).

170

### 171 **Patogenicidade dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

172 Para o cumprimento dos Postulados de Koch, a patogenicidade dos isolados foi  
173 confirmada inoculando a suspensão bacteriana de cada isolado em plantas sadias de tomate  
174 Santa Cruz cv. Kada Gigante (Topseed, 2019), quando apresentaram dois trifólios, mantidas  
175 em casa de vegetação. A suspensão bacteriana foi padronizada em espectrofotômetro a 0,2 de  
176 absorvância (540 nm), resultando na concentração aproximada de  $1,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>  
177 (Andrade et al., 2013). As inoculações foram realizadas por meio de injeção de 100 µL<sup>-1</sup> na  
178 axila da planta ou por pulverização foliar até o ponto de escorrimento, dependendo do local na  
179 planta em que se encontrava o sintoma da doença. Após o aparecimento dos sintomas de  
180 necrose da medula ou lesões foliares, a bactéria foi reisolada, sendo a caracterização  
181 confirmada pelos testes bioquímicos LOPAT supracitados.

182

### 183 **Extração de DNA dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

184 Para extração de DNA genômico, os isolados bacterianos foram cultivados em meio  
185 de cultura 523, a 28°C por 48h. Após o crescimento bacteriano, a colônia foi repicada para  
186 tubos de ensaio contendo Nutriente Líquido (NL) (Apêndice E) para cultivo sob agitação a  
187 150 rpm a 28°C por 24h. Após o crescimento, 1,5 mL<sup>-1</sup> da suspensão bacteriana foi transferida  
188 para tubos tipo eppendorf e as células bacterianas foram centrifugadas a 13.000g durante 3  
189 min. Para extração do DNA, foi utilizado o kit de extração e purificação de DNA genômico  
190 Wizard (Promega Corporation, 2019), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O  
191 DNA obtido de cada isolado foi quantificado em aparelho NanoDrop™ Modelo 2000/2000c  
192 Spectrophotometers (Termofischer, 2019), no Laboratório de Nanobiotecnologia (NANOS),

193 do Instituto de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, sendo a concentração  
194 ajustada para 25 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

195

196 **Reação em Cadeia da Polimerase para diversidade genética dos isolados de**  
197 ***Pseudomonas* spp.**

198 A análise molecular de rep-PCR com os primers correspondentes às três sequências  
199 repetitivas REP, ERIC e BOX foi realizada de acordo com metodologia de Louws et al.  
200 (1994). Para cada uma das três sequências de primers o protocolo de reação foi ajustado,  
201 conforme necessidade.

202 Para os primers REP1R e REP2R a reação de PCR foi feita em um volume de 12,5  
203  $\mu\text{L}^{-1}$ , na concentração final de: tampão 1X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 3 mM  
204 de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM de dNTP; 1  $\mu\text{M}$  dos primers REP1R e REP2R; 1U de Taq polimerase e 25  
205 ng de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador Omn-E Thermo Hybaid, com  
206 programa de desnaturação a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 40°C por 1  
207 min, 65°C por 5 min, e extensão final a 65°C por 15 min.

208 Para os primers ERIC1R e ERIC2 a reação de PCR foi feita em um volume de 12,5  
209  $\mu\text{L}^{-1}$ , na concentração final de: tampão 1X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 3 mM  
210 de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM de dNTP; 1  $\mu\text{M}$  dos primers ERIC1R e ERIC2; 1U de Taq polimerase e  
211 50 ng de DNA. A amplificação foi realizada no termociclador com desnaturação a 95°C por 5  
212 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 40°C por 1 min, 65°C por 5 min, e extensão final a  
213 65°C por 15 min.

214 Para o primer BOX A1R a reação de PCR foi feita em um volume de 12,5  $\mu\text{L}^{-1}$ , na  
215 concentração final de: tampão 1X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 3 mM de  
216  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM de dNTP; 1  $\mu\text{M}$  do primer BOX A1R; 1U de Taq polimerase e 50 ng de  
217 DNA. A amplificação foi realizada no termociclador com desnaturação a 95°C por 7 minutos;

218 30 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min, 65°C por 5 min, e extensão final a 65°C por 15  
219 min.

220 Os produtos finais das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a  
221 1,0%, corado com Sybr® Safe. Após a corrida das amostras em tampão Tris-Borato EDTA  
222 0,5 X (Apêndice A) por 1 h a 100V e 100A, os fragmentos amplificados foram visualizados  
223 em luz ultravioleta no aparelho transluminador Hoefer modelo Macro Vue UV-20 (Hoeferinc,  
224 2019) e fotodocumentados.

225 As análises dos perfis de amplificação foram realizadas visualmente e transformadas  
226 em dados binários, de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de bandas (Costa et al,  
227 2007). Os dados gerados foram analisados com o programa Genes (Cruz, 2006). Os  
228 relacionamentos genéticos entre os isolados foram determinados pelo coeficiente de  
229 similaridade de Jaccard e a análise de agrupamento foi realizada de acordo com o método  
230 UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) (Sneath & Sokal,  
231 1973).

232

### 233 **Reação em Cadeia da Polimerase com primers específicos para *Pseudomonas* spp.**

234 Após confirmação das características bioquímicas e agrupamento com similaridades  
235 genéticas, a fim de confirmar a identidade dos isolados que se caracterizem como *P.*  
236 *corrugata*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *syringae* e *P. putida*, foi realizada análise  
237 de PCR com primers específicos disponíveis para as espécies e/ou patovares.

238 Para *P. corrugata* foram utilizados os primers PC5/1 e PC5/2 (Catara et al., 2000). O  
239 volume final de cada reação foi de 12,5  $\mu\text{L}^{-1}$ , na concentração final de: tampão 1X (500  
240 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTP; 0,4  $\mu\text{M}$  dos  
241 primers PC5/1 e PC5/2; 1,25U de Taq polimerase e 25 ng de DNA. A amplificação foi

242 realizada em termociclador com desnaturação a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por  
243 30s, 62°C por 30s, 72°C por 1 min, sendo amplificação do fragmento visualizada a 1100 pb.

244 Para *P. syringae* pv. *tomato* foram utilizados o Primer 1 e Primer 2 (Bereswill et al.,  
245 1994). O volume final de cada reação foi de 12,5  $\mu\text{L}^{-1}$ , na concentração final de: tampão 1X  
246 (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTP; 2  $\mu\text{M}$  dos  
247 primers 1 e 2; 1 U de Taq polimerase e 50 ng de DNA. A amplificação foi realizada em  
248 termociclador com 30 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 45s, e extensão final a  
249 72°C por 5 min, sendo amplificação do fragmento visualizada a 650 pb.

250 Para *P. syringae* pv. *syringae* foram utilizados os primers PF e PR (Hamedan &  
251 Harighi, 2014). O volume final de cada reação foi de 12,5  $\mu\text{L}^{-1}$ , tampão 1X (500 mM KCl; 200  
252 mM Tris-HCl, pH 8,4); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTP; 2  $\mu\text{M}$  dos primers PR e PF; 1 U  
253 de Taq polimerase e 50 ng de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador com  
254 desnaturação a 93°C por 3 min, 35 ciclos de 93°C por 1 min, 63°C por 1 min, 72°C por 1 min,  
255 e extensão final a 72°C por 6 min, sendo amplificação do fragmento visualizada a 576 pb.

256 Para *P. putida* foram utilizados os primers XylR-F1 e XylR-R1 (Kuske et al., 1998). O  
257 volume final de cada reação foi de 12,5  $\mu\text{L}^{-1}$ , tampão 1X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl,  
258 pH 8,4); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTP; 1  $\mu\text{M}$  dos primers XylR-F1 e XylR-R1; 1,25 U  
259 de Taq polimerase e 50 ng de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador com  
260 desnaturação a 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1 min, 72°C por 30s, e  
261 extensão final a 72°C por 5 min, sendo amplificação do fragmento visualizada a 259 pb.

262 Os produtos finais das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a  
263 1,0%, corado com Sybr® Safe. Após a corrida das amostras em tampão Tris-Borato EDTA  
264 0,5 X (Apêndice A) por 1 h a 100V e 100A, os fragmentos amplificados foram visualizados  
265 em luz ultravioleta no aparelho transluminador e fotodocumentados.

266 **Sequenciamento gênico da região 16S dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

267 Após a caracterização bioquímica, correlação com local de origem da amostra e  
268 similaridades genéticas, os isolados que não foram agrupados pela rep-PCR e não  
269 identificados pelos primers específicos foram selecionados para sequenciamento da região  
270 16S. Para isso foi realizada a PCR com os primers 27F e 1492R (Martin-Laurent et al., 2001;  
271 Jones et al., 2006). O volume final de cada reação foi de 50,0  $\mu\text{L}^{-1}$ , na concentração final de:  
272 tampão 1X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4), 3,0 mM de  $\text{Mg}^{+2}$ , 0,2 mM de dNTP, 1  
273  $\mu\text{M}$  de cada primer 27F e 1492R, 1,25 U de Taq polimerase e 50 ng de DNA. A amplificação  
274 foi realizada em termociclador com desnaturação a 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de 94°C por  
275 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 2 min, e extensão final a 72°C por 15 min, sendo  
276 amplificação do fragmento visualizada a 1492 pb.

277 Os produtos da PCR foram enviados para a empresa BPI Biotecnologia EPP, em  
278 Botucatu-SP, para sequenciamento. As sequências obtidas foram submetidas à plataforma  
279 Blast do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e comparadas com sequências  
280 genéticas disponíveis no banco de dados do GenBank (NCBI, 2019a).

281

282 **Testes bioquímicos para determinação de biovares dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

283 Posteriormente, para isolados confirmados como *P. putida* ou *Pseudomonas*  
284 *fluorescens* Migula pelo sequenciamento genético, foi realizado, para determinação de  
285 biovares, o teste de liquefação da gelatina e produção de ácidos a partir da L-Arabinose, D-  
286 Galactose, D-Manitol, D-Manose, m-Inositol, D-Sorbitol, Sacarose e Trealose (Apêndice E),  
287 de acordo com Dimartino et al. (2011) (Apêndice D).

288

## 289 **Teste de agressividade dos isolados dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

290 Para determinar os níveis de agressividade dos isolados foram conduzidos  
291 experimentos, um para inoculação bacteriana na haste, realizado em casa de vegetação e outro  
292 na folha, realizado no LABAC. Para os experimentos foram utilizados tomateiro Santa Clara  
293 VF5600, sem resistência à *Pseudomonas* spp. (Sakata, 2011), quando apresentavam dois  
294 pares de folhas verdadeiras. Em ambos os experimentos a suspensão bacteriana foi  
295 padronizada em espectrofotômetro a 0,2 de absorbância (540 nm), resultando na concentração  
296 de  $1,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (Andrade et al., 2013).

297 O experimento da necrose na haste foi realizado no período de junho a julho de 2017,  
298 sendo aferidas diariamente, no mesmo horário, na casa de vegetação, as temperaturas médias,  
299 máximas e mínimas do ar. Os 32 isolados testados foram oriundos de plantas que  
300 apresentavam sintomas de necrose na haste (Tabela 2), sendo as inoculações realizadas  
301 segundo metodologia adaptada de Rodrigues (2010), por meio de injeção de 50 µL<sup>-1</sup> da  
302 suspensão bacteriana na axila da terceira folha, com auxílio de uma seringa de 1 mL<sup>-1</sup>. As  
303 plantas foram mantidas em câmara úmida 24h antes e 24h depois da inoculação.

304 O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 33  
305 tratamentos (32 isolados + testemunha inoculada com água destilada autoclavada) e quatro  
306 repetições, em esquema de parcelas subdivididas em três tempos de avaliação, sendo cada  
307 parcela constituída por duas plantas. A severidade da doença foi avaliada aos 10, 20 e 30 dias  
308 após a inoculação (DAI), sendo coletadas quatro parcelas por tempo de avaliação e  
309 mensurado o comprimento da lesão necrótica causada pela infecção bacteriana, com auxílio  
310 de régua milimetrada após corte longitudinal.

311 No experimento com sintomas foliares, foram testados 11 isolados oriundos de folhas  
312 ou fruto do tomateiro (Tabela 3). Para isso, as plantas foram mantidas em câmara úmida por  
313 24h, sendo posteriormente coletados trifólios do tomateiro e colocados sobre suporte de

314 ponteiros em papel filtro estéril umedecido com água destilada autoclavada em caixas tipo  
315 gerbox. A suspensão bacteriana foi inoculada por aspensão foliar nas partes adaxial e abaxial  
316 da folha com borrifador até o ponto de escorrimento, sendo incubadas em BOD a 21°C, com  
317 fotoperíodo de 12h.

318 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 12 tratamentos (11  
319 isolados + testemunha inoculada com água destilada autoclavada) e cinco repetições, sendo  
320 cada parcela constituída por dois trifólios. A agressividade dos isolados foi avaliada através  
321 da severidade da doença aos 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias após a inoculação, empregando-se a  
322 escala diagramática adaptada de Mello et al. (1997).

323 Em ambos os experimentos foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso de  
324 Doença (AACPD) (Campbell & Madden, 1990), pela fórmula:

$$325 \quad AACPD = \sum \{ ((Y1 + Y2)/2) * (t2 - t1) \} + \{ ((Y2 + Y3)/2) * (t3 - t2) \} + \{ \dots \}$$

326 Onde: Y1 e Y2 são as duas avaliações consecutivas, realizadas nos tempos t1 e t2,  
327 respectivamente.

328 Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade dos resíduos (Teste de  
329 Kolmogorov-Smirnova) e de homogeneidade das variâncias (Teste de Levene), pelo programa  
330 estatístico SPSS Statistics vs. 20 (Ibm Corp, 2011). As análises estatísticas foram realizadas  
331 com o auxílio do programa estatístico Sisvar versão 5.10 (Ferreira, 2010) e as comparações  
332 entre os tratamentos foram realizadas pelo teste Tukey ou Scott-Knott a 0,05 de significância.

333

334

## RESULTADOS

335

### 336 **Caracterização morfológica dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

337 Em relação às características culturais em meio de cultura 523, foi observada pouca  
338 variação entre os isolados (Figura 2), que apresentaram colônias circulares e brilhantes. Em



339 relação às bordas houve pouca variação, com a prevalência de bordas lisas, com exceção do  
340 isolado UFU B39, UFU C17 cujas bordas eram onduladas. A elevação variou entre reta (11  
341 isolados), levemente elevada (19 isolados) e convexa (13 isolados). Quanto à óptica, a maioria  
342 dos isolados foram transparentes (35 isolados) e os outros opacos (oito isolados). A coloração  
343 variou com nuances de cor palha, sendo observada a coloração branca (cinco isolados),  
344 branco-palha (16 isolados), palha (18 isolados) e amarelo-palha (quatro isolados) (Tabela 4).

345

#### 346 **Caracterização bioquímica dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

347 Considerando similaridade bioquímica de 100%, foi observada alta diversidade entre  
348 os isolados, com a formação de sete grupos distintos (Figura 3). Todos os isolados foram  
349 Gram negativos e com crescimento anaeróbico. Todos os isolados foram fluorescentes em  
350 meio King B, com exceção do isolado UFU B39, sendo classificado pelo teste LOPAT como  
351 *P. corrugata* (- + - + +) (Tabela 5).

352 Os demais isolados apresentaram fluorescência em meio de cultura King B.  
353 Considerando a classificação bioquímica de grupos, proposta por Lelliot & Stead (1987),  
354 desses, a maioria (28 isolados) foram classificados no grupo Va como *P. putida* ou *P.*  
355 *fluorescens* (LOPAT: - + - + -): UFU C17, UFU G3, UFU G5, UFU G6, UFU G8, UFU G9,  
356 UFU G53, UFU G82, UFU G90, UFU G120, UFU G121, UFU G122, UFU G143, UFU  
357 G149, UFU H3, UFU H4, UFU H5, UFU H6, UFU H18, UFU H21, UFU H22, UFU H25,  
358 UFU H30, UFU H31, UFU H41, UFU H46, UFU H98 e UFU H104.

359 No grupo IVb, foram classificados como *P. fluorescens* (LOPAT: - + + + -) os  
360 isolados UFU B38, UFU G125, UFU H99 e UFU I81. No grupo Vb, também foram  
361 classificados como *P. fluorescens* (LOPAT: + + - + -) os isolados UFU G18, UFU G38, UFU  
362 G81 e UFU H120. No grupo II, foram bioquimicamente classificados como *Pseudomonas*

363 *viridiflava* (Burkholder) Dowson (LOPAT: - - + - +) os isolados UFU E36, UFU E37, UFU  
364 H11 e UFU H175.

365 Mesmo com testes LOPAT não foi possível a classificação dos isolados UFU D18 (+ -  
366 - + +) e UFU H24 (- + + - +), de acordo com os testes proposto por Lelliott & Stead (1987) e  
367 Schaad et al. (2001).

368

### 369 **Patogenicidade dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

370 A patogenicidade de todos os isolados foi confirmada após a inoculação em plantas  
371 sadias de tomateiro. Foram observados sintomas de necrose da medula quando feito corte  
372 longitudinal nas hastes das plantas inoculadas com isolados da haste, ou sintomas de necroses  
373 foliares quando inoculados os isolados provenientes da folha do tomateiro. Os Postulados de  
374 Koch foram cumpridos após reisolamento e a comparação dos testes bioquímicos LOPAT, de  
375 todos os reisolados com os testes do isolado de origem.

376

### 377 **Reação em Cadeia da Polimerase para diversidade genética dos isolados de** 378 ***Pseudomonas* spp.**

379 Com as análises de rep-PCR (REP, ERIC e BOX) foi observada alta diversidade  
380 genética entre os isolados. Com similaridade de apenas 20% entre os isolados, houve a  
381 formação de 15 grupos (Figura 4), com bandas distintas que variaram de 100 a 3000 pb.  
382 Alguns isolados apresentaram 100% de similaridade genética, sendo eles UFU H11 e UFU  
383 H175 e também os isolados UFU G38 e UFU G18, em ambos os casos bioquimicamente  
384 iguais e de locais diferentes. Também foram 100% similares os isolados UFU G121 e UFU  
385 G122; UFU G143 e UFU G149, e nos dois casos, por serem bioquimicamente iguais e do  
386 mesmo local de origem, inferiu-se que são da mesma espécie.

387 Considerando isolados provenientes do mesmo local de origem das amostras foi  
388 observada a formação de subgrupos com similaridades de 90% entre os isolados UFU E36 e  
389 UFU E37; 50% entre UFU G3 e UFU G5; 45% entre UFU G90 e UFU G81; 40% entre UFU  
390 G6, UFU G8 e UFU G9. Em ambos os casos pode-se inferir tratar-se da mesma espécie  
391 bacteriana. Também foi observado que o isolado UFU G125 não apresentou nenhum nível de  
392 similaridade com outro isolado, quando avaliado por REP-PCR.

393 Alta diversidade também foi encontrada na análise de ERIC- PCR, com formação de  
394 12 grupos (Figura 5) a 20% de similaridade genética, e bandas variando de 300 a 2000 pb. Os  
395 isolados que apresentaram 100% de similaridade genética foram: UFU G90 e UFU H120,  
396 bioquimicamente diferentes e de locais diferentes; isolados UFU G121 e UFU G122; UFU  
397 G143 e UFU G149, bioquimicamente iguais e do mesmo local de origem, sendo esses dois  
398 últimos casos considerados da mesma espécie, como mencionado na análise por REP-PCR.  
399 Não houve formação de subgrupos relacionados ao local de origem das amostras,

400 Em BOX-PCR, 12 grupos foram formados com similaridade de 20% (Figura 6),  
401 observando bandas de 200 a 2000 pb. Isolados com 100% de similaridade genética foram  
402 UFU H11 e UFU H175, bioquimicamente iguais e de locais diferentes; isolados UFU H98 e  
403 UFU H99, bioquimicamente diferentes e do mesmo local; isolados UFU G121 e UFU G122,  
404 UFU E36 e UFU E37, bioquimicamente iguais e do mesmo local de origem.

405 Na formação de subgrupos, ponderando isolados procedentes do mesmo local de  
406 origem das amostras, foi observada a formação de subgrupos com similaridades de 80% entre  
407 os isolados UFU G143 e UFU G149; 35% entre UFU H18 e UFU H25; 30% entre UFU H4,  
408 UFU H5 e UFU H6. Em ambos os casos pode-se deduzir ser a mesma espécie. Os isolados  
409 UFU G125 e UFU G81 não apresentaram nenhum nível de similaridade com outro isolado,  
410 quando avaliados por BOX-PCR.

411 Quando avaliados os três primers em conjunto (Figura 7), considerando uma  
412 similaridade genética de apenas 20% entre os isolados, foi observada acentuada diversidade  
413 genética, com formação de 24 grupos distintos. Não foi possível relacionar os grupos  
414 formados com a classificação bioquímica ou de acordo com local de origem das amostras.  
415 Apenas os isolados UFU G121 e UFU G122 foram 100% similares. A formação de  
416 subgrupos, considerando isolados com a mesma origem, foi observada entre os isolados UFU  
417 G143 e UFU G149 e isolados UFU H18 e UFU H25, com 80% e 35% de similaridades,  
418 respectivamente.

419 Nenhum isolado amplificou com os primers PF e PR para *P. syringae* pv. *syringae*;  
420 Primer 1 e Primer 2 para *P. syringae* pv. *tomato* e Primers XylR-F1 e XylR-R1 para *P.*  
421 *putida*, não sendo confirmada a identidade dessas espécies e/ou patovares. O isolado UFU  
422 B39, previamente caracterizado bioquimicamente como *P. corrugata*, foi analisado com os  
423 primers específicos PC5/1 e PC5/2, sendo confirmada sua identidade.

424

#### 425 **Sequenciamento gênico da região 16S dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

426 Foram consideradas similaridades superiores a 94% em relação às cepas depositadas  
427 no GenBank. Em relação ao *E-value*, que corresponde à probabilidade de se obter com outra  
428 sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de nucleotídeos, outro alinhamento com  
429 score igual ou superior, foi considerando somente valores zero. Isso porque, segundo Souza &  
430 Lifschitz (2007), quanto mais próximo de zero for o *E-value*, mais confiável foi a consulta.  
431 Quanto aos percentuais de cobertura da sequência, foram considerados valores superiores a  
432 99%.

433 Os resultados do sequenciamento genético foram confrontados com a classificação  
434 bioquímica (Tabela 5) para que fosse concluída a identidade dos isolados. A maioria dos

435 isolados foram classificados como *P. putida* (29 isolados) e *P. fluorescens* (nove isolados)  
436 (Tabela 6).

437 Os isolados UFU E36, UFU E37, UFU H11 e UFU H175, previamente caracterizados  
438 como *P. viridiflava* pelos testes bioquímicos (Tabela 5), foram classificados pelo  
439 sequenciamento genético como *P. syringae* pv. *tomato* (Tabela 6), confirmando, assim, a  
440 variação bioquímica que pode ocorrer em determinadas espécies.

441

#### 442 **Testes bioquímicos para determinação de biovars dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

443 Os testes bioquímicos de liquefação da gelatina e produção de ácidos a partir de fontes  
444 de carbono (Apêndice E), propostos por Dimartino et al. (2001) (Apêndice D), permitiram a  
445 diferenciação de alguns isolados de *P. putida* do grupo Va (Tabela 7). Os isolados UFU G3,  
446 UFU G122, UFU H6, UFU H21, UFU H24, UFU H30, UFU H31 e UFU H41 foram  
447 confirmados como *P. putida* bv. A.

448 Os demais isolados de *P. putida* tiveram resultados semelhantes à caracterização da  
449 biovar A, porém apresentaram algumas variações, incluindo a liquefação da gelatina positiva:  
450 UFU D18, UFU G5, UFU G6, UFU G8, UFU G9, UFU G120, UFU G143, UFU G149; UFU  
451 H3, UFU H4, UFU H5, UFU H18, UFU H22, UFU H25, UFU H46 e UFU H98; liquefação  
452 da gelatina positiva e produção de ácidos a partir da D-Galactose: UFU G53, UFU G121 e  
453 UFU H104; liquefação da gelatina positiva e produção de ácidos a partir da Trealose: UFU  
454 G82 e UFU G90 (Tabela 7).

455 Em relação aos isolados de *P. fluorescens*, não foi possível a caracterização de  
456 biovars com os testes realizados, conforme proposto por Dimartino et al. (2001) (Apêndice  
457 D). Todos os nove isolados da espécie apresentaram muita variação na produção dos ácidos,  
458 não se assemelhando a nenhuma biovar descrita (Tabela 7).

459

#### 460 **Teste de agressividade dos isolados de *Pseudomonas* spp.**

461 Durante a condução do experimento de agressividade na haste em casa de vegetação  
462 foram registradas temperaturas médias do ar de 23°C, com máximas de 25°C e mínimas de  
463 9°C. Essa condição foi favorável ao desenvolvimento da doença, visto que *Pseudomonas* spp.  
464 são favorecidas com temperaturas de 20 a 25°C e alta umidade relativa do ar (Silva & Lopes,  
465 1995), sendo a umidade fornecida por regas periódicas.

466 No experimento não foram observados sintomas no tratamento controle inoculado com  
467 água destilada autoclavada. Nos demais tratamentos não houve interação significativa entre os  
468 isolados e os dias de avaliação (Tabela 8). Observou-se, de modo geral, evolução do sintoma  
469 da doença em todos os isolados, que apresentaram o maior comprimento da necrose na haste  
470 aos 30 dias após a inoculação (Figura 8). Os isolados UFU B39 (*P. corrugata*), UFU H24 (*P.*  
471 *putida*) apresentaram maior comprimento de lesão, seguidos dos isolados UFU G120 (*P.*  
472 *putida*), UFU H25 (*P. putida*), UFU H120 (*P. fluorescens*) (Tabela 8), como demonstrado nas  
473 Figuras 9 e 10. O isolado UFU H24 (*P. putida*) mostrou-se muito agressivo, com capacidade  
474 de causar sintomas externos de rachadura na haste, secamento da folha correspondente ao  
475 ponto de inoculação e murcha da planta nas horas mais quentes do dia (Figura 11), porém  
476 esses sintomas não foram usados como padrão de avaliação.

477 Em relação à AACPD, os isolados UFU B39 (*P. corrugata*) e UFU H24 (*P. putida*)  
478 apresentaram maior valor, portanto, maior severidade da doença, seguidos dos isolados UFU  
479 G120 (*P. putida*), UFU H120 (*P. fluorescens*), UFU H25 (*P. putida*), UFU E37 (*P. syringae*  
480 *pv. tomato*), UFU G9 (*P. putida*) e UFU I81 (*P. fluorescens*) (Tabela 9).

481 Com relação ao experimento com os isolados da folha do tomateiro, não foram  
482 observados sintomas no tratamento controle inoculado com água destilada autoclavada. Nos  
483 demais tratamentos não houve diferença na AACPD, sugerindo mesmo nível de agressividade  
484 dos isolados (Tabela 10). Os sintomas da doença não foram muito evidentes na face adaxial

485 da folha, observados apenas clorose com algumas pequenas lesões necróticas circulares com  
486 bordas amarelas (Figura 12), sendo encontradas na face abaxial da folha pequenas lesões  
487 circulares e encharcadas, que por vezes eram observadas nos pecíolos da folha (Figura 13).

488

489

## DISCUSSÃO

490

491 Bioquimicamente, os isolados caracterizados como *P. viridiflava*, foram confirmados  
492 como *P. syringae* pv. *tomato* pelo sequenciamento genético. Esses isolados apresentaram  
493 variação bioquímica nos testes de produção de levana negativa e atividade pectolítica positiva  
494 em discos de batata. Variações bioquímicas dos testes LOPAT são relatadas entre isolados de  
495 uma mesma espécie, pois segundo Schaad e et al. (2001), as reações positivas ou negativas  
496 definidas representam cerca de 80% dos isolados.

497

Os isolados de *syringae* pv. *tomato* também não amplificaram na PCR com os primers  
498 específicos para a espécie. Os primers utilizados são específicos para o gene *cfl*, responsável  
499 síntese da toxina coronatina, envolvido na reabertura dos estômatos após o fechamento em  
500 resposta aos padrões moleculares associados ao patógeno, além de interferir nas respostas  
501 mediadas pelo ácido salicílico após o início da infecção (Bereswill et al., 1994). Nesse  
502 sentido, novas investigações podem ser realizadas com Sequência de múltiplos locus (MLST),  
503 para verificar a presença do gene *cfl* nesses isolados, bem como outros genes envolvidos na  
504 infecção do tomateiro.

505

Na MLST de 216 isolados de *P. syringae*, fitopatogênicos e saprófitas, bem como as  
506 caracterizações bioquímicas, foram estudadas por Berge et al. (2014), sendo identificados 23  
507 grupos e 13 subgrupos. Segundo os autores, características fenotípicas raramente fornecem  
508 um meio satisfatório para a classificação de isolados da espécie, mesmo que algumas  
509 combinações sejam altamente prováveis em alguns filogrupos. Inferiram o sequenciamento do

510 gene cts (citrato sintase) com MLST, fornece com precisão a afiliação filogenética de isolados  
511 em 97%. E que caracteres fenotípicos, com exceção da oxidase e arginina dihidrolase, podem  
512 ser errôneos como um meio de classificar patovares de *P. syringae*, o que justifica o resultado  
513 deste trabalho.

514 A identidade dos isolados bioquimicamente caracterizados como *P. fluorescens* ou *P.*  
515 *putida* foi confirmada pelo sequenciamento genético, sendo este o primeiro relato das espécies  
516 no tomateiro no Brasil. Essas bactérias, antes caracterizadas como saprófitas de solo (Lelliot  
517 & Stead, 1987), já foram relatadas no tomateiro na Europa (Malathrakis & Goumas, 1987; Lo  
518 Cantore & Iacobellis, 2002; Saygili et al., 2004; Polizzi et al., 2007; Dimartino et al., 2011),  
519 não estando presentes na lista de Pragas Quarentenárias Ausentes (A1) do Ministério da  
520 Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa, 2018). As espécies foram identificadas em  
521 várias regiões produtoras, sendo *P. fluorescens* encontrada nos estados de São Paulo, Minas  
522 Gerais, Rio Grande do Sul e Pará e *P. putida* em Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Ceará,  
523 Espírito Santo, Paraná e Goiás.

524 Essa nova ocorrência é de extrema importância, visto que o Brasil está entre os dez  
525 maiores produtores mundiais de tomate (Faostat, 2019) e a necrose da medula causada por *P.*  
526 *fluorescens* ou *P. putida* é uma enfermidade grave, que pode reduzir significativamente a  
527 produtividade da cultura. Os sintomas incluem murcha das folhas inferiores que progridem  
528 para cima, necrose extensa da medula, clorose foliar, lesões marrom-escuras e fendas  
529 longitudinais nas hastes, crescimento de raízes adventícias e morte prematura da planta  
530 (Aiello et al., 2013). A sintomatologia é semelhante à necrose da medula causada por *P.*  
531 *corrugata* e podendo ser confundidos em campo com os sintomas ocasionados por *Fusarium*  
532 *oxysporum* Schlecht (Quezado-Duval et al., 2007; Dimartino et al., 2011).

533 Os isolados UFU D18 e UFU H24, não classificados pelos testes bioquímicos, foram  
534 confirmados pelo sequenciamento genético como *P. putida*. A mesma inferência supracitada,



535 feita aos isolados de *P. syringae* pv. *tomato*, de que variações bioquímicas de testes LOPAT  
536 podem ocorrer em cerca de 20% de isolados de fitobactérias do gênero *Pseudomonas* (Schaad  
537 et al., 2001), justifica essa variação.

538 A análise molecular por rep-PCR evidenciou alta diversidade genética entre os  
539 isolados de *Pseudomonas* spp. O resultado deste trabalho corrobora o estudo realizado por  
540 Achouak et al. (2000). Os autores avaliaram com ERIC-PCR a diversidade de 236 isolados de  
541 *P. corrugata* provenientes de dois solos na França e encontraram alta diversidade genética,  
542 com 55 padrões genômicos. As variações moleculares foram atribuídas aos diferentes  
543 sistemas de manejo da cultura do tomate.

544 Isolados de *P. putida*, saprófitas de solo com capacidade de biodegradação do  
545 herbicida atrazina, coletados de solo com diferentes culturas anuais de várias regiões do  
546 Brasil, tiveram sua diversidade genética avaliada por ERIC-PCR (Fernandes, 2014). A autora  
547 encontrou alta diversidade genética entre os 20 isolados testados, com similaridades abaixo de  
548 60% e subgrupos com cerca de 50% de similaridade, mesmo quando provenientes do mesmo  
549 local de origem. Esse resultado indicou que os isolados eram geneticamente distintos, o que  
550 corrobora com este trabalho.

551 Com resultado divergente deste estudo, o trabalho realizado por Aiello et al (2013)  
552 encontrou padrões semelhantes de amplificação com os primers ERIC e BOX-PCR para  
553 isolados de *P. putida* e *P. fluorescens* do tomateiro oriundos de plantios na Itália, inferindo  
554 baixa diversidade genética entre isolados.

555 Alguns isolados provenientes de locais distintos foram molecularmente 100%  
556 similares, como nos casos dos isolados de *P. fluorescens* UFU G38 e UFU G18 por REP-PCR  
557 e isolados de *P. syringae* pv. *tomato* UFU H11 e UFU H175 por REP e BOX-PCR. Os  
558 isolados de *P. putida* UFU G90 e *P. fluorescens* UFU H120 também apresentaram o mesmo  
559 padrão de banda por ERIC-PCR. Essa conformidade ocorre por compartilharem as mesmas

560 famílias de sequências de DNA repetitivas e altamente conservadas no genoma, apesar da  
561 distância geográfica de suas populações, ou mesmo, por apresentarem estreito relacionamento  
562 filogenético, apesar de serem espécies diferentes.

563 Embora a distância geográfica influencie na variação e na estrutura genética das  
564 populações de fitobactérias, devido à redução do fluxo gênico, em poucos isolados foi  
565 possível correlacionar os subgrupos similares obtidos por rep-PCR com o local de origem das  
566 amostras. Contudo, é importante ressaltar que a capacidade natural de troca de material  
567 genético por meio de transferência horizontal de genes durante os processos de infecção  
568 contribui para alta diversidade genética (Albuquerque et al., 2013; Bertola et al., 1999).

569 Com rep-PCR, Alippi et al. (2003) também encontraram considerável diversidade  
570 genética entre isolados de *P. corrugata* e *P. viridiflava*, com formação de 16 e 15 padrões de  
571 bandas, respectivamente. Foram observadas as formações de subgrupos com similaridades  
572 superiores a 55%, relacionados ao local de origem em ambos os casos, o que também foi  
573 semelhante neste estudo.

574 As espécies *P. putida* e *P. fluorescens* demonstram a capacidade de ocasionar não  
575 somente necrose na haste, mas também lesões nas folhas do tomateiro. *P. putida* pode ainda  
576 ser relatada como causadora de sintomas no fruto, pois o isolado UFU G121 foi proveniente  
577 de fruto com sintoma da doença.

578 A PCR realizada com os primers XylR-F1 e XylR-R1, específicos para *P. putida*, não  
579 confirmaram a identidade de nenhum dos isolados confirmados pelo sequenciamento  
580 genético. Esses primers foram desenhados para isolados relatados como saprófitas de solo  
581 (Kuske et al., 1998). Nesse contexto, pressupõe-se que, em algum momento, as  
582 recombinações genéticas, seja por interações com outros microrganismos ou adaptações ao  
583 patossistema, fizeram com que essa espécie se tornasse fitopatogênica. Ou seja, as sequências  
584 desenhadas nos primers XylR-F1 e XylR-R1 não são complementares com a sequência alvo

585 de interesse da espécie fitopatogênica, justificando, assim, a não amplificação de bandas na  
586 PCR.

587 Geralmente, *Pseudomonas* spp. são habitantes comuns das partes aéreas das plantas,  
588 solo e rizosfera, e são capazes de atuar como bactérias antagônicas benéficas contra vários  
589 fitopatógenos, sendo frequentemente usadas nas estratégias de controle biológico  
590 (Lugtemberg & Kamilova, 2009). Contudo, alguns isolados de *P. fluorescens* e *P. putida*  
591 podem apresentar atividade patogênica, por razões ainda desconhecidas, tornando-se  
592 patogênicas ou interagindo sinergicamente com outros patógenos, aumentando a gravidade da  
593 doença (Aiello et al., 2017).

594 O aumento da incidência das espécies relatadas na Itália em 2006 foi atribuído às  
595 mudanças nas práticas culturais do tomateiro após a eliminação do uso de brometo de metila.  
596 Apesar de benéficas do ponto de vista ambiental, as alterações favoreceram o  
597 desenvolvimento de problemas fitopatológicos (Dimartino et al., 2011). Além disso,  
598 condições ambientais específicas de alta umidade, alta salinidade, mudanças de temperatura e  
599 excesso de adubação nitrogenada são apontadas como benéficas para desenvolvimento de  
600 espécies oportunistas (Lo Cantore & Iacobellis, 2002).

601 A severidade da necrose da medula em plantas de tomateiro inoculadas com *P.*  
602 *fluorescens* ou *P. putida* foi significativamente maior quando submetido ao estresse salino  
603 (Dimartino et al., 2011). Segundo os autores, a indução do estresse na planta aumenta os  
604 sintomas da doença com danos severos e consequências para a produção de tomate.

605 O fato é que, ainda não foram desvendadas as razões pelas quais essas espécies têm se  
606 comportado como fitopatogênicas. São necessários estudos mais aprofundados de filogenia,  
607 comparando isolados de *P. putida* e *P. fluorescens*, tanto oportunistas de solo como  
608 fitopatogênicos, para verificar alterações no DNA que as tornaram capazes de infectar plantas.  
609 Isso seria possível, visto que as sequências de nucleotídeos do DNA na região que codifica o

610 gene 16S rRNA é considerada conservada entre as bactérias, mas, ao mesmo tempo, com  
611 variabilidade e quantidade de informações suficientes para revelar, claramente, as relações  
612 filogenéticas e evolucionárias entre as espécies (Woese & Fox, 1977 apud Carvalho Netto,  
613 2007).

614 No sequenciamento genético, os isolados classificados em *P. fluorescens* foram  
615 comparados ao genoma completo da cepa F113, acesso CP003150 (NC\_016830.1) (NCBI,  
616 2019b), depositado no GenBank em 2012 por Redonho-Nieto et al. (2012). O isolado foi  
617 obtido da rizosfera da beterraba em 1992 por Shanahan et al. Esse isolado é considerado  
618 modelo para estudos da colonização de rizosferas de plantas (Villacieros et al., 2003;  
619 Barahona et al., 2010). Foi relatada também sua atividade de biocontrole contra fitopatógenos,  
620 como *Pythium ultimum* Trow, *Phytophthora cactorum* Lebert & Cohn e *F. oxysporum* em  
621 culturas incluindo beterraba (Fenton et al., 1992), tomate e morango (Baharona et al., 2011),  
622 sendo também antagônica ao nematóide do cisto da batata *Globodera rostochiensis*  
623 (Wellemweber) Mulvey & Ston (Cronin et al., 1997), com atividade de biocontrole ligada à  
624 produção de metabólitos secundários, incluindo diacetilfloroglucinol (DAPG) e cianeto de  
625 hidrogênio. O genoma completo do isolado possui um tamanho de 6,8 Mb e genes que  
626 codificam proteínas de promoção de crescimento de plantas e características de biocontrole  
627 (Redonho-Nieto et al., 2012).

628 Os isolados classificados como *P. putida* foram comparados ao genoma completo da  
629 cepa KT2440 de *P. putida*, acesso AE015451 (NC\_002947.4) (NCBI, 2019c), depositado no  
630 GenBank em 2001 por Nelson et al. (2002). O isolado caracterizado pelos autores é saprófita  
631 do solo proveniente do Japão, obtido por Nakazawa (2002) como uma linhagem capaz de  
632 degradar ácido meta-toluico e com perspectivas de uso para biorremediação e produção de  
633 bioplásticos. Possui um genoma de 6,18 Mb e alto grau de similaridade com cepas de *P.*  
634 *aeruginosa* (85% das regiões são compartilhadas). No entanto, fatores de virulência, como

635 genes de exotoxina e sistemas de secreção do tipo III, estão ausentes, o que torna esse isolado  
636 de natureza não patogênica (Nelson et al., 2002).

637 No banco de dados do National Center for Biotechnology Information não há  
638 sequenciado nenhum isolado de *P. fluorescens* e *P. putida* com capacidade fitopatogênica,  
639 apenas isolados saprófitas com capacidade de promoção de crescimento em plantas,  
640 biorremediação, biocontrole ou com uso na indústria (NCBI, 2019b; 2019c). O fato é que  
641 quando comparado os isolados deste trabalho aos depositados no GenBank, acessos  
642 CP003150 e AE015451, não foram obtidas similaridades de 100%. Mesmo assim, pode-se  
643 chegar à conclusão que se tratam-se de *P. putida* ou *P. fluorescens*, confirmadas também  
644 pelos testes bioquímicos (Tabela 5). Além disso, deve-se considerar que os isolados estudados  
645 apresentaram alta variação molecular por rep-PCR (Figura 7).

646 Com a caracterização de biovars dos isolados *P. putida* infere-se que não houve  
647 nenhum isolado que se assemelhasse à biovar B. É provável que os isolados não determinados  
648 sejam da biovar A, com pequenas variações bioquímicas ou novas biovars ainda não  
649 descritas.

650 Em relação à agressividade na haste do tomateiro, o isolado de *P. corrugata* (UFU  
651 B39) foi considerado como referência positiva para o experimento, pois a ocorrência de  
652 necrose da medula, ocasionada pela espécie no tomateiro, já foi relatada no Brasil (Rodrigues  
653 Neto et al., 1989; Martins et al., 1990; Quezado-Duval et al., 2007) e, juntamente com o  
654 isolado UFU H24 de *P. putida*, mostraram-se os mais agressivos. É importante observar que o  
655 isolado UFU H24 foi o único isolado de *P. putida* com HR positivo, sendo visivelmente mais  
656 agressivo que os outros devido ao aparecimento de necrose no sentido ascendente ao ponto de  
657 inoculação (Figura 09A) e de sintomas externos de rachaduras na haste e murcha nas horas  
658 mais quentes do dia (Figura 11). Segundo Aiello et al. (2013), os sintomas ocasionados por *P.*

659 *putida* podem progredir para fendas longitudinais nas hastes e crescimento de raízes  
660 adventícias.

661 Diante disso, pressupõe-se que o isolado UFU H24 apresenta os mesmos genes  
662 efetores de virulência que outros isolados da espécie, porém com maior afinidade para  
663 ocasionar enfermidade no tomateiro. Isso ocorre, provavelmente, devido ao polimorfismo de  
664 genes efetores relatado em espécies fitopatogênicas, ocasionados por evolução natural ou  
665 transferência de material genético (Castanho, 2017), o que justifica o isolado ocasionar HR  
666 positivo em plantas de fumo e sem mais agressivo na haste do tomateiro.

667 Os isolados UFU G120 (*P. putida*), UFU H120 (*P. fluorescens*), UFU H25 (*P. putida*),  
668 UFU E37 (*P. syringae* pv. *tomato*), UFU G9 (*P. putida*) e UFU I81 (*P. fluorescens*) também  
669 apresentaram considerável nível de agressividade, com descoloração vascular (Figuras 9B e  
670 10B), porém, diferente dos sintomas de extensa necrose da medula observado nos isolados  
671 UFU B39 (*P. corrugata*) e UFU H24 (*P. putida*) (Figuras 9A e 10A). Os outros isolados  
672 testados na haste apresentaram apenas pequeno escurecimento nos tecidos vasculares (Figura  
673 9C).

674 Variação semelhante na agressividade de isolados de *P. putida*, *Pseudomonas*  
675 *citronellolis* Seubert, *P. marginalis* e *P. fluorescens*, também foi observada por Aiello et al  
676 (2013) em plantas de tomate na região da Sicília, na Itália. Os autores mantiveram as plantas  
677 por 90 dias em estufa e observaram que o comprimento da lesão variou de acordo com o  
678 isolado. Os sintomas nos locais de inoculação foram observados para cima até o ápice e para  
679 baixo até as raízes, bem como extensa necrose da medula e descoloração vascular e,  
680 ocasionalmente, clorose de folhas basais, murcha e morte das plantas.

681 Com os resultados obtidos não é possível afirmar qual espécie, *P. putida* ou *P.*  
682 *fluorescens*, ou qual biovar é mais agressivo, visto que os resultados de agressividade foram  
683 variáveis e foi identificado apenas *P. putida* bv. A. Diamartino et al. (2011), demonstrou que,

684 em condições de salinidade no solo, *P. fluorescens* bv. I é mais agressivo que *P. putida* bv. A  
685 por aumentar a severidade da necrose com extensa descoloração vascular.

686 Quanto aos isolados testados em folha, não foi observada variação da agressividade,  
687 mesmo quando comparados os isolados de *P. putida* e *P. fluorescens* aos isolados de *P.*  
688 *syringae* pv. *tomato*, patovar relatado como agente causal da pinta bacteriana. Pode-se afirmar  
689 que todos os isolados testados foram pouco agressivos, pois com a evolução da pinta  
690 bacteriana é relatado que as lesões tornam-se necróticas, circulares ou irregulares, de coloração  
691 pardo-escura a preta com halo amarelado, podendo coalescer, sendo que os pedúnculos  
692 também podem apresentar manchas escuras (Kurozawa & Pavan, 2005). Neste trabalho,  
693 mesmo em condições controladas e favoráveis à *Pseudomonas* spp., não foram observados  
694 sintomas tão evidentes nas folhas, visto que as lesões se mantiveram encharcadas até 18 dias  
695 após a inoculação e não coalesceram ou secaram as folhas.

696 Outro fato observado, porém, não utilizado como critério de avaliação, foi que  
697 algumas amostras de plantas de tomate com sintomas de lesões foliares ou necrose da medula  
698 foi possível o isolamento de outro gênero de fitobactéria. Nas amostras foliares, dos isolados  
699 de *P. syringae* pv. *tomato*, UFU H11 e UFU H175, foram observados sintomas de mancha  
700 bacteriana, sendo detectada a presença de *Xanthomonas* spp. (Bergey) Dowson. Na amostra  
701 do isolado UFU G90, caracterizado como *P. putida*, também foi feito o isolamento de de  
702 *Xanthomonas* sp.

703 Esse fato justifica, em parte, a baixa agressividade dos isolados de *P. syringae* pv.  
704 *tomato* avaliados em folha (UFU E36, UFU H11 e UFU H175), visto que a mancha  
705 bacteriana, ocasionada por *Xanthomonas* spp., é mais comumente encontrada em regiões de  
706 clima tropical e causa perdas mais consideráveis em campo quando comparada à pinta  
707 bacteriana ocasionada por *Pseudomonas* spp. Apesar da pinta bacteriana ser uma doença  
708 economicamente importante para o tomateiro, podendo causar perdas de até 30% na

709 produção, exige condições específicas, com temperaturas de 20 a 25°C e alta umidade relativa  
710 do ar (Silva & Lopes, 1995).

711 Em amostras de tomateiro com necrose da medula causada por *P. putida*, dos isolados  
712 UFU G8, UFU H21, UFU H22, UFU H30, UFU H31, UFU H41 e UFU H46, foi feito  
713 também o isolamento de *Pectobacterium* sp. (Jones) Waldee. Na amostra onde foi  
714 identificado o isolado UFU H24, foi isolada a espécie *Ralstonia solanacearum* (Smith)  
715 Yabuuchi et al. Nas amostras dos isolados UFU H18 e UFU H25, foram detectadas *R.*  
716 *solanacearum* e *Pectobacterium* sp.

717 O isolado UFU I81 de *P. fluorescens* também apresentou efeito sinérgico com outra  
718 fitobactéria, sendo confirmada a presença de *R. solanacearum*. Além disso, foi verificada a  
719 presença de *P. fluorescens* e *P. putida* na mesma amostra, isolados UFU G18 e UFU G6,  
720 respectivamente.

721 Sendo assim, as plantas podem ser infectadas ao mesmo tempo por mais de uma  
722 espécie patogênica e, enquanto uma infecção simples por microrganismo pode não resultar em  
723 ocorrência da doença, a co-infecção com outra espécie pode levar ao desenvolvimento de  
724 sintomas graves devido à interações sinérgicas (Aiello et al., 2015). Na necrose da medula do  
725 tomate já foram relatadas interações entre duas ou mais fitobactérias, aumentando a  
726 severidade da doença. Dentre essas interações, podem ser citadas co-infecções causada por *P.*  
727 *fluorescens* e *P. corrugata* (Molan & Ibrahim, 2007), *P. marginalis* e *P. corrugata* (Kudela et  
728 al., 2010), *P. fluorescens*, *P. viridiflava* e *P. corrugata* (Pekhtereva et al., 2009) e *P.*  
729 *corrugata* e *P. mediterranea* Catara et al. (Moura et al., 2005).

730 Além de interações entre espécies do gênero *Pseudomonas*, já foram relatadas  
731 interações entre *Xanthomonas perforans* Jones et al. e *Pseudomonas* spp (Aiello et al., 2013).  
732 As associações entre *X. perforans* com *P. fluorescens* ou *P. putida* ou *P. marginalis* ou *P.*  
733 *citronellolis* ou *P. straminea* ou *Pantoea agglomerans* (Beijerinck) Gavini et al. ou



734 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (van Hall) Hauben et al. foram capazes de  
735 induzir descoloração vascular no tomateiro. Em trabalho posterior, Aiello et al. (2017)  
736 avaliaram a co-inoculação das espécies de *Pseudomonas* spp. supracitadas com *X. perforans* e  
737 verificaram que o comprimento das lesões de necrose medular foi significativamente  
738 aumentado quando as espécies foram co-inoculadas, comprovando sinergismo entre as  
739 espécies.

740 Ressalta-se que, durante a infecção fitopatogênica a associação entre espécies  
741 influencia o comportamento do patógeno (Aiello et al., 2017), sendo essas interações pouco  
742 investigadas, mas que precisam ser analisadas devido ao risco de surgimento de novas  
743 fitobactérias que podem se tornar sérios problemas na cultura. Nesse sentido, novos estudos  
744 avaliando as interações sinérgicas dos isolados de *Pseudomonas* com outros gêneros de  
745 fitobactérias na cultura do tomateiro precisam ser realizados.

746 Desse modo, conclui-se que os isolados de *Pseudomonas* spp. estudados apresentaram  
747 pouca variação morfológica, muita variação bioquímica e molecular, bem como diferentes  
748 níveis de agressividade na haste do tomateiro. Este é o primeiro relato de *P. putida* e *P.*  
749 *fluorescens* causando doença em tomateiro tutorado no Brasil.

750

751

## REFERÊNCIAS

752

753 Achouak W, Thiéry JM, Roubaud P, Heulin T (2000) Impact of crop management on  
754 intraespecific diversity of *Pseudomonas corrugata* in bulk soil. FEMS Microbiology Ecology  
755 31, 11-9. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00666.x>. Disponível em:  
756 <https://academic.oup.com/femsec/article/31/1/11/531433>. Acesso em 14 de junho de 2019.

757

758 Aiello D, Ferrante P, Vitale A, Polizzi G, Scortichini M, Cirvilleri G (2015) Characterization  
759 of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from mango in Sicily and occurrence of  
760 copper-resistant strains. *Journal of Plant Pathology* 97: 273-282. DOI:  
761 <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I2.015>. Disponível em:  
762 <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3319>. Acesso em 18 de agosto de  
763 2019.

764

765 Aiello D, Scuderi G, Vitale A, Firrao G, Polizzi G, Cirvilleri G (2013) A pith necrosis caused  
766 by *Xanthomonas perforans* on tomato plants. *European Journal of Plant Pathology* 137: 29-  
767 41. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0214-7>. Disponível em:  
768 <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10658-013-0214-7>. Acesso em 6 de setembro  
769 de 2019.

770

771 Aiello D, Vitale A, La Ruota, AD, Polizzi G, Cirvilleri G (2017) Synergistic interactions  
772 between *Pseudomonas* spp. and *Xanthomonas perforans* in enhancing tomato pith necrosis  
773 symptoms. *Journal of Plant Pathology* 99: 731-740. DOI:  
774 <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3957>. Disponível em:  
775 <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3957>. Acesso em 14 de junho de  
776 2019.

777

778 Alfenas AC, Mafia RG (2007) Métodos em fitopatologia. Viçosa, MG. UFV.

779

780 Albuquerque GMR (2013) Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia Solanacearum*  
781 raça 2. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

782

- 783 Alippi AM, Dal Bo E, Ronco LB, Lopez MV, Lopez AC, Aguilar OM (2003) *Pseudomonas*  
784 populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. *Plant*  
785 *Pathology* 52: 287-302. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00850.x>. Disponível  
786 em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-3059.2003.00850.x>.  
787 Acesso em 18 de agosto de 2019.
- 788
- 789 Andrade CCL, Resende RS, Rodrigues FA, Silveira PR, Rios JA, Oliveira JR, Mariano RLR  
790 (2013) Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de  
791 enzimas de defesa. *Tropical Plant Pathology* 38: 28-34.  
792 DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013000100004>. Disponível em:  
793 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1982-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-56762013000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)  
794 [56762013000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-56762013000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=en). Acesso em 2 de dezembro de 2019.
- 795
- 796 Barahona E, Navazo A, Martínez-Granero F, Zea-Bonilla T, Pérez-Jiménez RM, Martín M,  
797 Rivilla R (2011) *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive  
798 colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Applied*  
799 *and Environmental Microbiology* 77: 5412-5419. DOI: [https://doi.org/10.1128/AEM.00320-](https://doi.org/10.1128/AEM.00320-11)  
800 [11](https://doi.org/10.1128/AEM.00320-11). Disponível em: <https://aem.asm.org/content/77/15/5412>. Acesso em 18 de agosto de 2019.
- 801
- 802 Barahona E, Navazo A, Yousef-Coronado F, Cárcer DA, Martínez-Granero F, Espinosa-Urgel  
803 M, Martín M, Rivilla R (2010). Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas*  
804 *fluorescens* F113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environmental*  
805 *Microbiology* 12: 3185-3195. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02291.x>.  
806 Disponível em: [https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-](https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-2920.2010.02291.x)  
807 [2920.2010.02291.x](https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-2920.2010.02291.x). Acesso em 14 de junho de 2019.

808 Bereswill S, Bugert P, Volksch B, Ullrich M, Bender CL, Geider K (1994) Identification and  
809 relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and  
810 sequence determination of the amplification products. Applied and Environmental  
811 Microbiology 60: 2924-2930. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.60.8.2924-2930.1994>.  
812 Disponível em: <https://aem.asm.org/content/60/8/2924>. Acesso em 22 de julho de 2019.

813

814 Berge O, Monteil CL, Bartoli C, Chandeysson C, Guilbaud C, Sands DC, Morris CE  
815 (2014) A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its  
816 application to classifying strains in this phylogenetic complex. Plos One 9: 1-15. DOI:  
817 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105547>. Disponível em:  
818 <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0105547>. Acesso em 20 de  
819 novembro de 2019.

820

821 Beriam LOS (2007) Doenças bacterianas em hortaliças. Biológico 69: 81-84.

822

823 Bertolla F, Frostegard A, Brito B, Nesme X, Simonet P (1999) During infection of its hosts,  
824 the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and  
825 exchanges genetic material. Molecular Plant-Microbe Interactions 5: 467-472. DOI:  
826 <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.5.467>. Disponível em:  
827 <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI.1999.12.5.467>. Acesso em 18 de agosto de  
828 2019.

829

830 Campbell CL, Madden LV (1990) Introduction to plant disease epidemiology. New York.  
831 John Wiley.

832

833 Carvalho Netto OV (2007) Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça  
834 por sequenciamento do gene 16S rDNA. Dissertação de mestrado, Escola Superior de  
835 Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba- SP.

836

837 Castanho FM (2017) Caracterização estrutural e polimorfismo de genes candidatos à efetores  
838 de *Phakopsora pachyrhizi*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Norte do  
839 Paraná. Bandeirantes- PR.

840

841 Catara V, Arnold D, Cirvilleri G, Vivian A (2000) Specific oligonucleotide primers for the  
842 rapid detection of the causal agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugata*: evidence  
843 for two genomic groups. *European Journal of Plant Pathology*106: 753-762. DOI:  
844 <https://doi.org/10.1023/A:1026507423848>. Disponível em:

845 <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1026507423848>. Acesso em 14 de junho  
846 de 2019.

847

848 Costa SB, Ferreira MASV, Lopes CA (2007) Diversidade patogênica e molecular de  
849 *Ralstoniasolanacearum* da região amazônica brasileira. *Fitopatologia Brasileira* 32: 285-294.  
850 DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000400002>. Disponível em:

851 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-)

852 [41582007000400002&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582007000400002&lng=pt&tlng=pt). Acesso em 12 de outubro de 2019.

853

854 Cronin D, Moenne-Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling DN, O'gara F (1997) Role of  
855 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with  
856 the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*

857 63: 1357-1361. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.63.4.1357-1361.1997>. Disponível em:  
858 <https://aem.asm.org/content/63/4/1357>. Acesso em 14 de junho de 2019.

859

860 Cruz CD (2006) *Programa Genes: análise multivariada e simulação*. Viçosa: UFV. 175p.

861 Ferreira DF (2010) SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.10. Lavras, MG.  
862 UFLA.

863

864 Dimartino M, Panebianco S, Vitale A, Castello I, Leonardi C, Cirvilleri G, Polizzi G (2011)  
865 Occurrence and pathogenicity of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* on tomato plants in  
866 Italy. *Journal of Plant Pathology* 93: 79-87. DOI: <https://doi.org/10.1400/169640>. Disponível  
867 em: <https://www.torrossa.com/en/resources/an/2466167>. Acesso em 18 de agosto de 2019.

868

869 Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O'Callaghan M, O'Gara F (1992) Exploitation of gene  
870 (s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability  
871 to a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3873-3878. DOI:  
872 <https://doi.org/10.1128/AEM.58.12.3873-3878.1992>. Disponível em:  
873 <https://aem.asm.org/content/58/12/3873>. Acesso em 11 de dezembro de 2019.

874

875 Fernandes AFT (2014) Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudomonas*  
876 spp. envolvidas na biodegradação da atrazina. Dissertação de mestrado, Faculdade de  
877 Ciências Farmaceuticas de Ribeirão Preto- Universidade Federal de São Paulo. Ribeirao Preto,  
878 SP.

879

880 Food and Agriculture Organization of the United Nations- Faostat. Statistic of agricultural  
881 production 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso  
882 em 21 de novembro de 2019.

883

884 Hamedan E, Harighi B (2014) Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*  
885 strains, causing bacterial stem blight disease of alfalfa in the kurdistan province of Iran.  
886 Journal of Plant Pathology, v. 96: 303-307. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V96I2.030>.  
887 Disponível em: <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3131>. Acesso em  
888 14 de junho de 2019.

889

890 Hoeferinc (2019) Hoefer modelo Macro Vue UV-20. Disponível em:  
891 <http://www.hoeferinc.com/media/PDFs/Manuals/UV20-IMC0-Portuguese.pdf>. Acesso em 04  
892 de novembro de 2019.

893

894 Ibm Corp (2011) SPSS, Statistics for Windows. Version 20.0. New York, EUA. Armonk.

895

896 Jaunet TX, Wang JF (1999) Variation in genotype and aggressiveness diversity of *Ralstonia*  
897 *solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. Phytopathology 89: 320-327. DOI:  
898 <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.4.320>. Disponível em:  
899 <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.1999.89.4.320>. Acesso em 18 de agosto de  
900 2019.

901

902 Jones PR, Cottrell MT, Kirchman DL, Dexter SC (2006) Marine bacterial biofilms on  
903 stainless steel and polycarbonate. Microbial Ecology 53: 153-162. DOI:  
904 <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9154-5>. Disponível em:

905 <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00248-006-9154-5>. Acesso em 6 de junho de  
906 2019.

907

908 Kado EI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*,  
909 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.

910 DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-969>. Disponível em:

911 <https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Abstracts/P>  
912 [hyto60\\_969.htm](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Abstracts/P). Acesso em 14 de junho de 2019.

913

914 Kross RK, Cavalcanti-Mata MERM, Braga EM (2001) Influência da epiderme do tomate  
915 (*Lycopersicon esculentum* L.) na transferência de massa durante o tratamento osmótico. In:  
916 Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Resumos... Campinas, SP. UNICAMP.

917

918 Kudela V, Krejzar V, Pánková I (2010) *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas*  
919 *marginalis* associated with the collapse of tomato plants in rockwool slab hydroponic culture.

920 *Plant Protection Science* 46: 1-11. DOI: <https://doi.org/10.17221/44/2009-PPS>. Disponível

921 em: <https://www.agriculturejournals.cz/web/pps.htm?volume=46&firstPage=1&type=publish>  
922 ed Article. Acesso em 1 de julho de 2019.

923

924 Kurozawa C, Pavan MA (2005) Doenças do tomateiro. In: Kimati H, Amorim L, Bergamin  
925 Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (Ed.). *Manual de fitopatologia: doenças das plantas*  
926 *cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres 2: 607-626.

927

928 Kuske CR, Banton KL, Adorada DL, Stark PC, Hill KK, Jackson PJ (1998) Small-scale DNA  
929 sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil.



- 930 Applied and Environmental Microbiology 64: 2463-2472. DOI:  
931 <https://doi.org/10.1128/AEM.64.7.2463-2472.1998>. Disponível em:  
932 <https://aem.asm.org/content/64/7/2463>. Acesso em 14 de junho de 2019.  
933
- 934 Lelliott RA, Stead DE (1987) Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.  
935 Oxford. Blackwell Scientific Publications.  
936
- 937 Lo Cantore P, Iacobellis NS (2002) Necrosi corticale e delmidollo del pomodoro causata da  
938 *Pseudomonas fluorescens* in Puglia. Informatore Fitopatologico 52: 54-57.  
939
- 940 Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, Bruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints of  
941 phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* strains generated with repetitive sequences  
942 and PCR. Applied and Environmental Microbiology 60: 2286-2295. DOI:  
943 <https://doi.org/10.1128/AEM.60.7.2286-2295.1994>. Disponível em:  
944 <https://aem.asm.org/content/60/7/2286>. Acesso em 18 de agosto de 2019.  
945
- 946 Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. Annual Review of  
947 Microbiology 63: 541-556. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>.  
948 Disponível em:  
949 <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>. Acesso em 6  
950 de junho de 2019.  
951
- 952 Malathrakis NE, Goumas DE (1987) Bacterial soft rot of tomato in plastic greenhouses in  
953 Crete. Annals of Applied Biology 111: 115-123. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744->

- 954 7348.1987.tb01438.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744->  
955 7348.1987.tb01438.x. Acesso em 11 de junho de 2019.
- 956
- 957 Mariano RLR, Silveira EB (2005) Manual de práticas em fitobacteriologia. 2.<sup>a</sup> Ed. Recife, PE.  
958 Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- 959
- 960 Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G, Catroux G  
961 (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods.  
962 *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2354-2359. DOI:  
963 <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2354-2359.2001>. Disponível em:  
964 <https://aem.asm.org/content/67/5/2354>. Acesso em 14 de junho de 2019.
- 965
- 966 Martins OM, Couto ME, Patella AEC (1990) Occurrence of *Pseudomonas corrugata* on  
967 tomato in Rio Grande do Sul, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 15: 125.
- 968
- 969 Mello SC, Takatsu A, Lopes CA (1997) Escala diagramática para avaliação da mancha-  
970 bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 22: 447-448.
- 971
- 972 Michereff S (2001) Fundamentos de Fitopatologia. Recife, PE. Universidade Federal de  
973 Pernambuco. Apostila.
- 974
- 975 Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento- MAPA (2018) Pragas Quarentenárias  
976 Ausentes – PQA. Instrução Normativa nº 39, de 1 de outubro de 2018 D.O.U nº 190, Seção 1,  
977 pgs. 11-14, 2/10/2018. Disponível em: [http://www.in.gov.br/materia/-](http://www.in.gov.br/materia/)

- 978 /asset\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43460217/doi-10.1094/PD-91-0110B. Acesso em 04 de novembro de 2019.
- 979 n-39-de-1-de-outubro-de-2018-43460055. Acesso em 04 de novembro de 2019.
- 980
- 981 Molan Y, Ibrahim Y (2007) First report of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pith necrosis
- 982 caused by *Pseudomonas fluorescens* and *P. corrugata* in the Kingdom of Saudi Arabia. Plant
- 983 Disease 91: 110. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-91-0110B>. Disponível em:
- 984 <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PD-91-0110B>. Acesso em 18 de agosto de 2019.
- 985
- 986 Monteiro FP, Ogoshi C, Becker WF, Wamser AF, Valmorbida J (2019) Pith necrosis
- 987 associated with *Pseudomonas viridiflava* in tomato plants in Brazil. Plant Pathology &
- 988 Quarantine 9: 1-5. DOI: 10.5943/ppq/9/1/1. Disponível em:
- 989 [https://plantpathologyquarantine.org/pdf/PPQ\\_9\\_1\\_1.pdf](https://plantpathologyquarantine.org/pdf/PPQ_9_1_1.pdf). Acesso em: 10 jan. 2020.
- 990
- 991 Moura ML, Jacques LA, Brito LM, Mourao IM, Duclos J (2005) Tomato pith necrosis caused
- 992 by *P. corrugate* and *P. mediterranea*: severity of damages and crop loss assessment. Acta
- 993 Horticulturae 695: 365-372. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.45>.
- 994 Disponível em: [https://www.actahort.org/books/695/695\\_45.htm](https://www.actahort.org/books/695/695_45.htm). Acesso em 14 de junho de
- 995 2019.
- 996
- 997 Nakatani AK, Lopes R, Camargo LEA (2009) Variabilidade genética de *Xanthomonas*
- 998 *axonopodis* pv. *passiflorae*. Summa Phytopathologica 35: 116-120. DOI:
- 999 <https://doi.org/10.1590/S0100-54052009000200006>. Disponível em:
- 1000 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052009000200006&lng=pt&tlng=pt)
- 1001 [54052009000200006&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052009000200006&lng=pt&tlng=pt). Acesso em 22 de setembro de 2019.

- 1002 Nakazawa, T. (2002) Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. Environmental  
1003 Microbiology, 5: 1. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00310.x>. Disponível em:  
1004 <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1462-2920.2002.00310.x>.  
1005 Acesso em 14 de outubro de 2019.
- 1006
- 1007 National Center for Biotechnology Information- NCBI (2019a) Nucleotide Blast. Disponível  
1008 em:  
1009 [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=Microbi](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=Microbi)  
1010 [alGenomes](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=Microbi). Acesso em 04 de novembro de 2019.
- 1011
- 1012 National Center for Biotechnology Information- NCBI (2019b) *Pseudomonas fluorescens*.  
1013 Disponível em:  
1014 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=136843&lvl>  
1015 [=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=136843&lvl). Acesso em 04 de dezembro de 2019.
- 1016
- 1017 National Center for Biotechnology Information- NCBI (2019c) *Pseudomonas putida*.  
1018 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax>.  
1019 [cgi?mode=Tree&id=136845&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax). Acesso em 04 de  
1020 dezembro de 2019.
- 1021
- 1022 Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos, VA, Fouts DE,  
1023 Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J,  
1024 Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris Lee, P, Holtzapple E,  
1025 Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler  
1026 H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen J, Timmis KN,

- 1027 Dusterhoft A, Tummler B, Fraser CM (2002) Complete genome sequence and comparative  
1028 analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental*  
1029 *Microbiology* 4: 799-808. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>.  
1030 Disponível em: [https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046-j.1462-](https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x)  
1031 [2920.2002.00366.x](https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x). Acesso em 14 de junho de 2019.
- 1032
- 1033 Paradela AL, Scachetti AP, Munhoz R, Borim Junior N, Calafiori MH, Galli MA (2001)  
1034 Eficiência de Bion (acibenzolar-s-methyl) como indutor de resistência para o complexo  
1035 bacteriano (*Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Clavibacter*  
1036 *michiganense* pv. *michiganense*) e insetos vetores na cultura do tomate (*Lycopersicon*  
1037 *esculentum* L.). *Revista Ecosystema* 26: 17-22.
- 1038
- 1039 Pekhtereva ES, Kornev KP, Matveeva EV, Polityko VA, Budenkov NI, Ignatov AN, Schaad  
1040 NW (2009) Pith necrosis of tomato in Russia. *Acta Horticulturae* 808: 251-253. DOI:  
1041 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.808.38>. Disponível em:  
1042 [https://www.actahort.org/books/808/808\\_38.htm](https://www.actahort.org/books/808/808_38.htm). Acesso em 18 de agosto de 2019.
- 1043
- 1044 Promega Corporation (2019) Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Disponível em:  
1045 [https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-](https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/)  
1046 [purification-kit-protocol/](https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/). Acesso em 10 de outubro de 2019.
- 1047
- 1048 Quezado-Duval AM, Guimarães CMN, Martins OM (2007) Occurrence of *Pseudomonas*  
1049 *corrugata* causing pith necrosis on tomato plants in Goiás, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 32.  
1050 DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000600014>. Disponível em:

- 1051 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-)  
1052 [41582007000600014&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582007000600014&lng=en&tlng=en). Acesso em 18 de agosto de 2019.
- 1053
- 1054 Redondo-Nieto M, Barret M, Morrissey JP, Germaine K, Martinez-Granero F, Barahona E,  
1055 Navazo A, Sanchez-Contreras, M, Moynihan JA, Giddens SR, Coppoolse ER, Muriel C,  
1056 Stiekema WJ, Rainey PB, Dowling D, O'Gara F, Martin M, Rivilla R (2012) Genome  
1057 sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal Bacteriology* 194:  
1058 1273-1274. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.06601-11>. Disponível em:  
1059 <https://jb.asm.org/content/194/5/1273>. Acesso em 12 de outubro de 2019.
- 1060
- 1061 Rodrigues LMR (2010) Avaliação da agressividade e caracterização genética de linhagens de  
1062 *Ralstonia solanacearum* isoladas de diferentes plantas hospedeiras. Dissertação de mestrado,  
1063 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, SP.
- 1064
- 1065 Rodrigues LMR, Destéfano SAL, Beriam LOS, Rodrigues-Neto J (2010) Occurrence of  
1066 *Pseudomonas mediterranea* on tomato in Brazil. *Plant Pathology* 59: 797. DOI:  
1067 [10.1111/j.1365-3059.2009.02237.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02237.x). Disponível em: [https://bsppjournals.onlinelibrary.](https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2009.02237.x)  
1068 [wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2009.02237.x](https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2009.02237.x). Acesso em: 10 jan. 2020.
- 1069
- 1070 Rodrigues-Neto J, Malavolta Junior VA, Ramos R (1989) Ocorrência de *Pseudomonas*  
1071 *corrugata* em tomateiro no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 15: 20.
- 1072
- 1073 Romeiro RS (2001) Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa, MG. Editora UFV.
- 1074

- 1075 Sakata (2011) Catálogo 2012/2013. Disponível em: [https://www.sakata.com.br/catalogo-](https://www.sakata.com.br/catalogo-pdf/catalogo_sakata_2011.pdf)  
1076 [pdf/catalogo\\_sakata\\_2011.pdf](https://www.sakata.com.br/catalogo-pdf/catalogo_sakata_2011.pdf). Acesso em 04 nov 2019.  
1077
- 1078 Thermofischer (2019) NanoDrop™ Modelo 2000/2000c Spectrophotometers. Disponível  
1079 em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000>. Acesso em 04 nov 2019.  
1080
- 1081 Topseed (2019) Catálogo de produtos 2018/2019. Disponível em:  
1082 <https://agristar.com.br/upload/pageflip/TS-TG-catalogo/4df8e6.pdf>. Acesso em 04 nov 2019.  
1083
- 1084 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, V. 1.  
1085 Nova York, EUA. Cold Spring Harbor Press.  
1086
- 1087 Saygili H, Aysan Y, Sahin F, Ustun N, Mirik M (2004) Occurrence of pith necrosis caused by  
1088 *Pseudomonas fluorescens* on tomato plant in Turkey. Plant Pathology 53: 803. DOI:  
1089 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01092.x>. Disponível em:  
1090 <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2004.01092.x>.  
1091 Acesso em 14 de junho de 2019.  
1092
- 1093 Schaad NM, Jones J, Chun W (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic  
1094 bacteria. Saint Paul, Minnessota. APS Press.  
1095
- 1096 Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, Glennon JD, O'Gara F (1992) Isolation of 2,4-  
1097 diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological  
1098 parameters influencing its production. Applied and Environmental Microbiology, 58: 353-

- 1099 358. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.58.1.353-358.1992>. Disponível em:  
1100 <https://aem.asm.org/content/58/1/353>. Acesso em 11 de outubro de 2019.  
1101
- 1102 Silva Júnior TAF, Azevedo SM, Gioria R, Almeida IMG, Maringoni AC (2009) Ocorrência  
1103 de *Pseudomonas cichori* iem tomateiro no estado de São Paulo. Arquivos do Instituto  
1104 Biológico 76: 285-290.  
1105
- 1106 Silva VL, Lopes CA (1995) Populações epifíticas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em  
1107 cultivo comercial de tomateiro industrial. Fitopatologia Brasileira 20: 179-183.  
1108
- 1109 Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical  
1110 classification. San Francisco, CA. W.H. Freeman.  
1111
- 1112 Sousa DX, Lifschitz S (2007) Avaliação do E-value para execução do BLAST sobre bases de  
1113 dados fragmentadas. Monografia em Ciência da Computação, Pontifícia Universidade  
1114 Católica do Rio de Janeiro, PUC-RJ. Rio de Janeiro-RJ.  
1115
- 1116 Souza VL, Maringoni AC, Krause-Sakate R (2006) Variabilidade genética em isolados de  
1117 *Curtobacterium flaccumfaciens*. Summa Phytopathologica 32: 170-176. DOI:  
1118 <https://doi.org/10.1590/S0100-54052006000200012>. Disponível em:  
1119 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-  
1120 54052006000200012&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052006000200012&lng=pt&tlng=pt). Acesso em 14 de junho de 2019.  
1121
- 1122 Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity Gm, Grimont PAD, Kampfer P, Maiden MCJ, Nesme  
1123 X, Rosselló-Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB (2002)



- 1124 Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology.  
1125 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 1043-1047. DOI:  
1126 <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-1043>. Disponível em:  
1127 <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-52-3-1043>.  
1128 Acesso em 6 de junho de 2019.  
1129
- 1130 Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M (1966) The aerobic Pseudomonads: A taxonomic  
1131 study. Journal of General Microbiology 43: 159-27. DOI: [https://doi.org/10.1099/00221287-](https://doi.org/10.1099/00221287-43-2-159)  
1132 [43-2-159](https://doi.org/10.1099/00221287-43-2-159). Disponível em:  
1133 <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-43-2-159>.  
1134 Acesso em 14 de junho de 2019.  
1135
- 1136 Thermofischer (2019) NanoDrop™ Modelo 2000/2000c Spectrophotometers. Disponível  
1137 em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000>. Acesso em 04 nov 2019.
- 1138 Versalovic J, Koeuth T, Lupiski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequence in  
1139 eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acid Research 19:  
1140 6823- 6831. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>. Disponível em:  
1141 <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/19/24/6823/1318809?redirectedFrom=fulltext>.  
1142 Acesso em 14 de junho de 2019.  
1143
- 1144 Versalovic J, Scheneider M, De Bruijn FJ, Lupiski JR (1994) Genomic fingerprinting of  
1145 bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in Molecular  
1146 and Cellular Biology 5: 25-40.  
1147

1148 Villacieros M, Power B, Sánchez-Contreras M, Lloret J, Oruezabal RI, Martin M, Fernandez-  
1149 Piñas F, Bonilla I, Whelan C, Dowling DN, Rivilla R (2003) Colonization behaviour of  
1150 *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*)  
1151 rhizosphere. *Plant Soil* 251: 47-54. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1022943708794>.  
1152 Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1022943708794>. Acesso  
1153 em 14 de junho de 2019.

1154 **Tabela 1.** Isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro, da haste ou da folha, provenientes de  
 1155 diferentes locais. Uberlândia - MG, 2020.

Isolado*	Parte da planta	Origem da amostra
UFU B38	Folha	Bragança Paulista, SP
UFU B39	Haste	Santa Cruz do Rio Pardo, SP
UFU C17	Haste	Cascalho Rico, MG
UFU D18	Folha	Uberlândia, MG
UFU E36	Folha	Uberlândia, MG
UFU E37	Haste	Uberlândia, MG
UFU G3	Haste	Caxias do Sul, RS
UFU G5	Haste	Caxias do Sul, RS
UFU G6	Haste	Caxias do Sul, RS
UFU G8	Haste	Caxias do Sul, RS
UFU G9	Haste	Caxias do Sul, RS
UFU G18	Haste	Caxias do Sul, RS
UFU G38	Haste	Uberlândia, MG
UFU G53	Haste	Araguari, MG
UFU G81	Folha	Patos de Minas, MG
UFU G82	Folha	Patos de Minas, MG
UFU G90	Folha	Patos de Minas, MG
UFU G120	Haste	Uberlândia, MG
UFU G121	Fruto	Uberlândia, MG
UFU G122	Folha	Uberlândia, MG
UFU G125	Haste	Altamira, PA
UFU G143	Haste	Tianguá, CE
UFU G149	Haste	Tianguá, CE
UFU H3	Haste	Araguari, MG
UFU H4	Haste	Araguari, MG
UFU H5	Haste	Araguari, MG
UFU H6	Haste	Araguari, MG

UFU H11	Folha	Araguari, MG
UFU H18	Haste	Venda Nova, ES
UFU H21	Haste	Silvestre, PR
UFU H22	Haste	Venda Nova, ES
UFU H24	Haste	Venda Nova, ES
UFU H25	Haste	Venda Nova, ES
UFU H30	Haste	Faxinal, PR
UFU H31	Haste	Venda Nova, ES
UFU H41	Haste	Catalão, GO
UFU H46	Haste	Catalão, GO
UFU H98	Haste	Uberlândia, MG
UFU H99	Haste	Uberlândia, MG
UFU H104	Folha	Uberlândia, MG
UFU H120	Haste	Uberlândia, MG
UFU H175	Folha	Uberlândia, MG
UFU I81	Haste	Estrela do Sul, MG

1157 **Tabela 2.** Isolados de *Pseudomonas* spp. testados no experimento de agressividade na haste  
 1158 do tomateiro. Uberlândia - MG, 2020.

Isolado*	Parte da planta	Origem da amostra
UFU B39	Haste	Santa Cruz do Rio Pardo, SP
UFU C17	Haste	Cascalho Rico, MG
UFU E37	Haste	Uberlândia, MG
UFU G3	Haste	Caxias do Sul, RS
UFU G5	Haste	Caxias do Sul, RS
UFU G6	Haste	Caxias do Sul, RS
UFU G8	Haste	Caxias do Sul, RS
UFU G9	Haste	Caxias do Sul, RS
UFU G18	Haste	Caxias do Sul, RS
UFU G38	Haste	Uberlândia, MG
UFU G53	Haste	Araguari, MG
UFU G120	Haste	Uberlândia, MG
UFU G121	Fruto	Uberlândia, MG
UFU G125	Haste	Altamira, PA
UFU G143	Haste	Tianguá, CE
UFU G149	Haste	Tianguá, CE
UFU H3	Haste	Araguari, MG
UFU H4	Haste	Araguari, MG
UFU H5	Haste	Araguari, MG
UFU H6	Haste	Araguari, MG
UFU H18	Haste	Venda Nova, ES
UFU H21	Haste	Silvestre, PR
UFU H22	Haste	Venda Nova, ES
UFU H24	Haste	Venda Nova, ES
UFU H25	Haste	Venda Nova, ES
UFU H30	Haste	Faxinal, PR
UFU H31	Haste	Venda Nova, ES

UFU H41	Haste	Catalão, GO
UFU H46	Haste	Catalão, GO
UFU H98	Haste	Uberlândia, MG
UFU H99	Haste	Uberlândia, MG
UFU H120	Haste	Uberlândia, MG
UFU I81	Haste	Estrela do Sul, MG

---

1159 \*Ano de obtenção dos isolados: B-2010; C- 2011; E- 2013; G- 2015; H- 2016; I- 2017.

1160 **Tabela 3.** Isolados de *Pseudomonas* spp. testados no experimento de agressividade na folha  
 1161 do tomateiro. Uberlândia - MG, 2020.

Isolado*	Parte da planta	Origem da amostra
UFU B38	Folha	Bragança Paulista, SP
UFU D18	Folha	Uberlândia, MG
UFU E36	Folha	Uberlândia, MG
UFU G81	Folha	Patos de Minas, MG
UFU G82	Folha	Patos de Minas, MG
UFU G90	Folha	Patos de Minas, MG
UFU G121	Fruto	Uberlândia, MG
UFU G122	Folha	Uberlândia, MG
UFU H11	Folha	Araguari, MG
UFU H104	Folha	Uberlândia, MG
UFU H175	Folha	Uberlândia, MG

1162 \*Ano de obtenção dos isolados: B-2010; D- 2012; E- 2013; G- 2015; H- 2016.

1163 **Tabela 4.** Caracterização morfológica de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro. Uberlândia - MG, 2020.

Isolado	Características culturais da colônia	Cor
UFU B38	circular, borda lisa, levemente elevada, opaca, brilhante	Palha-branca
UFU B39	circular, borda ondulada, reta, opaca, brilhante	Branca
UFU C17	circular, borda ondulada, reta, transparente, brilhante	Palha
UFU D18	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Palha
UFU E36	circular, borda lisa, reta, transparente, brilhante	Amarelo-Palha
UFU E37	circular, borda lisa, convexa, transparente, brilhante	Amarelo-Palha
UFU G3	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU G5	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU G6	circular, borda lisa, convexa, transparente, brilhante	Palha
UFU G8	circular, borda lisa, convexa, transparente, brilhante	Branca
UFU G9	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Palha
UFU G18	circular, borda lisa, convexa, opaca, brilhante	Branca
UFU G38	circular, borda lisa, convexa, opaca, brilhante	Branca
UFU G53	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Palha
UFU G81	circular, borda lisa, convexa, opaca, brilhante	Branca
UFU G82	circular, borda lisa, reta, transparente, brilhante	Palha
UFU G90	circular, borda lisa, reta, transparente, brilhante	Palha



UFU G120	circular, borda lisa, reta, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU G121	circular, borda lisa, reta, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU G122	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU G125	circular, borda lisa, reta, transparente, brilhante	Palha
UFU G143	circular, borda lisa, convexa, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU G149	circular, borda lisa, convexa, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU H3	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU H4	circular, borda lisa, convexa, transparente, brilhante	Branca
UFU H5	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU H6	circular, borda lisa, convexa, opaca, brilhante	Palha
UFU H11	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Amarelo-palha
UFU H18	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU H21	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Palha
UFU H22	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Palha
UFU H24	circular, borda lisa, reta, transparente, brilhante	Palha
UFU H25	circular, borda lisa, reta, transparente, brilhante	Palha
UFU H30	circular, borda lisa, convexa, opaca, brilhante	Branco-Palha
UFU H31	circular, borda lisa, convexa, opaca, brilhante	Branco-Palha
UFU H41	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Palha

UFU H46	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Palha
UFU H98	circular, borda lisa, convexa, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU H99	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Palha
UFU H104	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU H120	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Branco-palha
UFU H175	circular, borda lisa, levemente elevada, transparente, brilhante	Amarelo-palha
UFU I81	circular, borda lisa, reta, transparente, brilhante	Palha

---

1165 **Tabela 5.** Caracterização bioquímica pelos testes de King B e LOPAT de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro de acordo com Lelliot &  
 1166 Stead (1987) e Schaad et al. (2001). Uberlândia - MG, 2020.

Isolado	Parte da Planta	KB	L	O	P	A	T	Classificação preliminar
UFU B38	Folha	+	-	+	+	+	-	<i>P. fluorescens</i> (grupo IVb)
UFU B39	Haste	-	-	+	-	+	+	<i>Pseudomonas corrugata</i>
UFU C17	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU D18	Folha	+	+	-	-	+	+	Não determinada
UFU E36	Folha	+	-	-	+	-	+	<i>P. viridiflava</i> (grupo II)
UFU E37	Haste	+	-	-	+	-	+	<i>P. viridiflava</i> (grupo II)
UFU G3	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU G5	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU G6	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU G8	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU G9	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU G18	Haste	+	+	+	-	+	-	<i>P. fluorescens</i> (grupo Vb)
UFU G38	Haste	+	+	+	-	+	-	<i>P. fluorescens</i> (grupo Vb)
UFU G53	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU G81	Folha	+	+	+	-	+	-	<i>P. fluorescens</i> (grupo Vb)

UFU G82	Folha	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU G90	Folha	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU G120	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU G121	Fruto	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU G122	Folha	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU G125	Haste	+	-	+	+	+	-	<i>P. fluorescens</i> (grupo IVb)
UFU G143	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU G149	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H3	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H4	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H5	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H6	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H11	Folha	+	-	-	+	-	+	<i>P. viridiflava</i> (grupo II)
UFU H18	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H21	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H22	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H24	Haste	+	-	+	+	-	+	Não determinada
UFU H25	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H30	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)

UFU H31	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H41	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H46	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H98	Haste	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H99	Haste	+	-	+	+	+	-	<i>P. fluorescens</i> (grupo IVb)
UFU H104	Folha	+	-	+	-	+	-	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i> (grupo Va)
UFU H120	Haste	+	+	+	-	+	-	<i>P. fluorescens</i> (grupo Vb)
UFU H175	Folha	+	-	-	+	-	+	<i>P. viridiflava</i> (grupo II)
UFU I81	Haste	+	-	+	+	+	-	<i>P. fluorescens</i> (grupo IVb)

1167 KB: Fluorescência em meio King B; L: formação de levana em meio Levan; O: teste de oxidase; P: atividade pectolítica em disco de batata; A: teste de Arginina; T: HR em  
1168 tabaco; (+): reação positiva para o teste; (-): reação negativa para o teste.

1169 **Tabela 6.** Resultado do sequenciamento genético da região 16S de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro. Uberlândia - MG, 2020.

1170

Resultado: GenBank								
Isolado	Resultado preliminar (Testes bioquímicos)	Bactéria	Bases comparadas	Acesso	Cobertura de consulta	E-value	Similaridade	Conclusão
UFU B38	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> F113	840	CP003150	100%	0.0	98,14%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
UFU B39	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Não sequenciada: Confirmado por PCR						<i>Pseudomonas corrugata</i>
UFU C17	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> F113	860	CP003150	100%	0.0	98,38%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
UFU D18	Não determinada	<i>P. putida</i> KT2440	800	AE015451	100%	0.0	98,25%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU E36	<i>P. viridiflava</i>	Não sequenciada, igual bioquímica e molecularmente por BOX-PCR à UFU E37, mesma origem						<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>
UFU E37	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	913	AE016853.1	100%	0.0	98,31%	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>
UFU G3	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	Não sequenciada, igual bioquímica e semelhante molecularmente por REP-PCR à UFU G5, mesma origem						<i>Pseudomonas putida</i>
UFU G5	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	849	AE015451	100%	0.0	97,59%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU G6	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	901	AE015451	100%	0.0	97,57%	<i>Pseudomonas putida</i>

UFU G8	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	Não sequenciada, igual bioquímica e semelhante molecularmente por REP-PCR à UFU G9, mesma origem						<i>Pseudomonas putida</i>
UFU G9	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	861	AE015451	100%	0.0	98,48%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU G18	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> F113	910	CP003150	99%	0.0	97,29%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
UFU G38	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> F113	910	CP003150	100%	0.0	97,88%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
UFU G53	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	870	AE015451	100%	0.0	99,20%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU G81	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> F113	910	CP003150	100%	0.0	94,42%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
UFU G82	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	Não sequenciada, igual bioquímica e semelhante molecularmente por REP-PCR à UFU G90, mesma origem						<i>Pseudomonas putida</i>
UFU G90	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	880	AE015451	100%	0.0	98,10%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU G120	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	860	AE015451	100%	0.0	97,33%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU G121	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	920	AE015451	100%	0.0	97,51%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU G122	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	Não sequenciada, igual bioquímica e molecularmente por rep-PCR à UFU G120, mesma origem						<i>Pseudomonas putida</i>
UFU G125	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> F113	870	CP003150	100%	0.0	94,33%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
UFU G143	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	887	AE015451	99%	0.0	97,11%	<i>Pseudomonas putida</i>

UFU G149	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	Não sequenciada, igual bioquímica e molecularmente por REP e ERIC-PCR à UFU G143, mesma origem						<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H3	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	887	AE015451	100%	0.0	99,19%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H4	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	880	AE015451	100%	0.0	95,8%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H5	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	Não sequenciada, igual bioquímica e semelhante molecularmente por BOX-PCR à UFU H6, mesma origem						<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H6	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	963	AE015451	100%	0.0	99,53%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H11	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	960	AE016853.1	100%	0.0	96,19%	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>
UFU H18	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	Não sequenciada, igual bioquímica e semelhante molecularmente por BOX-PCR à UFU H25, mesma origem						<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H21	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	964	AE015451	100%	0.0	99,64%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H22	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	890	AE015451	99%	0.0	97,75%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H24	Não determinada	<i>P. putida</i> KT2440	840	AE015451	99%	0.0	98,08%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H25	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	900	AE015451	100%	0.0	97,11%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H30	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	880	AE015451	100%	0.0	99,66%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H31	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	849	AE015451	100%	0.0	98,12%	<i>Pseudomonas putida</i>



UFU H41	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	886	AE015451	100%	0.0	98,03%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H46	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	880	AE015451	100%	0.0	99,09%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H98	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	820	AE015451	99%	0.0	95,36%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H99	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> F113	869	CP003150	100%	0.0	95,88%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
UFU H104	<i>P. putida</i> ou <i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> KT2440	840	AE015451	100%	0.0	97,50%	<i>Pseudomonas putida</i>
UFU H120	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> F113	909	CP003150	100%	0.0	99,12%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
UFU H175	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	860	AE016853.1	100%	0.0	97,33%	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>
UFU I81	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> F113	870	CP003150	100%	0.0	96,09%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

1172 **Tabela 7.** Classificação de biovares de *P. putida* e *P. fluorescens* pela liquefação da gelatina e  
 1173 produção de ácidos a partir de diferentes fontes de carbono, de acordo com Dimartino et al.  
 1174 (2011). Uberlândia - MG, 2020.

Isolado	Gelatina	L-Arabinose	D-Galactose	m-Inositol	D-Manitol	D-Manose	D-Sorbitol	Sacarose	Trealose	Espécie	Biovar
UFU B38	+	-	+	-	-	+	-	-	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Não determinada
UFU C17	+	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Não determinada
UFU D18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU G3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	A
UFU G5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU G6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU G8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU G9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU G18	+	-	-	+	-	+	+	-	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Não determinada
UFU G38	+	+	-	-	-	+	+	-	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Não determinada
UFU G53	+	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU G81	+	-	-	-	-	+	+	-	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Não determinada
UFU G82	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU G90	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU G120	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU G121	+	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU G122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	A
UFU G125	-	-	+	-	-	+	-	+	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Não determinada
UFU G143	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU G149	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU H3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU H4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU H5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada

UFU H6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	A
UFU H18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU H21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	A
UFU H22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU H24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	A
UFU H25	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU H30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	A
UFU H31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	A
UFU H41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	A
UFU H46	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU H98	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU H99	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Não determinada
UFU H104	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	Não determinada
UFU H120	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Não determinada
UFU I81	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Não determinada

1175 (+): reação positiva para o teste; (-): reação negativa para o teste.

1176

1177 **Tabela 8.** Comprimento da necrose na haste de tomateiro (mm) aos 10, 20 e 30 dias após a  
 1178 inoculação de isolados de *Pseudomonas* spp. Uberlândia - MG, 2020.

Isolado	Comprimento da necrose na haste (mm)			
	10 DAI	20 DAI	30 DAI	Média
UFUB39- <i>P. corrugata</i>	60,0	64,75	65,0	63,25a
UFUH24- <i>P. putida</i>	64,50	27,25	55,50	49,08a
UFUG120- <i>P. putida</i>	38,75	35,00	44,50	39,41b
UFUH120- <i>P. fluorescens</i>	21,25	32,25	60,75	38,08b
UFUH25- <i>P. putida</i>	41,50	20,00	40,00	33,83b
UFUE37- <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	15,75	46,25	29,25	30,41c
UFUG3- <i>P. putida</i>	9,00	22,00	44,50	25,16c
UFUG18- <i>P. fluorescens</i>	8,50	10,75	54,50	24,58c
UFUG143- <i>P. putida</i>	12,25	26,25	29,00	22,50c
UFUG9- <i>P. putida</i>	14,25	39,50	11,75	21,83c
UFU I81- <i>P. fluorescens</i>	30,75	20,25	11,50	20,83c
UFUG5- <i>P. putida</i>	7,50	16,50	36,75	20,25c
UFUG6- <i>P. putida</i>	10,00	11,25	36,75	19,33c
UFUC17- <i>P. fluorescens</i>	17,25	22,25	17,75	19,08c
UFUG8- <i>P. putida</i>	25,00	10,75	18,50	18,08c
UFUH3- <i>P. putida</i>	14,00	26,50	13,75	18,08c
UFUH18- <i>P. putida</i>	15,75	16,00	20,50	17,41c
UFUH99- <i>P. fluorescens</i>	20,75	13,00	18,50	17,41c
UFUG38- <i>P. fluorescens</i>	14,75	16,75	20,00	17,16c
UFUH21- <i>P. putida</i>	11,25	15,25	24,00	16,83c
UFUH46- <i>P. putida</i>	11,75	19,25	16,75	15,91c
UFUH30- <i>P. putida</i>	12,00	15,00	20,50	15,83c
UFUH4- <i>P. putida</i>	16,25	14,75	15,50	15,50c
UFUH41- <i>P. putida</i>	7,75	13,25	24,25	15,08c
UFUH5- <i>P. putida</i>	12,50	8,75	21,50	14,25c

UFUH6- <i>P. putida</i>	14,00	12,50	14,75	13,75c
UFUH98- <i>P. putida</i>	16,00	10,50	13,25	13,25c
UFUH22- <i>P. putida</i>	12,25	13,75	12,25	12,75c
UFUH31- <i>P. putida</i>	5,25	15,00	18,00	12,75c
UFUG125- <i>P. fluorescens</i>	11,50	7,50	14,00	11,00c
UFUG149- <i>P. putida</i>	12,00	10,50	10,00	10,83c
UFUG53- <i>P. putida</i>	14,75	1,25	12,50	9,50c
Média	19,82B	21,47B	28,42A	

1179 CV: 74,46%. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si a 0,05 de significância  
1180 pelo teste de Scott-Knott. Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na linha diferem entre si a 0,05 de  
1181 significância pelo teste de Tukey.

1182 **Tabela 9.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) na haste de tomateiro  
 1183 após a inoculação de isolados de *Pseudomonas* spp. Uberlândia-MG, 2020.

Isolado	AACPD
UFUB39- <i>P. corrugata</i>	1572,50 a
UFUH24- <i>P. putida</i>	1195,00 a
UFUG120- <i>P. putida</i>	960,00 b
UFUH120- <i>P. fluorescens</i>	838,75 b
UFUH25- <i>P. putida</i>	815,00 b
UFUE37- <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	766,25 b
UFUG9- <i>P. putida</i>	596,25 b
UFU I81- <i>P. fluorescens</i>	567,5 b
UFUG3- <i>P. putida</i>	532,50 c
UFUG143- <i>P. putida</i>	530,00 c
UFUC17- <i>P. fluorescens</i>	483,75 c
UFUH3- <i>P. putida</i>	473,75 c
UFUG18- <i>P. fluorescens</i>	465,00 c
UFUG8- <i>P. putida</i>	450,00 c
UFUH99- <i>P. fluorescens</i>	430,00 c
UFUG5- <i>P. putida</i>	423,75 c
UFUH18- <i>P. putida</i>	420,00 c
UFUG38- <i>P. fluorescens</i>	415,00 c
UFUG6- <i>P. putida</i>	396,25 c
UFUH46- <i>P. putida</i>	393,75 c
UFUH4- <i>P. putida</i>	387,50 c
UFUH21- <i>P. putida</i>	385,00 c
UFUH30- <i>P. putida</i>	372,50 c
UFUH6- <i>P. putida</i>	338,75 c
UFUH98- <i>P. putida</i>	331,25 c
UFUH41- <i>P. putida</i>	331,25 c
UFUH22- <i>P. putida</i>	321,25 c

UFUH5- <i>P. putida</i>	320,00 c
UFUH31- <i>P. putida</i>	292,50 c
UFUG149- <i>P. putida</i>	275,00 c
UFUG125- <i>P. fluorescens</i>	260,00 c
UFUG53- <i>P. putida</i>	222,50 c

1184 CV: 47,59%. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si a 0,05 de significância  
1185 pelo teste de Scott-Knott.  
1186

1187 **Tabela 10.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) na folha do tomateiro  
 1188 após a inoculação de isolados de *Pseudomonas* spp. Uberlândia - MG, 2020.

Isolado	AACPD
UFUE36- <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	23,10a
UFUH104- <i>P. putida</i>	22,20a
UFUH11- <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	21,90a
UFU G122- <i>P. putida</i>	21,30a
UFUH175- <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	18,60a
UFUG90- <i>P. putida</i>	17,40a
UFUD18- <i>P. putida</i>	15,30a
UFUG81- <i>P. fluorescens</i>	15,00a
UFU B38- <i>P. fluorescens</i>	14,70a
UFUG82- <i>P. putida</i>	12,90a
UFUG121- <i>P. putida</i>	10,50a

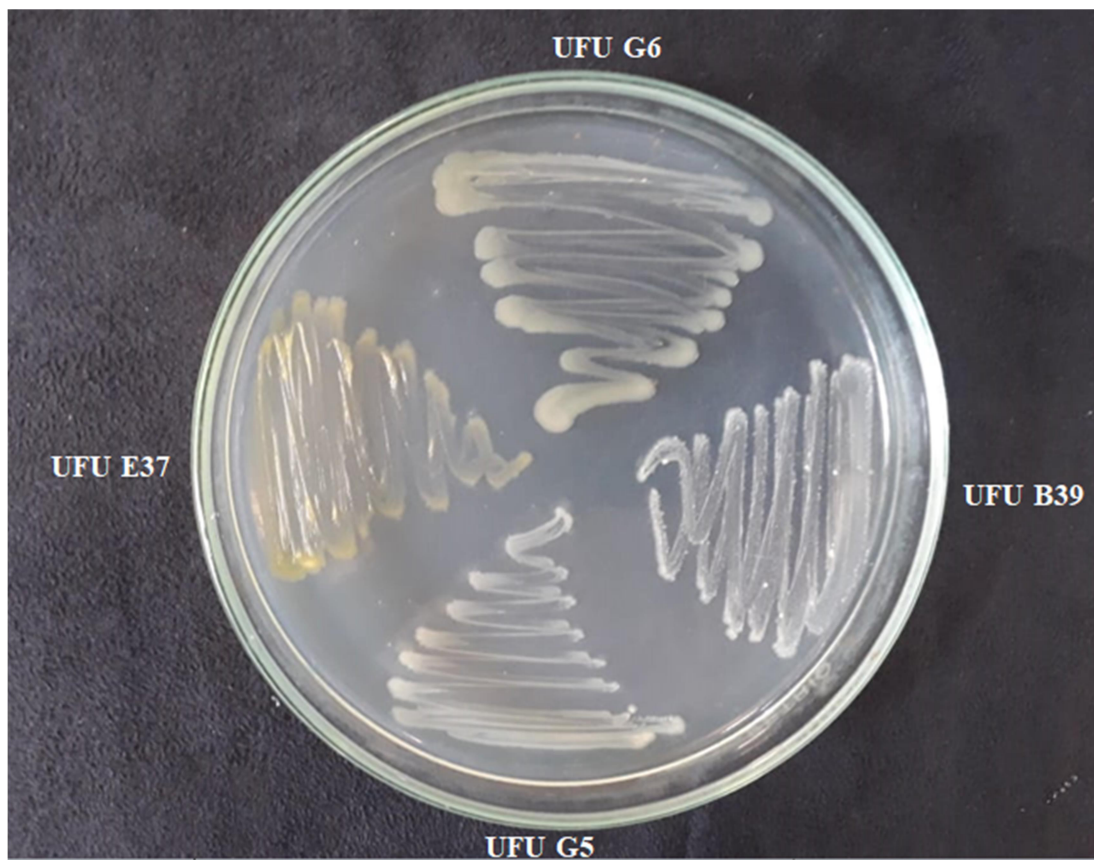
1189 CV: 40,52%. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si a 0,05 de significância  
 1190 pelo teste de Tukey.





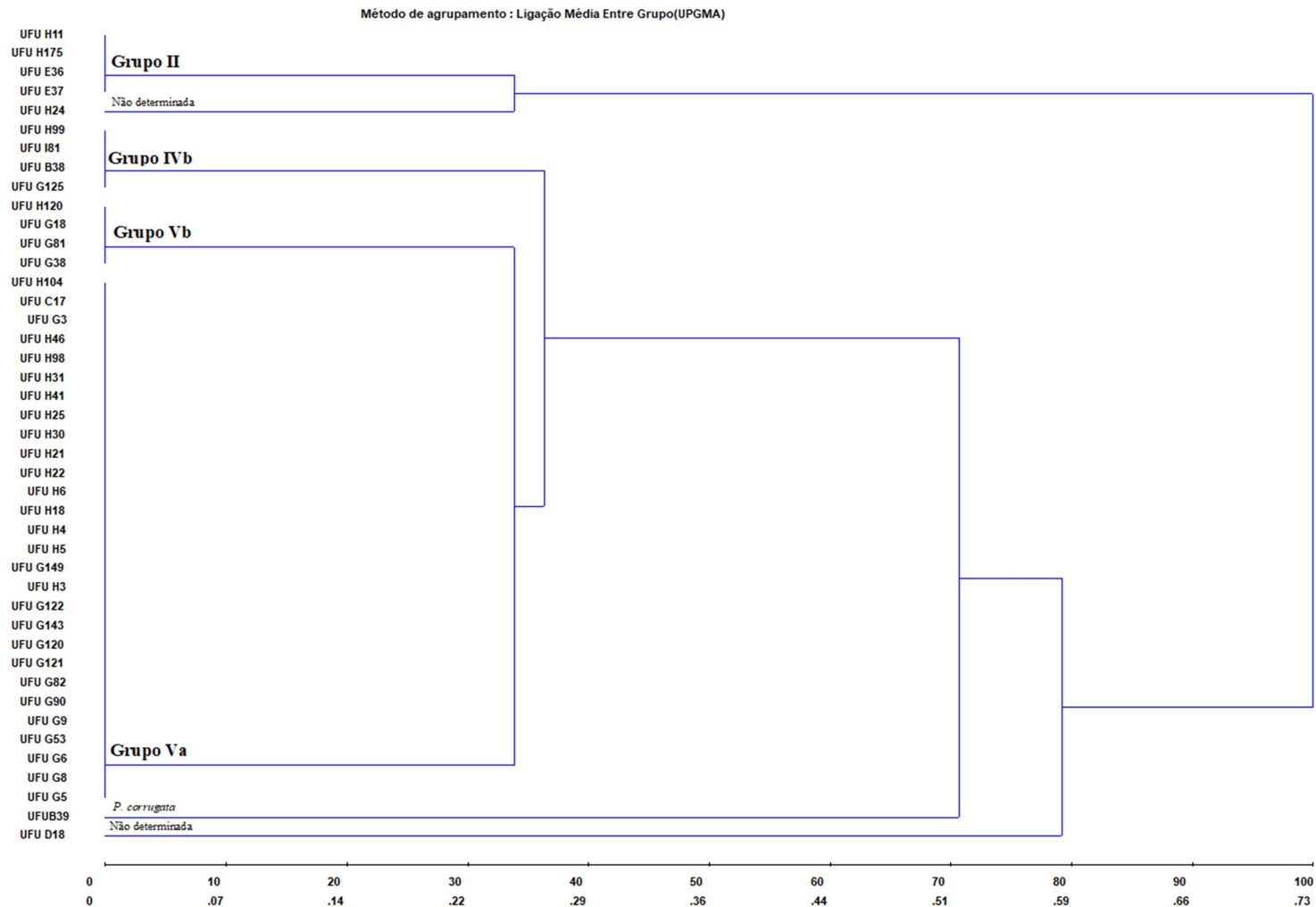
1191  
1192  
1193  
1194

**Figura 1.** Sintomas de necrose da medula no tomateiro e formação de raízes adventícias ocasionada por *Pseudomonas* spp. A - Isolado UFU H5 e B - UFU H6. Fonte: Tebaldi, 2016.

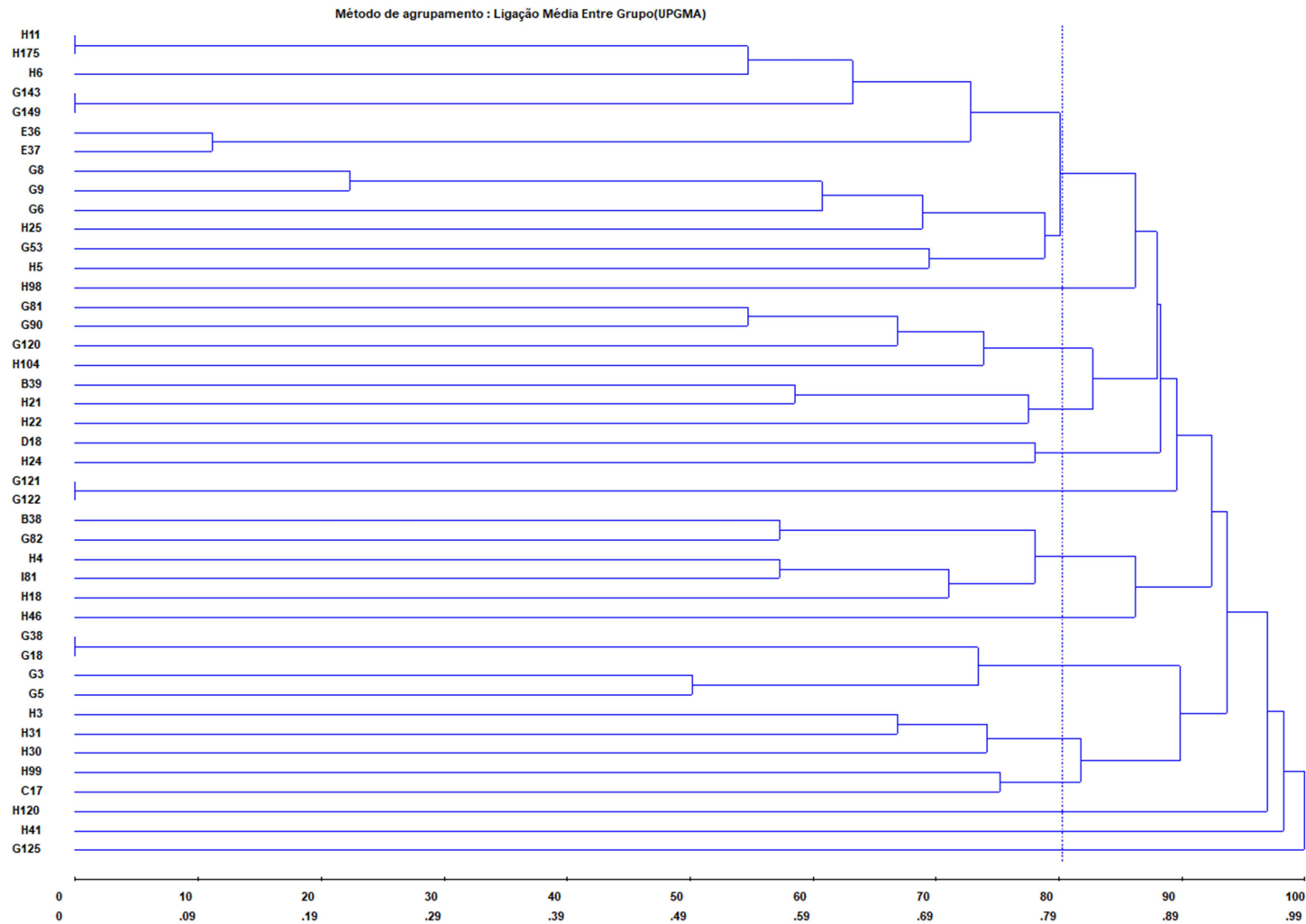


1195  
1196  
1197

**Figura 2.** Variação morfológica de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro em meio de cultura 523.

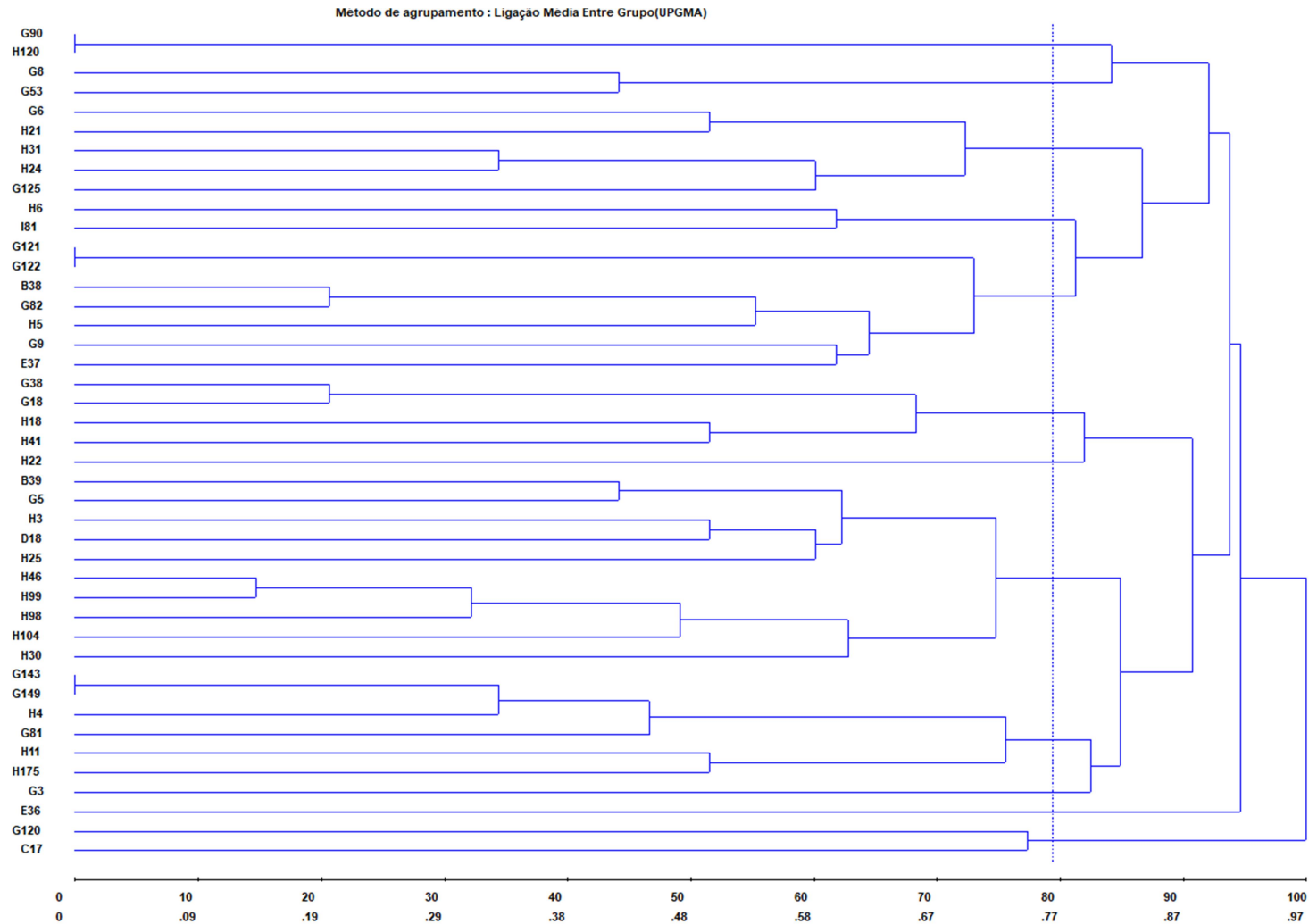


1198  
 1199 **Figura 3.** Agrupamento pelo método UPGMA de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro pelos testes bioquímicos, King B e LOPAT.  
 1200 Coeficiente de correlação cofenética (r):0,529. \*Significatio pelo teste F a 1% de probabilidade. Dissimilaridade máxima: 1,0. Dissimilaridade  
 1201 mínima: 0.



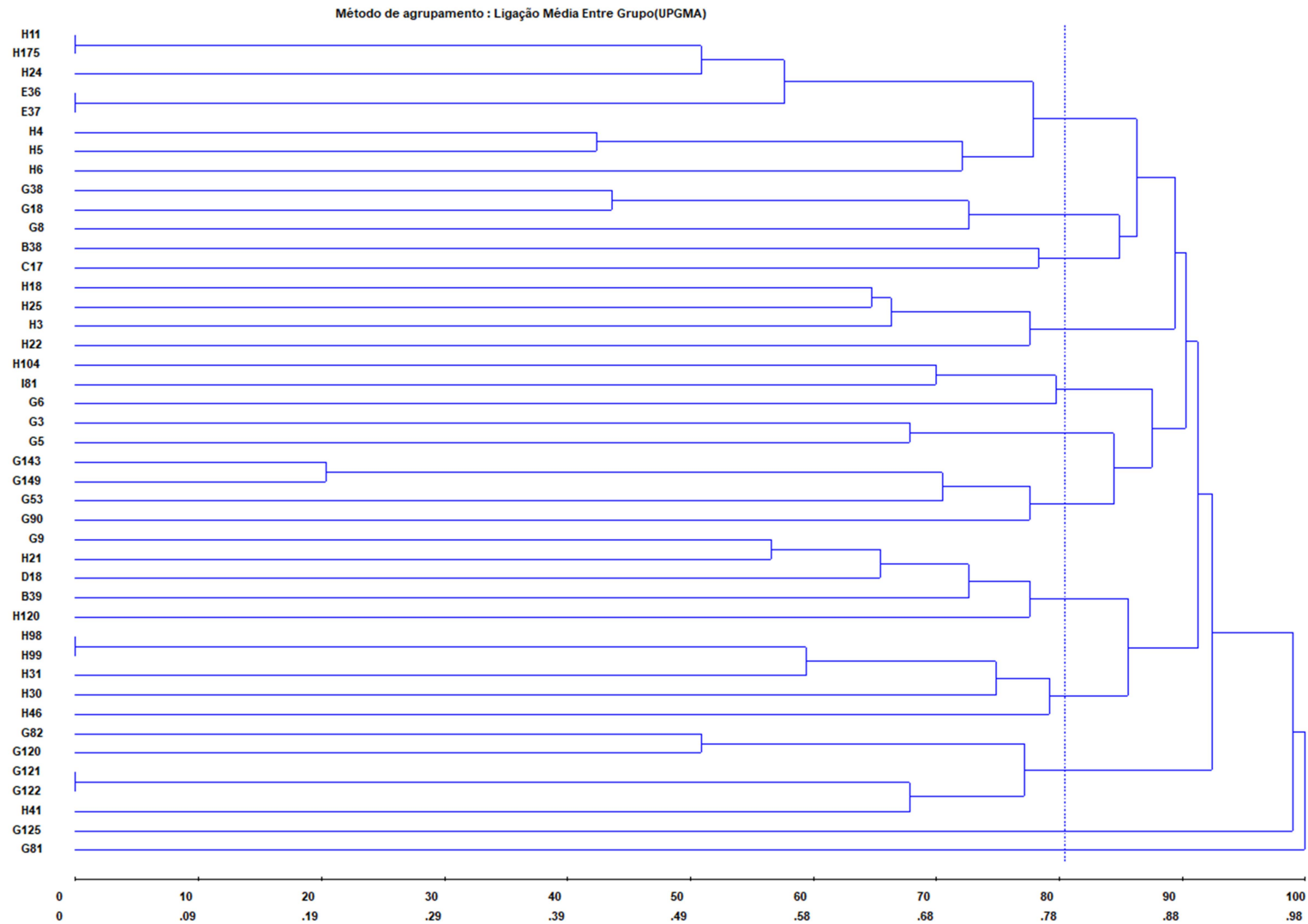
1202  
1203  
1204  
1205

**Figura 4.** Agrupamento pelo método UPGMA de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro utilizando os primers REP1R e REP2R. Coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ):0,687. \*Significatio pelo teste F a 1% de probabilidade. Dissimilaridade máxima: 1,0. Dissimilaridade mínima: 0.



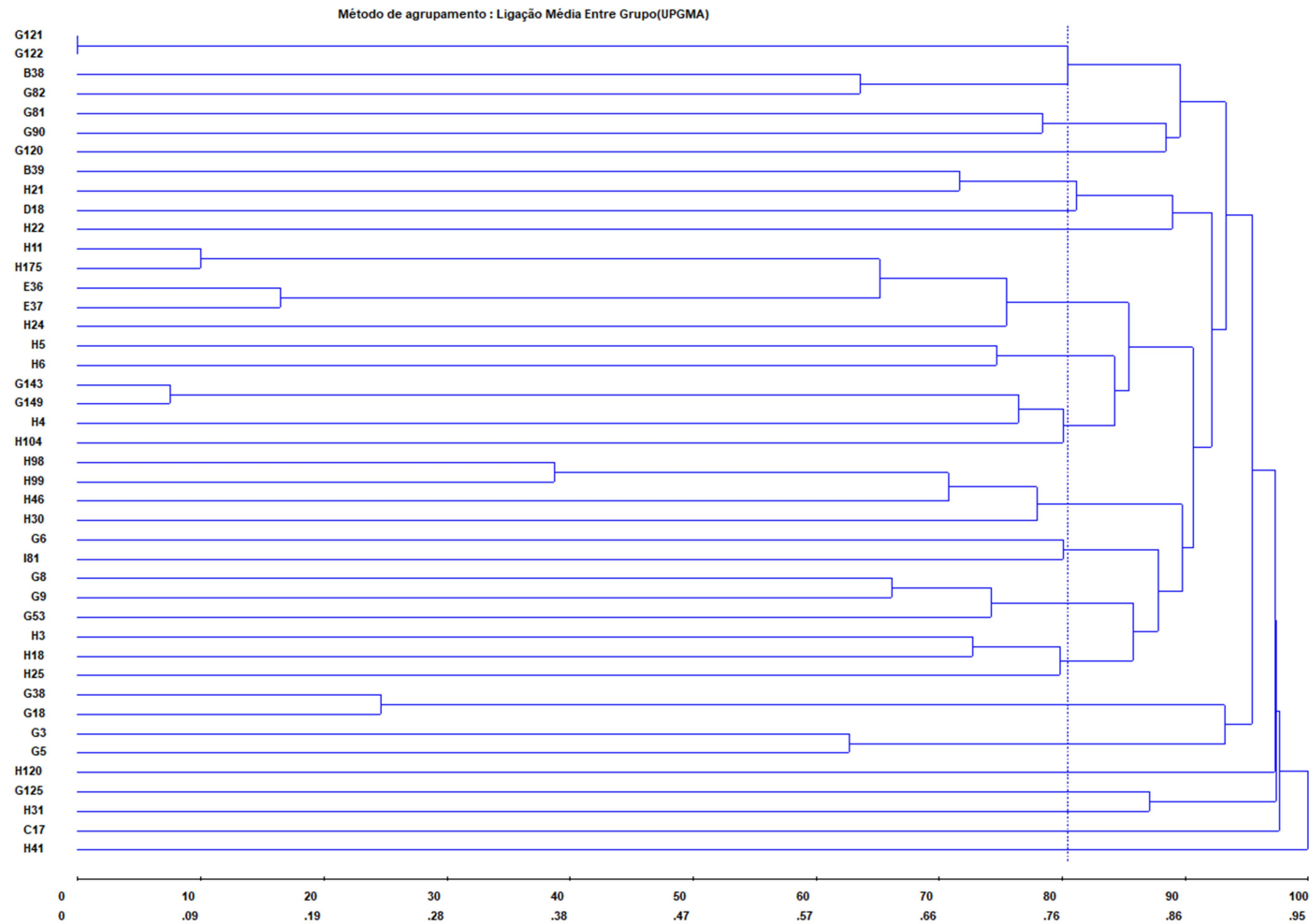
1206  
 1207  
 1208  
 1209

**Figura 5.** Agrupamento pelo método UPGMA de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro utilizando os primers ERIC1R e ERIC2. Coeficiente de correlação cofenética (r):0,691. \*Significatio pelo teste F a 1% de probabilidade. Dissimilaridade máxima: 1,0. Dissimilaridade mínima: 0.



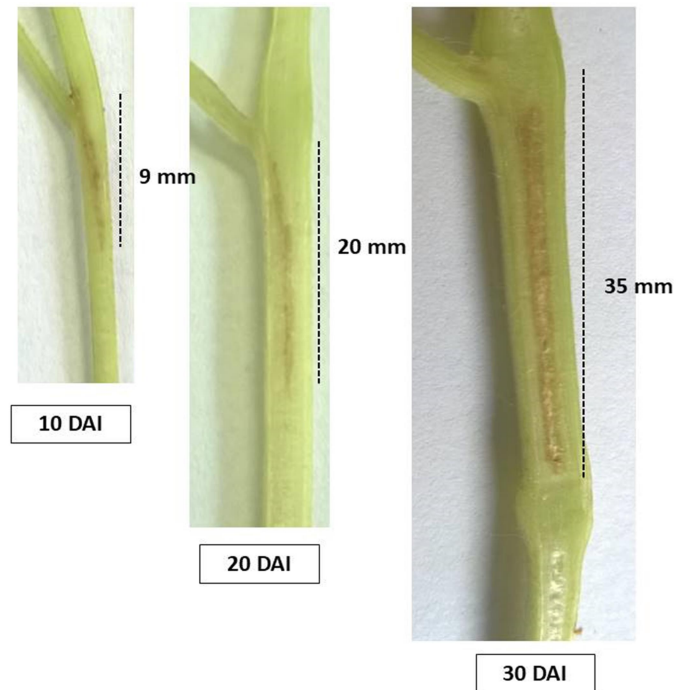
1210  
1211  
1212

**Figura 6.** Agrupamento pelo método UPGMA de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro utilizando o primer BOX AR1. Coeficiente de correlação cofenética (r):0,721. \*Significatio pelo teste F a 1% de probabilidade. Dissimilaridade máxima: 1,0. Dissimilaridade mínima: 0.



1213  
 1214  
 1215  
 1216

**Figura 7.** Agrupamento pelo método UPGMA de isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro por rep-PCR (REP, ERIC e BOX-PCR). Coeficiente de correlação cofenética (r):0,682. \*Significatio pelo teste F a 1% de probabilidade. Dissimilaridade máxima: 1,0. Dissimilaridade mínima: 0.



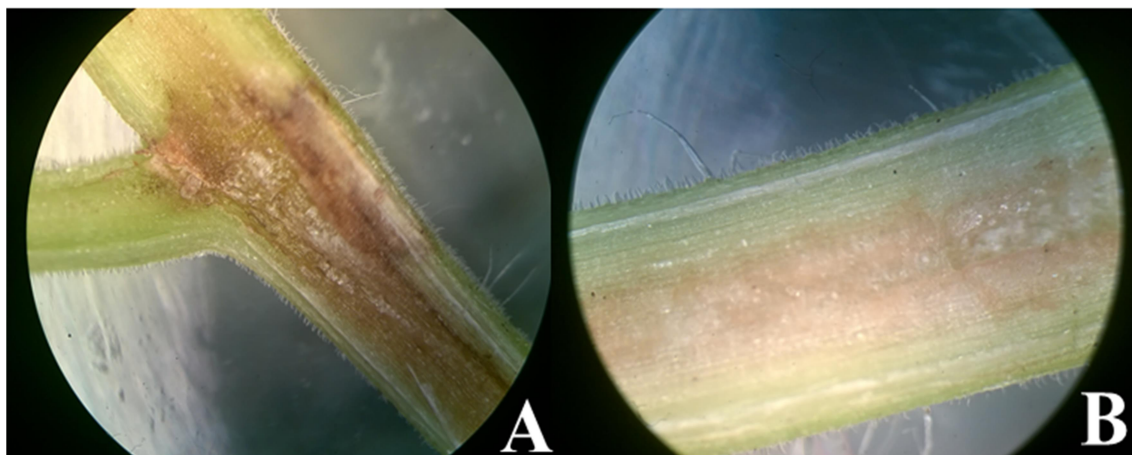
1217  
1218  
1219  
1220

**Figura 8.** Evolução da necrose da haste no tomateiro, aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação com *Pseudomonas* sp., isolado UFU G5.



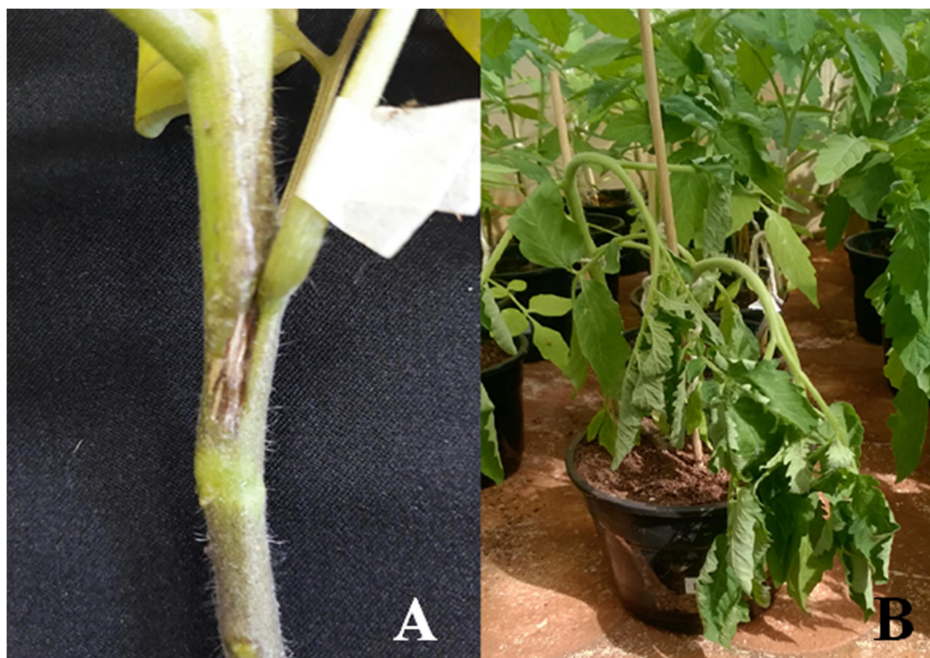
1221  
1222  
1223

**Figura 9.** Necrose na medula do tomateiro, aos 30 dias após inoculação com *Pseudomonas* spp. A), isolados UFU H24; B) UFU H25 e C) UFU G143.



1224  
1225  
1226  
1227

**Figura 10.** Necrose na haste no tomateiro visualizada sob microscópio estereoscópio (40x), aos 20 dias após a inoculação com *Pseudomonas* spp. A) Isolados UFU H24 e B) UFU H25.



1228  
1229  
1230  
1231

**Figura 11.** Sintomas externos no tomateiro aos 20 dias após a inoculação com *Pseudomonas* sp. isolado UFU H24. A- rachadura externa e secamento da haste; B- murcha da planta nas horas mais quentes do dia.





1232  
1233  
1234  
1235

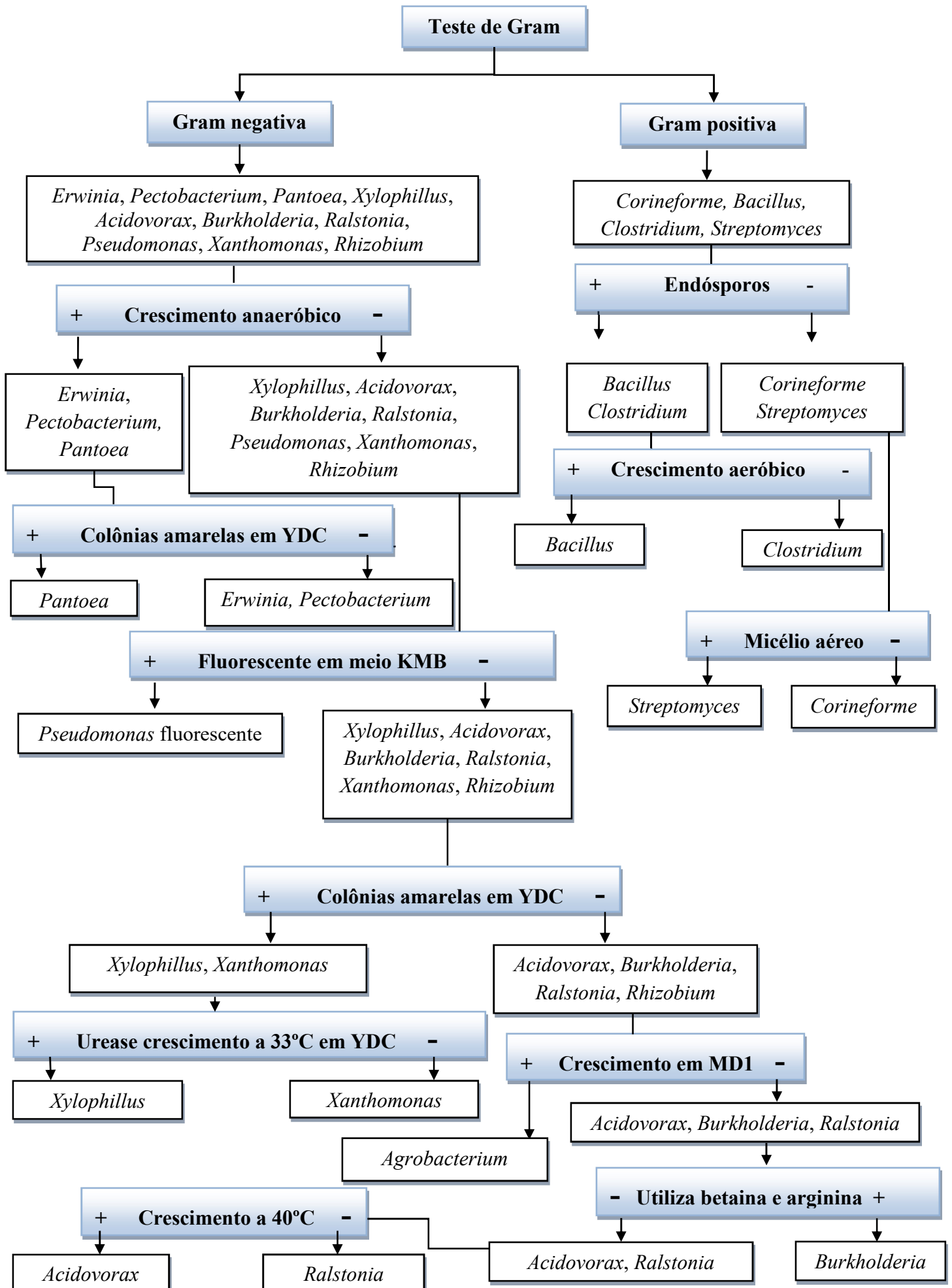
**Figura 12.** Sintomas foliares na face adaxial da folha do tomateiro, aos 15 dias após a inoculação com *Pseudomonas* sp., isolado UFU E36.



1236  
1237  
1238

**Figura 13.** Sintomas de foliares na face abaxial e no pedúnculo da folha do tomateiro, aos 18 dias após a inoculação com *Pseudomonas* sp., isolado UFU E36.

APÊNDICE A - Chave de identificação de gênero de bactérias fitopatogênicas (Adaptado de Schaad et al., 2001).



**APÊNDICE B** - Agrupamento de *Pseudomonas* fluorescentes pelo teste de LOPAT (Lelliott & Stead, 1987).

Grupo	LOPAT					Caracteres Conformatórios				Espécies
	Levan	Oxidase	Atividade Pectolítica	Arginina dihidrolase	HR em tabaco	Produção de 2-ketoglucanato	Reação da gema de ovo	Redução do Nitrato	Produção de ácido a partir da sacarose	
Ia	+	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>P. syringae</i>
Ib	-	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>P. syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i> *; <i>P. delphini</i>
II	-	-	+	-	+	-	-	-	ND	<i>P. viridiflava</i>
III	-	+	-	-	+	-	-	V	ND	<i>P. cichorii</i> ; <i>P. agarici</i>
IVa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>P. marginalis</i> ; <i>P. fluorescens</i> (pectolíticas)
IVb	-	+	+	+	-	+	V	V	V	<i>P. fluorescens</i>
Va	-	+	-	+	-	+	+	-	-	<i>P. tolaasii</i> ; <i>Pseudomonas</i> saprofiticas ( <i>P. putida</i> )
Vb	+	+	-	+	-	+	V	V	V	<i>P. fluorescens</i> e outras <i>Pseudomonas</i> saprofiticas

\* *P. syringae* subsp. *savastanoi* = sin. *P. savastanoi*. (-) isolados apresentam reação negativa para o teste; (+) isolados apresentam reação positiva para o teste; (V) reação variável para o teste; (ND) Não definido.

APÊNDICE C - Identificação de bactérias fitopatogênicas do gênero *Pseudomonas* baseados em testes bioquímicos LOPAT (Schaad et al., 2001).

Característica	<i>P. marginalis</i>	<i>P. tolaasii</i>	<i>P. agarici</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. fuscovaginae</i>	<i>P. corrugata</i>
Levan	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Oxidase	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Atividade pectolítica	+	-	-	-	+	V	-	ND	-
Arginina dihidrolase	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Tabaco (HR)	V	-	+	+	+	+	+	-	ND

(-) 80% dos isolados apresentam reação negativa para o teste; (+) 80% dos isolados apresentam reação positiva para o teste; (V) reação variável para o teste; (ND) reação não determinada para o teste.

**APÊNDICE D** - Testes para diferenciação de biovars de *P. putida* e *P. fluorescens* no tomateiro. (Dimartino et al.,2011).

Característica	<i>P. putida</i>		<i>P. fluorescens</i> bv. I	<i>P. fluorescens</i> bv. III	<i>P. fluorescens</i> bv. IV	<i>P. fluorescens</i> bv. V	<i>P. fluorescens</i>
	bv. A	bv. B					
Levan	- <sup>a</sup>	-	+ <sup>b</sup>	-	+	-	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Atividade pectolítica	-	-	-	-	-	-	-
Arginine Dihydrolase	+	+	+	+	+	+	+
HR em tabaco	-	-	-	-	V <sup>c</sup>	-	-
Liquefação da gelatina	-	-	+	+	+	-	+
Redução de Nitrato	-	-	-	+	+	-	+
Tween 80	V	+	-	+	+	+	+
Adonitol	-	-	+	+	-	-	+
L-Arabinose	-	+	+	-	V	+	+
D-Arabitól	-	V	+	+	V	+	+
D-Celobiose	-	-	-	-	-	-	-
D-Frutose	V	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	-	+	+	+	+	+	+
a-D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+
m-Inositol	-	-	+	+	+	-	+
D-Manitol	-	+	+	+	+	+	+
D-Manose	-	+	+	+	V	+	+
D-Sorbitol	-	-	+	-	+	-	+
Sacarose	-	-	+	-	+	-	+
D-Trehalose	-	-	+	+	V	+	+
Éster metílico do ácido pirúvico	+	+	+	+	+	+	+

Ácido Cis-Aconítico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido cítrico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido D-Galacturônico	+	+	+	-	+	+	+
Ácido D-Glucônico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido D-Glicurônico	+	+	+	-	+	+	+
Ácido Malônico	-	+	+	+	+	+	+
Ácido Propanóico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido D-Sacárico	+	+	+	-	+	+	+
L-Asparagina	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-Aspártico	+	+	+	+	+	+	+
L-Leucina	+	+	+	+	+	+	+
L-Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-
D-Serina	V	-	-	+	-	-	-
Ácido Urocânico	-	+	+	+	+	+	+
Inosina	-	-	+	+	+	+	+
Putrescina	+	+	-	-	-	+	-

<sup>a</sup> - negativa; <sup>b</sup> + positiva; <sup>c</sup> V variável: 50-80% dos isolados são negativos.

**APÊNDICE E - Meios de cultura**

**Meio 523** (Kado & Heskett, 1970; Mariano & Silveira, 2005)

Composição:

Sacarose -10 g

Extrato de Levedura -4g

Caseína ácida hidrolisada -8 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -2 g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O -0,3 g

Ágar -15 g

Água destilada -1000 mL

**Meio King B** (King et al., 1954 apud Malathrakis & Goumas, 1987; Mariano & Silveira, 2005)

Composição:

Proteose Peptona 20g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,5 g

Glicerol 10 mL

Ágar 15 g

Água destilada 1000 mL

Após o preparo do meio de cultura, ajustar o pH para 7,2.

Procedimento:

Repicar a bactéria a ser testada e incubar a 28°C por 1 a 7 dias.

Resultados:

As *Pseudomonas* capazes de produzir a pioverdina (pigmento fluorescente) deixarão o meio com coloração esverdeada ou fluorescente, quando visto iluminado em luz ultravioleta, de

preferência em ambiente escuro, verificando resultado positivo para o teste. Se o meio não adquirir esta característica o resultado será negativo.

**Oxidação ou Fermentação da Glicose (O/F)** (Hugh & Leifson, 1953 apud Malathrakis & Goumas, 1987; Mariano & Silveira, 2005)

Composição:

Peptona 2g

Extrato de levedura 1g

Dextrose 10g

Ágar 3 g

Solução aquosa de azul de bromotimol a 1%- 3mL

Água destilada 1000 mL

Preparar o meio e ajustar a pH 7,1, que ficará com coloração verde. Distribua 5mL do meio em cada tubo de ensaio e esterilize em autoclave. Esterilize óleo mineral, glicerol ou vaselina em autoclave e, após esfriamento do meio de cultura, em câmara de fluxo, adicione 1mL em cada tubo.

Procedimento:

Semeie a bactéria oriunda de uma cultura com 24 a 48 horas no meio cultura, com alça de platina aberta, tomando cuidado para que a bactéria não fique na camada de óleo que está sobre o meio. Incube os tubos a 28°C por 24 horas.

Resultados:

No tubo que houve crescimento bacteriano, haverá produção de ácido a partir da glicose, reduzindo o pH e fazendo com que o meio adquira coloração amarela, sendo resultado positivo para o teste, ou seja, a bactéria cresce em condições de anaerobiose, sendo considerada anaeróbica fermentativa (F), com metabolismo fermentativo para carboidratos. Bactérias que não fermentam o meio de cultura, cujo metabolismo é oxidativo (O), ou seja, não crescem sem a presença de oxigênio, não produzem nenhuma mudança no meio, que se mantem de coloração verde.



**Meio de Levan (Formação de Levana)** (Misaghi & Grogan, 1969 apud Malathrakis & Goumas, 1987; Mariano & Silveira, 2005)

Composição:

Extrato de carne 3g

Peptona 5 g

Sacarose 50 g

Ágar 15 g

Água destilada 1000 mL

Após o preparo do meio de cultura, ajustar o pH para 7,0.

Procedimento:

Repicar a bactéria a ser testada e incubar a 28°C por 5 dias.

Resultados:

Após o crescimento das colônias, verificar se elas são brancas, convexas e mucóides, o que indicará formação de levana, com resultado positivo para o teste. Se esse aspecto não for observado, o resultado será negativo.

**Arginina Dihidrolase** (Thorneley, 1960 apud Malathrakis & Goumas, 1987; Mariano & Silveira, 2005)

Composição:

Peptona 1 g

NaCl 5g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g

Ágar 3 g

Vermelho de fenol 0,01g

Arginina-HCl 10g

Água destilada 1000 mL

Após o preparo do meio de cultura, ajustar o pH para 7,2. Distribua 5mL do meio em cada tubo de ensaio e esterilize em autoclave. Para dar condições de anaerobiose, esterilize óleo

mineral, glicerol ou vaselina em autoclave e, após esfriamento do meio de cultura, em câmara de fluxo, adicione 1mL em cada tubo.

Procedimento:

Semeie a bactéria oriunda de uma cultura com 24 a 48 horas no meio cultura, com alça de platina aberta, tomando cuidado para que a bactéria não fique na camada de óleo que está sobre o meio. Incube os tubos a 28°C por até 7 dias.

Resultados:

No tubo que houve crescimento bacteriano, haverá reação alcalina, fazendo com que o indicador mude de cor, ficando rosa-escuro, indicando resultado positivo para o teste. Se o meio não sofrer alteração de coloração, o resultado será negativo.

**Liquefação da Gelatina** (Kelman & Dickey, 1980 apud Malathrakis & Goumas, 1987; Mariano & Silveira, 2005)

Composição:

Extrato de carne 3 g

Peptona 5g

Gelatina (sem sabor) 120g

Ágar 3 g

Água destilada 1000 mL

Dissolver a gelatina em parte da água destilada aquecida e misturar os outros ingredientes no que restou da água destilada, juntando os dois preparados ao final. Colocar cerca de 5 mL do meio de gelatina em cada tubo. Após a autoclavagem, deve-se deixar os tubos esfriarem na posição vertical, imersos até a metade, em água com gelo, para verificar se a gelatina está realmente solidificada.

Procedimento:

Com alça de platina aberta, pegar uma porção da colônia a ser testada e repicar para os tubos, bastando uma perfuração do meio de gelatina pela alça, para que seja feita a inoculação, deve-se guardar um tubo sem ter feito a inoculação (controle). Levam-se os tubos para a incubadora com 25 a 28°C, aguardando o crescimento bacteriano.

Resultados:

Avaliar a digestão da gelatina 3, 7 e 21 dias após a inoculação, colocando os tubos na geladeira por 30 minutos. Os tubos que contiverem colônias capazes de digerir a gelatina apresentarão o meio liquefeito após este período de refrigeração, podendo-se descartar estas colônias que obtiveram resultado positivo da digestão da gelatina; as demais devem voltar à incubadora até se completarem 21 dias de incubação. Caso não tenham liquefeito a gelatina após este período, deverão ser descartadas com resultado negativo para digestão.

**Tampão Tris-Borato EDTA (TBE) - Concentração 5X (Estoque)** (Sambrook et al., 1989)Composição:

54g Trisbase

27,5g de Ácido Bórico

20 mL de EDTA dissódico 0,5 M (pH 8,0)

1000 mL de água

Procedimento:

Preparar na concentração 0,5X para corrida:

450 mL de água

50 mL TBE 5X

**Produção de ácidos a partir da utilização de diferentes fontes de carbono** (Mariano & Silveira, 2005)Composição:

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0,5g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,2g

NaCl 5g

Extrato de levedura 1g

Solução de Púrpuro de Bromocresol 1,5% 0,7mL

Água destilada 1000 mL

Ajustar o pH para 6,8 e autoclavar.

Procedimento:

Preparar soluções aquosas estéreis a 5% dos açúcares: L-Arabinose, D-Galactose, m-Inositol, D-Manitol, D-Manose, Sacarose, D-Sorbitol e Trealose. Para cada fonte de carbono, adicionar  $100 \mu\text{L}^{-1}$  das soluções aquosas preparadas em  $900 \mu\text{L}^{-1}$  do meio, em tubos tipo eppendorfs autolcavados. Com alça de platina reta, pegar uma porção da colônia da bactéria a ser testada e semear no tubo. Incubar a  $28^{\circ}\text{C}$  por até 14 dias. Preparar um tubo controle sem inoculação da bactéria.

Resultado:

Se a bactéria em teste utilizar o açúcar ou álcool contido no meio como fonte de carbono, será observada uma mudança de coloração do meio roxo para amarelo devido à acidificação do meio, com resultado positivo para o teste. Ponde-se comparar o resultado com o tubo onde não foi feita a inoculação (controle).

## APÊNDICE F - Testes

**Oxidase** (Stanier et al., 1966; Mariano & Silveira, 2005)

Procedimento:

Preparar solução de TetrametilParafenilenodiaminoDihidroclorato a 1% em água destilada. Molhar papel de filtro na solução, com auxílio de alça de platina esfregar uma pequena porção da bactéria a ser testada no papel tratado.

Resultados:

No caso de resultado positivo para o teste, o papel mudará da cor branca para roxo em um intervalo de tempo menor que 10s, fracamente se a coloração aparecer entre 10 a 60 segundos. Se o resultado for negativo, após 60s, o papel irá continuar branco.

**Atividade pectolítica em discos de batata** (Kelman & Dickey, 1980 apud Malathrakis & Goumas, 1987; Mariano & Silveira, 2005)

Para esse teste utilizam-se iscas biológicas de tubérculos sadios de batata, que devem ser lavados com água e sabão. Na câmara de fluxo, com auxílio de bisturi flambado, fragmentos internos do tubérculo devem ser retirados e colocados sobre um suporte de bastão de vidro esterilizado, na superfície de papel filtro esterilizado e umedecido com água estéril, disposto em placa de Petri esterilizada, formando uma câmara úmida. Com alça de platina aberta, deve-se tocar a bactéria e tocar uma única vez a isca biológica de batata e incubar a 28 °C por 24 a 48 horas. Para resultado positivo, verifica-se o crescimento da bactéria observando o pus bacteriano, necrose ou podridão da isca. Para resultado negativo, essa podridão não é observada.

**Reação de Hipersensibilidade em plantas de fumo (HR)** (Klement et al., 1964 apud Malathrakis & Goumas, 1987; Mariano & Silveira, 2005)

Para reação de hipersensibilidade (HR) prepara-se a suspensão bacteriana em tubo eppendorf. Com auxílio de alça de platina adicione a bactéria em água destilada esterilizada ou solução salina esterilizada, homogeneizando a suspensão em agitador. Com auxílio de uma seringa,

infiltra a suspensão bacteriana na parte abaxial da folha de fumo. Em caso resultado positivo, observa-se necrose localizada do tecido onde a bactéria infiltrou dentro de 24 horas, devido ao colapso e morte das células do tecido do hospedeiro ao redor do sítio de infecção. Em caso de resultado negativo, essa necrose não será observada.

## ANEXO A - Normas para publicação no periódico Tropical Plant Pathology.



ISSN 1983-2052 *online version*

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Editorial policy](#)
- [Submission of papers](#)

#### Scope and policy

The aim of **Tropical Plant Pathology**, an international, bimonthly journal of the Brazilian Phytopathological Society, is to publish results of research on fundamental and applied aspects of plant pathology. Contributions in the fields of mycology, bacteriology, virology, nematology, epidemiology, host-pathogen interactions, genetics of plant pathogens, physiological and molecular plant pathology, post-harvest and non-infectious diseases and about other topics or strategies promoting plant protection are welcome. Manuscripts on screening for synthetic or natural products and for resistance to pathogens can be accepted as research article only if they provide additional information on modes of action or mechanisms of resistance.

TPP will not publish manuscripts based only on evaluation of plant protection products. Surveys for diseases or pathogens and first reports of plant diseases should be submitted as a “Short Communication” and will be published only if of special relevance (major host-crop, major quarantine relevance). In the case of first records for Brazil, authors must follow the official rules requiring prior communication of the occurrence to the authorities in the Ministry of Agriculture – MAPA and provide evidence of such. New regional records of previously known diseases for a country are generally not acceptable for publication in TPP, but special cases can be considered. Manuscripts should report results originated from experiments that were repeated in time in order to assure the consistency of the findings, unless the research results are of non-quantitative nature. This should be particularly observed for field experiments.

#### Editorial policy

**Tropical Plant Pathology** is an official publication of the Brazilian Phytopathological Society, but contributions from members and nonmembers of the Society are equally welcome. It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries. There are no page charges. Reprints can be obtained free of charge as pdf-files from TPP’s website at the SciELO gateway.

### **Manuscripts should be written in English**

Manuscripts will initially be checked by the Editors for conformity with The Section Editor will oversee the review process and will be responsible for the final decision. Acceptance is based on the quality of the work, on the recognition of a significant contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

### **Submission of papers**

Manuscripts are submitted to TPP through the ScholarOne Online system, free of charge (<http://mc04.manuscriptcentral.com/tppscielo>).

### **Before submitting a manuscript, authors must have carefully prepared the following items:**

a) A cover letter, which clearly states that (i) all authors have approved the submission of the manuscript; (ii) the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere; (iii) authors transfer copyright to the Brazilian Phytopathological Society. A corresponding author must be clearly indicated and will be responsible for all correspondence between the Editorial Board and the authors;

b) A file including the main text, tables and figure legends, prepared in Word (.doc or .docx) or RTF (.rtf);

c) Individual files containing one Figure each, prepared as TIFF or JPEG files at high resolution (at least 300 dpi). Failure to adhere to these guidelines will lead to the immediate rejection of manuscripts.

The Editorial Board expects authors to ensure that the language is corrected before submission. Language correction will not be performed by the Editors or the Section Editor, and manuscripts will be returned to the authors if the language requires correction.

### **Types of papers**

#### **1 Research Article**

Manuscripts should be prepared in double-spaced, 12-point type throughout, including the References section, appendices, tables, and figure captions. Page configuration should be A4 with 2.5 cm margins and marked with consecutive page and line numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The **title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first and last name in full); the authors' institutional affiliation or where the research has been performed, including department, institution, zip code, city, state or province and country (note that affiliation should be that where the author was connected when the work was performed – in case the author has moved to a different working address this may be indicated separately as “present address”); different affiliations are indicated with superscript



numbers; the corresponding author's name with e-mail address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and any other duties related to the processing of the manuscript.

b) The **Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **Key words:** up to six key words should be included, and these should differ from words mentioned in the title. These should start with the scientific names of hosts and pathogens involved in the study (or the most relevant ones) in alphabetical order and be followed by the other key words, also in alphabetical order.

d) The **text** must be as succinct as possible and includes the following elements:

**Introduction:** Description of the background that led to the study and the hypothesis which is being tested, in case this applies.

**Material and Methods:** Detailed description of the steps followed by the authors allowing the reader to repeat the work if willing to do so. Avoid, whenever possible, to simply refer to another publication for a complete description of methodology. Statistical methods should be explained at the end of this section.

**Results:** Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

**Discussion:** The findings of the study should be placed in the context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be included solely to increase the size of the manuscript. Some manuscripts may require different formats in order to better fit their content. This will be evaluated on a case by case basis.

**Text citations:** articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Barreto et al., 2006a, 2006b, 2008). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of "Personal communication" or "Unpublished results", all contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used).

**Numbers:** In the text, numbers nine or below must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number, but if doing so write the number out. URLs for programs, data or other sources should be listed in the text, or as a footnote. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the References section.

e) **Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the Discussion section and includes references to grant support or any technical or intellectual contribution.

f) **References** must be ordered alphabetically by the first author surname. References with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; second, with only one co-author in alphabetical order by the second author; and third, references with more than two co-authors, in alphabetical order by the second or subsequent authors. Journal titles should not be abbreviated. Authors should avoid citation of theses, conference proceedings or technical reports, mainly for reasons of accessibility. A maximum of three such citations will be allowed. Only articles that are published or in press should be included in this section. Manuscripts submitted for publication but not yet accepted may not be cited. Personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted. Authors must provide appropriate evidence for “in press” articles and “personal communications”.

#### **Formatting of references:**

##### **Journal article:**

Reis RF, Goes A, Timmer LW (2006) Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on black spot severity on sweet orange. *Fitopatologia Brasileira* 31:29-34.

Arnold AE, Medjia LC, Kyllö D, Roj as EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 26:15649- 15654.

##### **Book chapter:**

Campos VP, Villa in L (2005) Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J (Eds.) *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford, UK. CAB International. pp. 529-580.

##### **Book:**

Agrios G N (2005) *Plant Pathology*. 5th Ed. Amsterdam, The Netherlands. Elsevier Academic Press.

**Edited book:**

Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) (2005) Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª. Ed. São Paulo, SP. Ceres.

**Electronic article:**

CONAB. Cana-de-açúcar, safra 2006-2007. Available at: [www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BoletimCana-Novembro2006-07.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BoletimCana-Novembro2006-07.pdf). Accessed on October 12, 2008.

**Thesis:**

(Authors should avoid citation of theses, conference proceedings or technical reports, mainly for reasons of accessibility. A maximum of three such citations will be allowed.)

Zerbini FM (1996) Aspects of the epidemiology of lettuce mosaic in the Salinas Valley of California, and the production of LMV-resistant transgenic lettuce plants. PhD Thesis, University of California. Davis, CA, USA.

**Conference proceedings:**

Igarashi S, Utiamada CM, Igarashi LC, Kazuma AH, Lopes RS (1986) Ocorrência de *Pyricularia* sp. em trigo no estado do Paraná. In: 14ª Reunião Nacional de Pesquisa de Trigo, Resumos... Londrina, PR. IAPAR. p. 57.

**Technical reports:**

Fawcett HS (1911) S caly bark or nail head rust of citrus. Florida Agriculture Experiment Station Bulletin 106.

g) **Tables:** Place tables after the References section. Each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated preferably in lowercase superscript numbers, but lowercase letters may be used when the column titles contain numbers.

h) **Figures** must be numbered consecutively in Arabic numerals and should be sized to fit approximately within the columns of the journal. Legends should be in the main text, after the tables. Please insert Keys and scale bars, when applicable, directly in the figure. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIFF or JPEG format and provided as separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Special care must be taken with the quality of the images. The commonly used procedure of taking pictures with a digital camera placed above a microscope eyepiece normally yields poor quality images with shaded periphery that are inadequate for publication. It is highly recommended to indicate details of

interest in pictures with arrows accompanied with explanations of what has been indicated in the legend.

i) **Nomenclature** of scientific names should adhere to current international standards for each class of organisms. Scientific names should appear in full and followed by authority the first time they appear in the body of the text (but not followed by authority in the title, abstract, key words, tables or legends), and abbreviated and without authorities later. Whenever a scientific names appear at the beginning of a sentence it must be given in full.

Plants: *The International Plant Names*

*Index*, <<http://www.ipni.org/index.html>>

Fungi: *Index*

*Fungorum*, <<http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>>

Bacteria: <[http://www.isppweb.org/names\\_bacterial.asp](http://www.isppweb.org/names_bacterial.asp)>

Nematodes: <<http://www.iczn.org/iczn/index.jsp>>

Viruses: according to the International Code for Classification and Nomenclature, published in the 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV (2011).

j) **Cultures and other reference material:** Source and deposit of cultures should be indicated. Voucher cultures and specimens documenting their research as well as nucleotide sequences should be deposited at certified or recognized international institutions and accession numbers and place of deposit indicated in the text or as a footnote in the title page.

k) **Data access:** Reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) **Abbreviations and Units:** SI units should be used, such as mg, g, m, mm, L, mL,  $\mu$ L, h, min, s, mol, kg/ha. If a non-standard abbreviation is to be used, it should be defined in full when cited in the text for the first time.

m) **Crop Protection Products:** Only technical names or names of active compounds should be used. It is not recommended that authors mention commercial names of products or of the companies which produce them, so as not to suggest utilization. Chemical formulas should be written on one line and follow standard nomenclature.

## 2 Short Communication

Present brief observations or results that do not warrant full-length articles. Preliminary communications of ongoing work are not acceptable as short communications. Individual first reports of plant diseases should be submitted as Short Communications. These manuscripts may include illustrations of the pathogen, indication of deposit of reference material with public access, including DNA sequences (whenever available or in cases where they are indispensable), and documentation as required by specific legislation, such as, in the case of records from Brazil, abiding to the rules established by the Ministry of Agriculture.

Short Communications should be 12 or fewer typed pages in A4-size, 2,5 cm margins, double-spaced 12-point type, including references but not tables and figure legends. They should include an Abstract, not longer than 200 words and no further subdivision. All its content should be in a single section with no subtitles such as introduction, material and methods, results and discussion. Up to two tables and two figures, or any combination of four such items, may be submitted in a Short Communication. The title page and reference section format is that of a full-length article.

### **3 Letter to the Editor**

This may relate or respond to recent published items of interest to the area of Plant Pathology. Discussions of political, social and ethical issues of interest to plant pathologists are also welcome in this format. Letters to the Editor should be no longer than two typed pages in A4- size, 2,5 cm margins, double-spaced 12-point type, including references (if applicable). They should not include an Abstract or any subdivision of the text. If absolutely necessary, they may include one figure or table.

### **4 Review Article**

Review Articles are welcome. Authors should contact the Editor before submission. Review Articles are subjected to peer review in the same fashion as regular research articles. Reviews should have no more than 40 typed pages in A4-size, 2,5 cm margins, double-spaced 12-point type, including references, tables and figures. The title page and reference format is that of a full-length article. They should include an Abstract, not longer than 200 words. The text may be subdivided according to the authors' discretion.

### **Proofs**

Page proofs will be sent to the corresponding author. Notes added in proof require Editorial approval. Proofs should be returned within 72 hours.

### **Reprints**

Reprints are free of charge and will become available as a pdf-file at TPP's web site in the SciELO gateway.

### **Authorship**

Those who submit papers to **Tropical Plant Pathology** should respect the value of the research of their peers by not devaluing authorship. Each author should have made a substantial intellectual contribution to the design, conduct, analysis, or interpretation of the study. Each author must approve the final version of the article to be published, and be willing to take public responsibility for their contribution to the paper. In addition, all authors are expected to take public responsibility for the entire paper, irrespective of their specific contribution. TPP's manuscript handling system provides

plagiarism detection tools to the Editors, Section Editors and Reviewers. Detection of plagiarism is grounds for immediate rejection of manuscripts.

**instructions are also available at TPP's web sites at the SBF  
(<http://www.sbfito.com.br/tpp>) and SciELO  
(<http://www.scielo.br/revistas/tpp/pinstruc.htm>) gateways.**