

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

GISLAINE NASCIMENTO VIEIRA DE SÁ

Xanthomonas spp. ASSOCIADAS À MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO EM
MINAS GERAIS E SEU CONTROLE POR SUSPENSÃO INATIVADA DO PATÓGENO

Uberlândia – MG

2021

GISLAINE NASCIMENTO VIEIRA DE SÁ

Xanthomonas spp. ASSOCIADAS À MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO EM
MINAS GERAIS E SEU CONTROLE POR SUSPENSÃO INATIVADA DO PATÓGENO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de “mestre” em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nilvanira Donizete
Tebaldi

Uberlândia – MG

2021

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

S111 Sa, Gislaine Nascimento Vieira de, 1995-
2021 Xanthomonas spp. associadas à mancha bacteriana do
tomateiro em Minas Gerais e seu controle por suspensão
inativada do patógeno [recurso eletrônico] / Gislaine
Nascimento Vieira de Sa. - 2021.

Orientadora: Nilvanira Donizete Tebaldi.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Agronomia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.501>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Agronomia. I. Tebaldi, Nilvanira Donizete ,1970-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-
graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Secretaria da Coordenação 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:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 013/2021, PPGAGRO				
Data:	Vinte e seis de agosto de dois mil e vinte e um	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	13:00
Matrícula do Discente:	11912AGR009				
Nome do Discente:	Gislaine Nascimento Vieira de Sá				
Título do Trabalho:	<i>Xanthomonas</i> spp. associadas à mancha bacteriana do tomateiro em Minas Gerais e seu controle por suspensão inativada do patógeno				
Área de concentração:	Produção Vegetal				
Linha de pesquisa:	Controle e Manejo Integrado de Doenças				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agronomia, assim composta: Professores Doutores: Alison Talis Martins Lima - UFU; Ricardo Magela de Souza - UFLA; Alice Maria Quezado Duval - EMBRAPA HORTALIÇAS; Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi, 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(as) 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 Mestre.

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 **Nilvanira Donizete Tebaldi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/08/2021, às 13:30, 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 26/08/2021, às 13:31, 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 26/08/2021, às 13:37, 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 **Ricardo Magela de Souza, Usuário Externo**, em 30/08/2021, às 10:36, 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,
informando o código verificador **2951372** e o código CRC **FE25D82E**.

GISLAINE NASCIMENTO VIEIRA DE SÁ

Xanthomonas spp. ASSOCIADAS À MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO EM
MINAS GERAIS E SEU CONTROLE POR SUSPENSÃO INATIVADA DO PATÓGENO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de “mestre” em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nilvanira Donizete Tebaldi

Uberlândia, 26 de agosto de 2021.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Alison Talis Martins Lima – UFU

Prof.^a Dr.^a Alice Maria Quezado Duval – EMBRAPA HORTALIÇAS

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza – UFLA

Aos meus pais Lucivania Maria Nascimento de Sá e

Pedro Carlos Vieira de Sá, com amor

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus, pelo dom da vida. Por me sustentar, me dar forças e me guiar. Pelas bençãos concedidas e por se fazer presente nos mínimos detalhes, me mostrando que Ele estava comigo todos os dias durante essa caminhada.

À Virgem Maria, por passar na frente e abrir estradas e portas no caminho. Por cuidar de tudo que não estava ao meu alcance. Aos Santos e Anjos do Céu, em especial à Santa Rita de Cássia, que intercedem por mim à Deus.

À Universidade Federal de Uberlândia, instituição que me acolheu desde o ingresso na graduação em 2013.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, que possibilitou a realização da pesquisa.

Aos meus pais, Pedro e Lucivania, que com esforço e suor, lutaram e lutam para fazer de mim o que sou hoje. Gratidão pelo incentivo, amor, paciência e compreensão.

Ao meu noivo, amigo e companheiro, Luiz Carlos Júnior. Por viver intensamente cada pedacinho dessa jornada comigo. Por ser a mão que me levantou e o ombro que me acalmou. Por me ajudar arduamente com os experimentos e análises estatísticas.

À minha amiga do coração, Maria Clara e sua família. Pelo companheirismo, apoio e ajuda com os experimentos. Por me acolher em sua casa durante a pandemia, como irmã.

À minha amiga irmã Thais, que mesmo longe se fez presente. Obrigada pelo apoio e pela torcida.

Aos meus sogros Luiz Carlos e Elisangela, pela torcida e pela mobilização e arrecadação de inúmeras garrafas PET, essenciais para a condução do experimento.

À minha orientadora Nilvanira, agradeço a confiança e apoio para a realização deste trabalho. Sobretudo pelos ensinamentos, palavras de carinho e por orientar e confortar nos meus momentos de desorientação e desespero.

As minhas companheiras de laboratório Rayane e Morgana. Pela ajuda e momentos de descontração, deixando o trabalho mais leve, principalmente em tempos de pandemia.

Aos técnicos de laboratório Lara Caroline, pelos ensinamentos, paciência e ajuda na construção dos dendrogramas; Júlia e Roberto, por toda assistência no laboratório.

À professora Ana Paula, pela bondade e disponibilidade em ajudar e auxiliar nas análises do programa computacional Genes.

À Embrapa Hortaliças, pelos isolados cedidos.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU, pelo empréstimo do Nanodrop, utilizado para a quantificação do DNA bacteriano.

Ao Matheus Vilhena e ao Ricardo Nanuci, da Syngenta, por disponibilizarem o produto Bion para a realização do experimento em casa de vegetação.

A todos os professores da Pós-graduação em Agronomia, pelos ensinamentos e contribuição para a minha formação. Vocês fazem a diferença!

A todos os funcionários que zelam pela UFU, que estão sempre dispostos a ajudar. Em especial aos vigilantes e responsáveis pela limpeza, que foram essenciais, principalmente durante a pandemia.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições para melhoria deste trabalho.

A todos os familiares e amigos que rezaram e torceram por mim.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

RESUMO

A mancha bacteriana do tomateiro, causada por espécies do gênero *Xanthomonas*: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Xee), *X. hortorum* pv. *gardneri* (Xhg), *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep) e *X. vesicatoria* (Xv), é uma das principais doenças bacterianas da cultura, pois reduz significativamente a produção. Métodos bioquímicos e moleculares permitem a caracterização, distinção entre espécies e a avaliação do grau de variação genética dentro das populações. O controle químico da mancha bacteriana não é eficiente e medidas alternativas de controle devem ser avaliadas. Os objetivos do trabalho foram (i) caracterizar 29 isolados obtidos de tomate mesa com sintomas de mancha bacteriana coletados no Espírito Santo e Minas Gerais; (ii) avaliar o controle da mancha bacteriana do tomateiro utilizando a suspensão bacteriana inativada em aplicações preventiva e curativa. A identificação das espécies foi realizada por PCR, utilizando primers específicos. A diversidade genética foi avaliada por rep-PCR, a partir do dendrograma de similaridade. As suspensões inativadas de *X. hortorum* pv. *gardneri* foram utilizadas em aplicação preventiva e curativa para o controle da mancha bacteriana do tomateiro. As inativações das suspensões bacterianas (SBI) foram obtidas por: exposição à radiação de luz ultravioleta (SBI-UV); esterilização em autoclave (SBI-E); envelhecimento em meio de cultura (SBI-MC); e envelhecimento da suspensão em bancada de laboratório (SBI-S). No primeiro ensaio, as plantas foram pulverizadas preventivamente com as SBIs, hidróxido de cobre, acibenzolar-S-metil (ASM) e água (testemunha), e dois dias após foram inoculadas com a suspensão bacteriana patogênica (10^8 e 10^9 UFC mL $^{-1}$). Na aplicação curativa, as plantas foram inoculadas com a suspensão bacteriana patogênica e dois dias após pulverizadas com os produtos. No segundo ensaio, as plantas foram pulverizadas preventivamente com as SBI-UV (10^8 UFC mL $^{-1}$) e SBI-E (10^8 e 10^9 UFC mL $^{-1}$), hidróxido de cobre, ASM e água. Após dois dias foram inoculadas com a suspensão bacteriana (10^7 e 10^8 UFC mL $^{-1}$). A severidade da doença foi avaliada e calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Todos os isolados apresentaram características bioquímicas de isolados do gênero *Xanthomonas* e 12 isolados não identificados não apresentaram morfologia das colônias típicas. Apenas 17 isolados foram identificados quanto à espécie, sendo um como Xee, 14 como Xep e dois como Xhg. As análises de rep-PCR revelaram alta diversidade genética entre os isolados, os grupos formados não apresentaram relação direta com as espécies, morfologia das colônias, caracterização bioquímica ou localização geográfica. No primeiro e no segundo ensaio, em aplicação preventiva os produtos SBI-UV, SBI-E e ASM reduziram significativamente a

severidade da doença. No primeiro ensaio, na aplicação curativa não houve diferença significativa entre os produtos. As SBI-UV e SBI-E foram eficazes em aplicação preventiva para o controle da mancha bacteriana do tomateiro, reduzindo a severidade da doença.

Palavras-chave: caracterização molecular; controle biológico; indução de resistência; *Solanum lycopersicum*; *Xanthomonas*

ABSTRACT

Tomato bacterial spot, caused by species of *Xanthomonas* genus: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Xee), *X. hortorum* pv. *gardneri* (Xhg), *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep) and *X. vesicatoria* (Xv), is one of the main bacterial diseases of the crop, as it significantly reduces production. Biochemical and molecular methods allow characterization, distinction between species, and assessment of the degree of genetic variation within populations. Chemical control of the disease is not efficient, and alternative control measures should be assessed. The objectives of the work were (i) to characterize morphology, biochemical and molecularly 29 isolates obtained from tomato plants with bacterial spot symptoms collected in Espírito Santo and Minas Gerais; (ii) to evaluate the control of tomato bacterial spot using inactivated bacterial suspension, in preventive and curative applications. Species identification was performed by PCR, using specific primers. The genetic diversity was evaluated by rep-PCR using similarity dendrogram. Inactivated suspensions of *X. hortorum* pv. *gardneri* were used in preventive and curative application to control tomato bacterial spot. Inactivated of bacterial suspensions (IBS) were obtained by: exposure to ultraviolet light radiation (IBS-UV); autoclave sterilization (IBS-E); aging in culture medium (IBS-MC); and aging of the suspension on the laboratory bench (IBS-S). In the first assay, plants were preventively sprayed with the IBSs, copper hydroxide, acibenzolar-S-methyl (ASM) and water (control), and two days later were inoculated with the pathogenic bacterial suspension (10^8 and 10^9 CFU mL $^{-1}$). In the curative application, the plants were inoculated with the pathogenic bacterial suspension and two days later, sprayed with the products. In the second assay, the plants were preventively sprayed with IBS-UV (10^8 CFU mL $^{-1}$) and IBS-E (10^8 and 10^9 CFU mL $^{-1}$), copper hydroxide, ASM and water. After two days, were inoculated with the bacterial suspension (10^7 and 10^8 CFU mL $^{-1}$). Disease severity was assessed and the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) was calculated. All isolates showed biochemical characteristics of *Xanthomonas* and 12 unidentified isolates did not show typical colony morphology. Only 17 isolates were identified at species level, one as Xee, 14 as Xep and two as Xhg. Rep-PCR analyses revealed high genetic diversity among the isolates, the groups formed did not show a direct relationship with the species, colony morphology, biochemical characterization, or geographic location. In the first and second assay, in preventive application, IBS-UV, IBS-E and ASM significantly reduced disease severity. In the first assay, in the curative application there was no significant difference between the products.

IBS-UV and IBS-E effectively controlled tomato bacterial spot in the preventive application, reducing the disease severity.

Keywords: biological control; induced resistance; molecular characterization; *Solanum lycopersicum*; *Xanthomonas*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1. DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Xanthomonas* spp. PATOGÊNICAS AO TOMATEIRO

- Figura 1.** Variação na morfologia das colônias de isolados obtidos de tomate mesa (*Solanum lycopersicum* L.) com sintomas de mancha bacteriana, cultivados em meio de cultura 523, após 48h de incubação.....66
- Figura 2.** Amplificação de fragmentos de DNA de *Xanthomonas* spp. do tomateiro com primers específicos (Koenraadt et al. 2009). ¹Xep: *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (197 pb – K42), ²Xee: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (173 pb – I39), ³Xhg: *X. hortorum* pv. *gardneri* (154 pb – B27), ⁴Xv: *X. vesicatoria* (138 pb – I217). M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, Kasvi).....67
- Figura 3.** Amplificação de DNA genômico extraído (50 ng/µL) e suspensão bacteriana (10⁸ UFC/mL) de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep – K42), *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Xee – I39), *X. hortorum* pv. *gardneri* (Xhg – B27) e *X. vesicatoria* (Xv – I217), por PCR convencional com primers específicos (Koenraadt et al. 2009). ¹DNA genômico extraído, ²Suspensão bacteriana. M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, Kasvi).....68
- Figura 4.** Amplificação de DNA genômico extraído (400-800 ng/µL) e suspensão bacteriana concentrada de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep – K42), *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Xee – I39), *X. hortorum* pv. *gardneri* (Xhg – B27), *X. vesicatoria* (Xv – I217) e das espécies simultaneamente, por PCR multiplex com primers específicos (Koenraadt et al. 2009). ¹DNA genômico extraído, ²Suspensão bacteriana. M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, Kasvi).....69
- Figura 5.** Dendrograma de agrupamento pelo método UPGMA de isolados obtidos de tomate mesa com sintomas de mancha bacteriana utilizando os primers REP1R e REP2. Coeficiente de correlação cofenética: 0,95. Similaridade máxima: 1,0. Similaridade mínima: 0. ¹Morfologia das colônias idêntica, ²Provenientes da mesma cidade, ³Obtidos no mesmo ano. Xep: *X. euvesicatoria* pv. *perforans*; Xee: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*; Xhg: *X. hortorum* pv. *gardneri*; Xv: *X. vesicatoria*; Nid: Não identificados com primers específicos.73
- Figura 6.** Dendrograma de agrupamento pelo método UPGMA de isolados obtidos de tomate mesa com sintomas de mancha bacteriana utilizando os primers ERIC1R e ERIC2. Coeficiente de correlação cofenética: 0,94. Similaridade máxima: 1,0. Similaridade mínima: 0. ¹Morfologia das colônias idêntica, ²Caracterização bioquímica idêntica, ³Provenientes da mesma cidade, ⁴Mesmo ano. Xep: *X. euvesicatoria* pv. *perforans*; Xee: *X. euvesicatoria* pv.

eunesicatoria; Xhg: *X. hortorum* pv. *gardneri*; Xv: *X. vesicatoria*; Nid: Não identificados com primers específicos.....74

Figura 7. Dendrograma de agrupamento pelo método UPGMA de isolados obtidos de tomate mesa com sintomas de mancha bacteriana utilizando o primer BOXA1R. Coeficiente de correlação cofenética: 0,96. Similaridade máxima: 1,0. Similaridade mínima: 0. ¹Morfologia das colônias idêntica, ²Caracterização bioquímica idêntica, ³Provenientes da mesma cidade, ⁴Mesmo ano. Xep: *X. eunesicatoria* pv. *perforans*; Xee: *X. eunesicatoria* pv. *eunesicatoria*; Xhg: *X. hortorum* pv. *gardneri*; Xv: *X. vesicatoria*; Nid: Não identificados com primers específicos.....75

Figura 8. Dendrograma de agrupamento pelo método UPGMA de isolados obtidos de tomate mesa com sintomas de mancha bacteriana por rep-PCR (REP, ERIC e BOX-PCR). Coeficiente de correlação cofenética: 0,91. Similaridade máxima: 1,0. Similaridade mínima: 0. ¹Provenientes da mesma cidade, ²Mesmo ano. Xep: *X. eunesicatoria* pv. *perforans*; Xee: *X. eunesicatoria* pv. *eunesicatoria*; Xhg: *X. hortorum* pv. *gardneri*; Xv: *X. vesicatoria*; Nid: Não identificados com primers específicos.76

CAPÍTULO 2. CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO COM SUSPENSÃO INATIVADA

Figura 1. Crescimento de *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* da suspensão bacteriana envelhecida em meio de cultura por 8 meses (A) e envelhecida em bancada de laboratório por 9 meses (B), após 72 h de incubação.....98

Figura 2. Curva de progresso da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, em aplicação preventiva (A) e curativa (B), com diferentes suspensões bacteriana inativadas (SBI). UV: Luz ultravioleta; E: Esterilização; MC: Meio de cultura; S: Suspensão; AMS: Acibenzolar-S-metil; Cu(OH)₂: Hidróxido de cobre.100

Figura 3. Boxplot da área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, em aplicação preventiva (A) e curativa (B), de diferentes suspensões bacterianas inativadas (SBI) e diferentes concentrações de inóculo patogênico (*X. hortorum* pv. *gardneri*) (10⁸ e 10⁹ UFC/mL). UV: Luz ultravioleta; E: Esterilização; MC: Meio de cultura; S: Suspensão; AMS: Acibenzolar-S-metil; Cu(OH)₂: Hidróxido de cobre.101

Figura 4. Curva de progresso da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, em aplicação preventiva, com diferentes suspensões bacterianas inativadas (SBI). UV: Luz ultravioleta na concentração de 10⁸ UFC/mL; E 10⁸: Esterilização na concentração de 10⁸ UFC/mL; E 10⁹:

Esterilização na concentração de 10^9 UFC/mL; AMS: Acibenzolar-S-metil; Cu(OH)₂: Hidróxido de cobre.....103

Figura 5. Boxplot da área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, em aplicação preventiva, de diferentes suspensões bacterianas inativadas (SBI) e diferentes concentrações de inóculo patogênico (*X. hortorum* pv. *gardneri*) (10^7 e 10^8 UFC/mL). UV: Luz ultravioleta na concentração de 10^8 UFC/mL; E 10^8 : Esterilização na concentração de 10^8 UFC/mL; E 10^9 : Esterilização na concentração de 10^9 UFC/mL; AMS: Acibenzolar-S-metil; Cu(OH)₂: Hidróxido de cobre.....104

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1. DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Xanthomonas* spp. PATOGÊNICAS AO TOMATEIRO

Tabela 1. Isolados obtidos de tomate mesa (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) com sintomas de mancha bacteriana, coletados no Espírito Santo e Minas Gerais, preservados e mantidos na coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia–MG.....	58
Tabela 2. Conjunto de primers para a identificação de <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i> (Xee), <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> (Xep), <i>X. hortorum</i> pv. <i>gardneri</i> (Xhg) e <i>X. vesicatoria</i> (Xv).....	61
Tabela 3. Morfologia das colônias, caracterização bioquímica, molecular e patogenicidade de isolados obtidos de tomate mesa, com sintomas de mancha bacteriana.....	64

CAPÍTULO 2. CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO COM SUSPENSÃO INATIVADA

Tabela 1. Área abaixo da curva de progresso da mancha bacteriana do tomateiro, em aplicação preventiva e curativa das suspensões bacterianas inativadas (SBI-UV, -E, -MC, -S), com duas concentrações de inóculo patogênico (<i>X. hortorum</i> pv. <i>gardneri</i>) (10^8 e 10^9 UFC/mL).....	98
Tabela 2. Área abaixo da curva de progresso da mancha bacteriana do tomateiro, em aplicação preventiva das suspensões bacterianas inativadas (SBI-UV 10^8 , -E 10^8 , -E 10^9), com duas concentrações do inóculo patogênico (<i>X. hortorum</i> pv. <i>gardneri</i>) (10^7 e 10^8 UFC/mL).....	102

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	17
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
1.1 A cultura do tomateiro	19
1.2 Mancha bacteriana.....	20
1.2.1 Etiologia	20
1.2.2 Sintomatologia	21
1.2.3 Epidemiologia	22
1.3 Caracterização bioquímica	23
1.4 Caracterização molecular	24
1.4.1 Identificação de espécies.....	24
1.4.2 Diversidade genética por rep-PCR	25
1.5 Controle	27
1.6 Indução de resistência	28
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 1.....	52
Diversidade genética de <i>Xanthomonas</i> spp. patogênicas ao tomateiro	53
RESUMO	54
ABSTRACT	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	58
Obtenção dos isolados de <i>Xanthomonas</i> spp.....	58
Morfologia das colônias, caracterização bioquímica e patogenidade no hospedeiro.....	60
Caracterização molecular por PCR.....	60
Identificação de espécies de <i>Xanthomonas</i> utilizando <i>primers</i> específicos.....	61
PCR multiplex	62
PCR com suspensão bacteriana.....	62
Diversidade genética por rep-PCR	63
Dendrograma	63
RESULTADOS.....	64
Morfologia das colônias e caracterização bioquímica dos isolados de <i>Xanthomonas</i>	64

Identificação das espécies de <i>Xanthomonas</i> utilizando primers específicos	67
PCR multiplex	68
PCR com suspensão bacteriana	68
Diversidade genética	69
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	81
CAPÍTULO 2	89
Controle da mancha bacteriana do tomateiro com suspensão bacteriana inativada	90
RESUMO	91
ABSTRACT	92
INTRODUÇÃO	93
MATERIAL E MÉTODOS	95
Obtenção do inóculo patogênico	95
Obtenção das suspensões bacterianas inativadas	95
Primeiro ensaio em casa de vegetação: aplicações preventiva e curativa da suspensão bacteriana inativada	96
Segundo ensaio em casa de vegetação: aplicação preventiva da suspensão bacteriana inativada	96
Avaliação da severidade	97
RESULTADOS	97
Primeiro ensaio	97
Segundo ensaio	101
DISCUSSÃO	104
CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS	107
ANEXO A – PATENTE DE INVENÇÃO	113

INTRODUÇÃO GERAL

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ocupa posição de destaque no cenário agrícola, sendo amplamente cultivado em todo território nacional. É uma das hortaliças de maior representatividade em termos de comercialização e na mesa dos brasileiros (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, 2021). A produção no Brasil em 2020 atingiu aproximadamente quatro milhões de toneladas em uma área de mais de 55 mil ha (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2021). Cerca de duzentas doenças, causadas por fatores bióticos e abióticos, já foram relatadas afetando a tomaticultura em todo o mundo, limitando a produtividade (LOPES; ÁVILA, 2005).

Dentre as doenças que acometem a cultura, a mancha bacteriana do tomateiro, causada por espécies do gênero *Xanthomonas*, ocorre em diversas regiões do país. Desde a identificação, a partir de incessantes reanálises do genoma, o patógeno foi reclassificado diversas vezes. Atualmente consideram-se as espécies *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (CONSTANTIN et al., 2016), *X. hortorum* pv. *gardneri* (MORINIÈRE et al., 2020) e *X. vesicatoria* (JONES et al., 2004). A doença é favorecida por temperaturas que variam de 20 °C a 30 °C, elevada umidade (>90%), chuvas e ventos (INOUE-NAGATA et al., 2016; LOPES; ÁVILA, 2005). Pode afetar todos os órgãos da parte aérea, provocando lesões nas folhas, frutos, caule e o consequente desfolhamento, expondo os frutos ao sol. O resultado é a redução significativa na produção de frutos comercializáveis (LOUWS et al., 2001; QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

A aplicação de testes bioquímicos propicia a caracterização e a rápida distinção entre gêneros de fitobactérias, incluindo espécies de *Xanthomonas* (STALL et al., 1994). A aplicação de técnicas moleculares, como a amplificação de fragmentos do genoma por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) além da distinção entre espécies promove a avaliação do grau de variação genética dentro das populações bacterianas, sendo mais estáveis e precisas (LOUWS et al., 1999). As principais características bioquímicas que permitem a distinção entre espécies de *Xanthomonas* spp. são a atividade amidolítica e pectolítica (BOUZAR et al., 1994; JONES et al., 2004; 2005; STALL et al., 1994).

A diversidade genética pode ser analisada através do uso de diversas técnicas moleculares, como a rep-PCR (LOUWS et al., 1999). O método envolve a amplificação de sequências de DNA repetitivas conservadas específicas determinadas REP (“Repetitive Extragenic Palindromic”), ERIC (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) e elementos BOX, sendo distribuídas no genoma de diversas bactérias (LOUWS et al., 1999;

VERSALOVIC et al., 1991; 1994). O conhecimento das populações bacterianas auxilia em análises taxonômicas, evolutivas e epidemiológicas para elaboração de estratégias integradas de manejo da mancha bacteriana do tomateiro, como programas de diagnóstico, detecção e melhoramento genético (LOUWS et al., 1995).

Os métodos utilizados para o controle da doença não são eficazes, devido à limitação de produtos registrados e eficiência variável, além do surgimento de isolados resistentes a princípios ativos, como o cobre (MIRIK et al., 2007; POTNIS et al., 2015; QUEZADO-DUVAL et al., 2003). Apesar de esforços, o desenvolvimento de uma cultivar comercial de tomate que tenha resistência genética completa às diferentes espécies de *Xanthomonas* ainda não foi obtida (SHARMA; BHATTARAI, 2019). A baixa disponibilidade de produtos eficazes e de resistência do hospedeiro para o manejo de doenças bacterianas foliares do tomate tem estimulado esforços para a busca e desenvolvimento de novas estratégias para o controle da doença (LOUWS et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2013; QIAO et al., 2020).

Para reduzir a dependência de agroquímicos, novas formas de controle de doenças vêm se destacando. O uso de produtos comerciais que induzem a resistência, como o emprego de agentes biológicos, estão recebendo cada vez mais atenção (ANDRADE et al., 2013; FAILLACE et al., 2019). A resistência induzida ou resistência sistêmica adquirida (RSA) se baseia na ativação de mecanismos de resistência latentes que são expressos após o chamado "desafio" com um patógeno (STEINER; SCHONBECK, 1995; VAN LOON, 1997; VAN LOON et al., 1998). Relata-se que o tratamento utilizando raças e agentes não patogênicos, patógenos atenuados ou mortos pelo calor, pode conferir uma proteção contra ataques subsequentes de cepas virulentas do mesmo ou de microrganismos relacionados (CHESTER, 1933; KUÉ, 1972).

Diante disso, o objetivo do trabalho foi caracterizar isolados do gênero *Xanthomonas* em relação à morfologia das colônias, padrões bioquímicos e moleculares, avaliar a diversidade genética dos isolados e verificar o controle da mancha bacteriana do tomateiro com a aplicação da suspensão bacteriana inativada.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é originado da espécie silvestre *Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*, que produz fruto do tipo “cereja”. Nativo das regiões andinas da América do Sul foi domesticado no México e introduzido na Europa entre 1523 e 1544 (FILGUEIRA, 2008). Posteriormente difundiu-se para a Ásia, África e Oriente Médio (ESQUINAS-ALCAZAR, 1981; NAIKA et al., 2006). No Brasil, a cultura foi introduzida no final do século XIX por imigrantes europeus (FILGUEIRA, 2003).

Visto como um fruto tóxico, inicialmente o tomate não tinha fins culinários, apenas ornamentais. É a segunda olerícola mais produzida no mundo, sendo sua produção superada apenas pela batata (CAMARGO et al., 2006). Os frutos são ricos em minerais, vitaminas B e C, aminoácidos essenciais, açúcares, fibras dietéticas, ferro e fósforo (NAIKA et al., 2006). Além disso, a presença de variados antioxidantes como o licopeno, ácido ascórbico e compostos fenólicos, está associada à diminuição do risco de alguns tipos de câncer (GEORGE et al., 2004).

As variedades se diferenciam quanto ao destino final, sendo destinadas ao processamento industrial e à mesa do consumidor. A produção total no Brasil em 2020 superou quatro milhões de toneladas, com um rendimento médio de 71,2 t ha⁻¹, em uma área que ultrapassou 55 mil ha. A maior parte dessa produção se concentrou nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, que juntas atingiram quase três milhões de toneladas. Os principais estados produtores são Goiás, São Paulo e Minas Gerais, que foram responsáveis por aproximadamente 66% da produção nacional no ano de 2020 (IBGE, 2021).

Diversos são os fatores que contribuem para a redução da produção, incluindo doenças causadas por fungos, vírus e bactérias. As principais fitobactérias que provocam doenças no tomateiro são espécies dos gêneros *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e *Pectobacterium*. A mancha bacteriana do tomateiro, causada por espécies de *Xanthomonas*, ocasiona sérios prejuízos na cultura, podendo resultar na destruição do tecido foliar e derrubada de flores e frutos em formação (LOPES; ÁVILA, 2005).

1.2 Mancha bacteriana

1.2.1 Etiologia

As espécies de *Xanthomonas* que infectam o tomateiro pertencem ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Xanthomonadales, família Xanthomonadaceae e gênero *Xanthomonas* (GARRITY; HOLT, 2000). Se tratam de bactérias Gram-negativas, baciliformes, aeróbicas e móveis por um flagelo polar (INOUE-NAGATA et al., 2016; JONES et al., 1997; SCHAAD et al., 2001), que se caracterizam pela formação de colônias amarelas devido a produção do pigmento xantomonadina (STALL, 1993).

O histórico da etiologia do patógeno é complexo e apresentou diversas classificações. Segundo Jones et al. (1998), a doença foi identificada pela primeira vez no tomateiro em 1914, na África do Sul. Em 1920, foi nomeada “tomato canker” por Ethel Doidge, que descreveu o agente causal como *Bacterium vesicatorium* e determinou que o mesmo apresentava uma fraca atividade amidolítica. Concomitantemente, Gardner e Kendrick (1921) relataram nos Estados Unidos uma bactéria causando os mesmos sintomas, sendo descrita como *Bacterium exitiosum*. A doença foi chamada de “bacterial spot” ou mancha bacteriana e apresentava forte atividade amidolítica. Após testes comparativos, Gardner e Kendrick (1923) concluíram que ambos patógenos eram quase idênticos, sendo assim, a bactéria ficou conhecida como *Bacterium vesicatorium* Doige. Além disso, já se sabia que a espécie também infectava o pimentão.

Os agentes causais foram reclassificados como *Pseudomonas vesicatoria* em 1925; *Phytomonas vesicatoria* em 1930; *Xanthomonas vesicatoria* em 1939 e então *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (JONES et al., 1998). A mesma bactéria foi identificada em plantas de tomate na Iugoslávia e denominada *Pseudomonas gardneri* por Šutic (1957). Entretanto, a partir de testes morfológicos e bioquímicos, Dye (1966) afirmou que a mesma se tratava de *Xanthomonas vesicatoria*. Mais tarde, a partir de estudos de diversidade, seria reclassificada como uma espécie a parte, denominada *Xanthomonas gardneri* (JONES et al., 2000).

Em 1966, Dye confirmou uma maior atividade amidolítica em isolados provenientes do tomate, se diferindo dos isolados advindos do pimentão, que hidrolisavam amido mais fracamente. Consequentemente houve uma reclassificação, com subdivisão em duas espécies: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A, não apresenta atividade amidolítica) e *Xanthomonas vesicatoria* (grupo B, apresenta atividade amidolítica) (BOUZAR et al., 1996; VAUTERIN et al., 1995; 2000).

Com o avanço dos estudos e o emprego de técnicas moleculares, a partir de 1990, determinou-se a existência de quatro grupos fenotípicos e três espécies: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupos A e C), *Xanthomonas vesicatoria* (grupo B) e *Xanthomonas gardneri* (grupo D) (JONES et al., 2000). Posteriormente, os grupos A e C foram reclassificados, adotando-se as espécies *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas perforans*, respectivamente. Sendo assim, consideravam-se quatro espécies, caracterizadas com os seguintes grupos e raças: *X. euvesicatoria* (grupo A, raça T1); *X. vesicatoria* (grupo B, raça T2); *X. perforans* (grupo C, raças T3 e T4) e *X. gardneri* (grupo D, raça T2) (JONES et al., 2004; 2005). As raças são definidas de acordo com a reação de hipersensibilidade (HR) em variedades hospedeiras diferenciais (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

Após análises por sequência multilocus (MLSA), Young et al. (2008) sugeriram que *X. gardneri* poderia ser um sinônimo de *X. cynarae*, causadora da mancha bacteriana das brácteas da alcachofra (*Cynara scolymus*) (TRÉBAOL et al., 2001). Diante disso, a espécie foi reclassificada como *X. cynarae* pv. *gardneri* (TIMILSINA et al., 2019). Posteriormente, Morinière et al. (2020) propuseram que *X. cynarae* seria sinônimo de *X. hortorum*. Resultados de MLSA demonstraram que *X. euvesicatoria* e *X. perforans* também apresentavam uma relação filogenética similar (YOUNG et al., 2008). Sendo assim, recentemente, as três espécies foram reclassificadas como *X. hortorum* pv. *gardneri* (MORINIÈRE et al., 2020), *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* e *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (CONSTANTIN et al., 2016).

1.2.2 Sintomatologia

A doença ocorre no tomateiro em qualquer estágio de desenvolvimento da cultura, podendo afetar todos os órgãos da parte aérea (INOUE-NAGATA et al., 2016). Os sintomas foliares são a presença de manchas encharcadas, marrons e de formato irregular, que a princípio são observadas nas folhas mais velhas. As lesões se coalescem e apresentam um aspecto de queima, consequentemente os frutos são expostos ao sol. Quando situadas no pecíolo, caule, partes florais e pedúnculo, podem provocar a queda de flores e frutos. Estes, por sua vez, apresentam inicialmente pequenos pontos esbranquiçados que se desenvolvem tornando-se lesões marrons, corticosas, com bordos elevados (LOPES; ÁVILA, 2005) e diâmetro variando entre 2 e 10 mm, podendo ser circundadas por um halo amarelado a branco (GOODE; SASSER, 1980). Os sintomas provocados pelas espécies são praticamente idênticos, o que impossibilita a diagnose visual. A infecção isolada de *X. euvesicatoria* pv.

perforans é a mais característica por provocar perfurações ao centro das lesões, onde ocorreu a necrose (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

1.2.3 Epidemiologia

A mancha bacteriana é considerada uma das doenças mais importantes do tomateiro (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997). Favorecida por temperaturas que variam de 20 °C a 30 °C, elevada umidade (>90%), chuvas e ventos (INOUE-NAGATA et al., 2016; LOPES; ÁVILA, 2005), ataca as folhas, frutos e caule da planta, reduzindo significativamente a produção de frutos comercializáveis (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010). Os ferimentos e aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, são vias de entrada para a bactéria a fim do consequente desenvolvimento da doença (LOPES; ÁVILA, 2005; LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997).

A disseminação do patógeno ocorre por meio de ventos fortes associados à chuva, respingos de água de chuva, irrigação por aspersão, implementos agrícolas, tratos culturais, mudas e sementes contaminadas (INOUE-NAGATA et al., 2016; LOPES; ÁVILA, 2005; QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010; SILVA et al., 2010). A irrigação por gotejamento reduz o molhamento foliar, auxiliando na redução da severidade da doença (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

Araújo et al. (2011) constataram uma maior severidade da mancha bacteriana no tomateiro por *X. gardneri* quando submetida à temperatura de 20° C. O mesmo ocorre para *X. perforans*, quando sujeita à temperatura de 30 °C. Ambas as espécies são predominantes em plantações de tomate no Brasil (ARAÚJO et al., 2011; 2017; PEREIRA et al., 2011; QUEZADO-DUVAL; CAMARGO, 2004; QUEZADO-DUVAL et al., 2005). Estudos demonstram ainda o predomínio de *X. perforans* em campos brasileiros. Isso pode estar relacionado com a capacidade da espécie em produzir bacteriocinas (BCN-A e BCN-B), podendo fornecer uma habilidade competitiva sobre as outras (HERT et al., 2005), além da melhor adaptabilidade e agressividade em temperaturas elevadas (ARAÚJO et al., 2011). Não há correlação entre os tipos de tomate (processamento ou de consumo *in natura*) e a ocorrência de espécies de *Xanthomonas*. No entanto, linhagens de *X. gardneri* aparentemente se concentram em localidades de maiores altitudes, enquanto *X. perforans* estão homogeneamente distribuídas pelo país. Esse fato pode estar relacionado à melhor adaptabilidade da primeira espécie a temperaturas mais baixas (ARAÚJO et al., 2017).

As espécies de *Xanthomonas* exibem inúmeras estratégias de sobrevivência, resultando em diferentes tipos de inóculo primário (STALL et al., 2009). As principais fontes

de inóculo responsáveis por possíveis epidemias nos consequentes ciclos da cultura são sementes e mudas, plantas voluntárias de tomate ou “tigueras”, restos de culturas e plantas infestantes. A disseminação do patógeno a longas distâncias ocorre principalmente por meio da semente. As sementes advindas de frutos contaminados deixados no campo após a colheita e que germinam na estação de cultivo subsequente, são denominadas “tigueras” e servem de fonte de multiplicação de inóculo (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010). A bactéria não sobrevive no solo após a decomposição dos resíduos da colheita. O tempo de decomposição pode variar de semanas a meses, dependendo das condições ambientais. Baixas taxas de decomposição podem resultar em fonte de inóculo para o próximo ciclo (STALL et al., 2009).

Além do tomate (*Solanum lycopersicum*) e do pimentão (*Capsicum annuum*), o patógeno sobrevive em diversas plantas hospedeiras, principalmente espécies da Família Solanaceae, tais como pimenta (*Capsicum frutescens*), berinjela (*Solanum melongena*), batata (*Solanum tuberosum*), tomateiro selvagem (*Lycopersicon pimpinellifolium*) e diversas plantas daninhas (*Datura stramonium*, *Hyoscyamus aureus*, *Hyoscyamus niger*, *Lycium chinense*, *Lycium halimifolium*, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana rustica*, *Solanum dulcamara*, *Solanum nigrum* e *Solanum rostratum* (JONES et al., 1998). A sobrevivência nessas hospedeiras pode ocorrer de forma epífita, onde não há o desenvolvimento de sintomas visíveis (INOUE-NAGATA et al., 2016; STALL et al., 2009). No Brasil as plantas daninhas *Nicandra physaloides*, *Solanum americanum* e *Euphorbia heterophylla* foram encontradas com lesões foliares típicas de *Xanthomonas* entre tomateiros em lavouras comerciais. Isolados de *X. perforans* e *X. gardneri* foram identificados nas amostras coletadas (ARAÚJO et al., 2015).

1.3 Caracterização bioquímica

Métodos bioquímicos propiciam a rápida distinção entre gêneros de fitobactérias, incluindo espécies de *Xanthomonas*, sendo frequentemente adotados na identificação e em estudos de caracterização e diversidade. Dentre eles destaca-se a atividade amidolítica e pectolítica (BOUZAR et al., 1994; JONES et al., 2004; 2005; STALL et al., 1994).

A atividade amidolítica foi um dos primeiros indicativos da variação existente entre os isolados observados (JONES et al., 1998). Essa característica consiste na produção da enzima amilase, que tem a propriedade de digerir o amido. A presença da enzima na bactéria é verificada por meio da descoloração ao redor da colônia bacteriana corada com uma solução de lugol, indicando a hidrólise (FAHY; HAYWARD, 1983). A atividade pectolítica se dá por meio da produção da enzima pectato-liase pela bactéria. Essa enzima pectinase tem a

capacidade de degradar substâncias pécticas encontradas nas paredes celulares das plantas, provocando a maceração do tecido vegetal (BEAULIEU et al., 1991). As atividades amidolítica e pectolítica estão diretamente relacionadas, ou seja, os isolados são predominantemente positivos ou negativos para ambas as reações (JONES et al., 2004).

1.4 Caracterização molecular

1.4.1 Identificação de espécies

As técnicas moleculares revolucionaram as metodologias até então utilizadas para detecção de bactérias fitopatogênicas (MORETTI et al., 2009). Para a caracterização molecular de *Xanthomonas* spp. que causam a mancha bacteriana no tomateiro são utilizados métodos dependentes da amplificação de fragmentos do genoma por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) e métodos que independem da PCR (LOUWS et al., 1999).

Entre os métodos independentes da PCR se destaca o método que utiliza enzimas de restrição para fragmentar o genoma, onde grandes fragmentos são separados por eletroforese em campo pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”, PFGE) ou em campo magnético invertido (“Field Inversion Gel Electrophoresis”, FIGE) (LOUWS et al., 1999), frequentemente utilizado na caracterização de *Xanthomonas* spp. do tomateiro (BASIM et al., 1999; BOUZAR et al., 1996; JONES et al., 2000; KIZHEVA et al.; 2018; KUFLU; CUPPELS, 1997; QUEZADO-DUVAL; CAMARGO, 2004; QUEZADO-DUVAL et al., 2004).

Recentemente a análise de sequências multilocus (“Multilocus Sequence Analysis”, MLSA) tem sido cada vez mais aplicada, onde sequências de genes que codificam proteínas com funções conservadas (“housekeeping”) são utilizadas para gerar árvores filogenéticas (GLAESER; KÄMPFER, 2015), sendo crucial para a definição e reavaliação das espécies em bacteriologia (STACKEBRANDT et al., 2002). Além disso, a análise comparativa das sequências de macromoléculas conservadas do DNA tornou-se comum como ferramenta para classificação de organismos microbianos. O sequenciamento da região que codifica o gene 16S do RNA ribossomal, que contém informações relevantes, é utilizado para determinar a taxonomia e filogenia de gêneros bacterianos (BECKER et al., 2004).

Os estudos de diversidade genética baseados em PCR são geralmente realizados com primers universais que geram uma série de padrões de bandas de DNA chamados de impressões digitais genômicas, permitindo entender a taxonomia, estrutura populacional e dinâmica de bactérias associadas a plantas (LOUWS et al., 1999). O uso de primers

específicos proporciona a detecção e identificação das espécies de maneira rápida e sensível e particular (MORETTI et al., 2009).

Os primeiros primers específicos para três das quatro espécies de *Xanthomonas*, sendo elas *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A), *X. vesicatoria* (grupo B) e *X. gardneri* (grupo D), foram desenvolvidos por Cuppels et al. (2006). Mais tarde, Moretti et al. (2009) elaboraram iniciadores específicos para *X. euvesicatoria* (grupo A). No entanto, Koenraadt et al. (2009) desenvolveram os primers que abrangearam as quatro espécies de *Xanthomonas* do tomateiro. Araújo et al. (2013) também desenvolveram e validaram novos iniciadores altamente específicos para *X. vesicatoria*.

Mais isolados deveriam ser testados para estabelecimento dos iniciadores de Koenraadt et al. (2009), então, Araújo et al. (2012) validaram de forma mais ampla, com isolados brasileiros representativos. Além disso, a partir desses primers, os autores estabeleceram o protocolo de PCR multiplex para detecção simultânea, onde as espécies da mancha bacteriana foram detectadas e identificadas simultaneamente.

1.4.2 Diversidade genética por rep-PCR

O termo “diversidade” se refere ao grau de variação genética dentro das populações bacterianas. Mapas de diversidade genética na forma de dendrogramas e árvores filogenéticas fornecem imagens da estrutura natural da variação bacteriana em diversos níveis taxonômicos. A diversidade das populações bacterianas pode ser analisada através do uso de diversas técnicas moleculares eficientes, como a rep-PCR. Essa técnica gera inúmeros fragmentos genômicos via PCR, que são padrões de bandas que fornecem um alto nível de resolução taxonômica. Uma matriz complexa de 10 a 30 ou mais fragmentos é gerada por genoma, variando em tamanho de menos de 200 bp a mais de 6 kb (LOUWS et al., 1999). O método envolve a amplificação de sequências de DNA repetitivas conservadas específicas, determinadas REP (“Repetitive Extragenic Palindromic”), ERIC (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) e elementos BOX, sendo distribuídas no genoma de diversas bactérias (LOUWS et al., 1999; VERSALOVIC et al., 1991; 1994). A quantidade de diversidade genética pode variar consideravelmente em diferentes populações (SCHAAD et al., 2001).

O DNA genômico bacteriano purificado, lisado de células bacterianas ou amostras infectadas podem ser utilizado diretamente em rep-PCR a fim de gerar perfis de bandas para análises comparativas. Os padrões de bandas são comparados para estimar graus relativos de similaridades entre os isolados e ajudar a determinar se os isolados são geneticamente relacionados (VERSALOVIC et al., 1994). Louws et al. (1994) demonstraram que bactérias

intimamente relacionadas, podem ter perfis de rep-PCR divergentes e que bactérias associadas à mesma hospedeira ou complexo de doença podem ser facilmente diferenciadas, isso ocorre em função da complexidade dos produtos de amplificação de DNA gerados pelo uso dos três conjuntos de primers diferentes. Estudos realizados em uma variedade de diferentes gêneros e espécies bacterianas revelam que árvores filogenéticas derivadas REP-, ERIC- e BOX-PCR nem sempre são idênticas. Isso é esperado, uma vez que diferentes números de bandas podem ser gerados com cada conjunto de primer, as condições de amplificação entre primers ou conjuntos e a distribuição dos elementos repetitivos em questão podem variar (RADEMAKER et al., 2000).

Segundo Louws et al. (1994) os primers REP-, ERIC- e BOX-PCR propostos eram capazes de identificar isolados de *Xanthomonas* que anteriormente eram indistinguíveis por outros métodos, sendo uma ferramenta de diagnóstico rápida, simples e útil. Pelos polimorfismos gerados por rep-PCR, 97% dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* foram classificados como grupo A ou B, sendo os isolados dos dois grupos muito diferentes. O estudo evidenciou que a maioria dos isolados pertencia ao grupo A, sendo predominantemente amidolíticos e pectolíticos negativos, enquanto os do grupo B eram positivos. Os padrões do grupo A apresentaram mais de 90% de similaridade entre si. O grupo B demonstrou ser mais heterogêneo, com valores de similaridade variando de 70% a 85% (LOUWS et al., 1995). A caracterização por rep-PCR realizada por Moretti et al. (2009) foi consistente com esses resultados, onde isolados do grupo A (*X. euvesicatoria* = *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*) apresentaram uma relativa homogeneidade, enquanto aqueles do grupo B (*X. vesicatoria*) foram heterogêneos.

O potencial da técnica rep-PCR em discriminar isolados de diferentes espécies de *Xanthomonas* foi comprovado em diversas publicações. A aplicação da técnica permitiu a diferenciação de 80 patovares de *Xanthomonas* (RADEMAKER et al., 2005), além de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Podridão negra das brássicas) (JELUŠIĆ et al., 2021; LEMA et al., 2012; POPOVIĆ et al., 2019), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Crestamento bacteriano do arroz) (MANIGUNDAN et al., 2017), *Xanthomonas albilineans* (Escaldadura das folhas da cana-de-açúcar) (LOPES et al., 2001; SILVA et al., 2007), *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Murcha bacteriana da bananeira) (ARITUA et al., 2007), *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Mancha angular do algodoeiro) (NUNES et al., 2009; ZHAI et al., 2010), *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Cancro bacteriano da videira) (MARQUES, 2007; TRINDADE et al., 2005), *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Murcha bacteriana da mandioca) (CHEGE et al., 2017),

Xanthomonas axonopodis pv. *passiflorae* (Mancha bacteriana do maracujazeiro) e outros patovares de *X. axonopodis* (MUNHOZ et al., 2011), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Crestamento bacteriano comum do feijoeiro) (ZAMANI et al., 2011) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Crestamento bacteriano comum do feijoeiro) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (Murcha do feijoeiro) (PAIVA et al., 2014; 2018).

1.5 Controle

O controle da mancha bacteriana é complexo e envolve uma série de medidas combinadas como o uso de sementes e mudas sadias, resistência genética e o emprego de defensivos agrícolas. Além disso, recomenda-se a aplicação de práticas culturais visando a eliminação ou redução do inóculo inicial e a disseminação do patógeno (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010), como a escolha de áreas bem ventiladas, menos sujeitas a formação de orvalho; evitar a irrigação por aspersão, que facilita a disseminação e favorece o desenvolvimento da doença; evitar ferimentos durante os tratos culturais, que facilita a penetração da bactéria; e a rotação de culturas, preferencialmente com gramíneas (LOPES; ÁVILA, 2005). Apesar de esforços para o desenvolvimento de uma cultivar comercial de tomate que seja resistente as diferentes espécies de *Xanthomonas* que causam a mancha bacteriana, atualmente a resistência completa ainda não foi obtida (SHARMA; BHATTARAI, 2019).

Os produtos químicos utilizados para o controle da mancha bacteriana são em sua maioria a base de cobre. No entanto, diversos estudos relatam a resistência de isolados de *Xanthomonas* a esse princípio ativo (ABBASI et al., 2015; HORVATH et al., 2012; MARCO; STALL, 1983; MIRIK et al., 2007; QIAO et al., 2020; QUEZADO-DUVAL et al., 2003; SHENGE et al., 2014). Além de compostos cúpricos, ingredientes ativos como acibenzolar-S-metil (ativador de planta), famoxadona + cimoxanil, famoxadona + mancozebe, cloreto de benzalcônio (fungicidas/bactericidas), e até mesmo o extrato vegetal de *Melaleuca alternifolia* e o polissacarídeo *Laminaria*, estão presentes nas formulações registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle da doença no tomateiro (BRASIL, 2021). A limitação de produtos registrados e a eficiência variável (QUEZADO-DUVAL et al., 2003) tem estimulado a busca e desenvolvimento de novas estratégias para o controle da doença (LOUWS et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2013; QIAO et al., 2020).

1.6 Indução de resistência

As plantas são expostas diariamente a inúmeros microrganismos, no entanto, apenas uma pequena parte deles é capaz de ocasionar algum tipo de doença (PASCHOLATI; LEITE, 1995), desse modo, a infecção é exceção (ALI et al., 2018; FU; DONG, 2013). A resistência de plantas a doenças é definida como capacidade do hospedeiro em evitar ou atrasar a entrada e subsequente desenvolvimento do patógeno (GOODMAN et al., 1986).

O sistema imunológico vegetal é composto de múltiplas camadas, que juntas estabelecem uma imunidade eficaz (SPOEL; DONG, 2012). A defesa contra patógenos ocorre por meio de barreiras constitutivas ou induzíveis (MÉTRAUXS, 2001). Geralmente a capacidade defensiva ocorre de forma sistêmica, ou seja, se estende para os tecidos não infectados. Devido ao caráter sistêmico, essa forma de resistência induzida foi denominada resistência sistêmica adquirida (RSA). Após uma infecção inicial ocorre o reconhecimento de um invasor, há a produção de um sinal, que é liberado pela folha e translocado para outras partes da planta, induzindo reações de defesa (FU; DONG, 2013; MAUCH-MANI; MÉTRAUXS, 1998; MÉTRAUXS, 2001; VAN LOON et al., 1998; SHAH; ZEIER, 2013). A resistência induzida ou RSA se baseia na ativação de mecanismos de resistência latentes que são expressos após o chamado "desafio" com um patógeno. Os agentes de indução podem ser bióticos ou abióticos, como certos compostos químicos, agentes não patogênicos, formas avirulentas ou raças incompatíveis de patógenos (VAN LOON, 1997; VAN LOON et al., 1998). A RSA pode ter ainda benefícios transgeracionais, onde a resistência é passada para a próxima geração (LUNA et al., 2011; SLAUGHTER et al., 2011).

A ausência de efeitos tóxicos diretos do agente indutor sobre o patógeno, excluindo a possibilidade de efeito antagônico e a necessidade de um intervalo de tempo entre a aplicação do indutor e o início da proteção da planta para que a planta atinja o estado induzido, são critérios que caracterizam a resistência induzida (STEINER; SCHONBECK, 1995). Geralmente é necessário um período mínimo de 12 h a 24 h entre a inoculação ou o tratamento com o eliciador de proteção e a inoculação com o patógeno (KUĆ et al., 1975). A RSA pode ser caracterizada pelo acúmulo de ácido salicílico (AS) e de proteínas relacionadas à patogênese (PRs) (FU; DONG, 2013; KEESMANN et al., 1994; MÉTRAUXS, 2001; RYALS et al., 1996; SHAH; ZEIER, 2013; STICHER et al., 1997; VAN LOON, 1997). Além disso, outros sinais da RSA são responsáveis pela defesa da planta, como o acúmulo do aminoácido não proteico ácido pipecólico (Pip), formado a partir da lisina, e do ácido azeláico (AzA), um ácido dicarboxílico de nove carbonos, amplamente distribuídos nas plantas.

Ambos estimulam a acumulação do AS (JUNG et al., 2009; NÁVAROVÁ et al., 2012; VLOT et al., 2021).

O AS é um composto fenólico presente nas plantas, que tem o potencial de induzir a expressão de uma série de genes de resistência e a produção de proteínas relacionadas à patogênese (COLE, 1999; GAO et al., 2015; MAUCH-MANI; MÉTRAUXS, 1998). A translocação do AS do tecido infectado primário para o tecido distal não infectado ocorre via apoplasto (espaço entre a parede celular e a membrana plasmática) (LIM et al., 2020). Algumas PRs compreendem a β -1,3-glucanases, quitinases, inibidores de proteases, peroxidases e até mesmo proteínas com propriedade bioquímicas ou atividades antimicrobianas desconhecidas. As PRs expressam uma importante contribuição para o aumento da capacidade defensiva dos tecidos induzidos. Quitinases, juntamente com glucanases, podem atuar nas paredes celulares de fungos e, talvez, insetos. Os insetos são provavelmente afetados por inibidores de proteases. As peroxidases podem ser formadoras de lignina, sendo envolvidas no fortalecimento das paredes celulares. As bactérias podem ser inibidas por uma família de quitinases, que também possuem atividade de lisozima (BOWLES, 1990; VAN LOON, 1997; VAN LOON et al., 1998).

O acibenzolar-S-metil (ASM) é um indutor abiótico, análogo ao AS, pertencente ao grupo químico dos benzothiadiazoles (COLE, 1999; KNIGHT et al., 1997). Após aplicado é absorvido e translocado pela planta, sendo capaz de induzir a ativação de genes que codificam PRs (ANDRADE et al., 2013; CAVALCANTI et al. 2006a, b; ITAKO et al., 2012; 2015), bem como promover a deposição de lignina nos tecidos foliares do tomateiro (BENHAMOU; BÉLANGER, 1998; CAVALCANTI et al., 2006c). Além de atuar em diversas espécies vegetais monocotiledôneas e dicotiledôneas, apresenta proteção contra uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias, fungos e vírus (GÖRLACH et al., 1996; LAWTON et al., 1996; LOUWS et al., 2001; WALTERS et al., 2005).

Além de componentes químicos, pesquisas indicam que no processo evolutivo as plantas desenvolveram a capacidade de reconhecimento de inúmeros compostos derivados da superfície microbiana, como glicoproteínas, peptídeos, carboidratos e lipídeos, que induzem respostas de defesa em plantas hospedeiras e não hospedeiras (NÜRNBERGER; BRUNNER, 2002; WALTERS et al., 2005). Os lipopolissacarídeos (LPS), componentes indispensáveis da parede celular de bactérias Gram-negativas podem desencadear respostas relacionadas a defesa das plantas (DOW et al., 2000; MEYER et al., 2001; NEWMAN et al., 2007; NEYEN; LEMAITRE, 2016). Outro importante fator de virulência para bactérias patogênicas é o flagelo. Plantas possuem um sistema de percepção altamente específico e sensível de

flagelinas bacterianas, estimulando reações de defesa em tomate e várias outras espécies de plantas (FELIX et al., 1999; SPOEL; DONG, 2012; SIMÕES et al., 2021).

Para reduzir a dependência de agroquímicos, novas formas de controle de doenças alternativas vêm se destacando. O uso de produtos comerciais que induzem a resistência, como o emprego de agentes biológicos, estão recebendo cada vez mais atenção (ANDRADE et al., 2013; FAILLACE et al., 2019). Relata-se que o tratamento utilizando raças e agentes não patogênicos, patógenos atenuados ou mortos pelo calor, pode conferir uma proteção contra ataques subsequentes de cepas virulentas do mesmo ou de microrganismos relacionados (CHESTER, 1933; KUÉ, 1972).

Flagelinas purificadas de isolados de *Xanthomonas* spp. foram aplicadas em diferentes concentrações, via infiltração e pulverização, em plantas de tomate visando o controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*). O patógeno foi inoculado após 24 horas e o eliciador de flagelina do XapRR (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) foi promissor, reduzindo a intensidade da doença quando aplicado via pulverização (SIMÕES et al., 2021).

Müller e Börger (1940) inocularam uma raça avirulenta de *Phytophthora infestans* em seções de tubérculos de batata. Após observarem a ausência de sintomas típicos, reinocularam os mesmos tubérculos com uma raça virulenta do mesmo patógeno. A raça avirulenta aparentemente protegia os tecidos contra a consequente infecção pela raça virulenta.

Kuć et al. (1975) demonstraram a proteção de oito cultivares de pepino suscetíveis a *Colletotrichum lagenarium* raça 1, por meio da inoculação prévia do patógeno em baixas concentrações. A proteção também ocorreu quando plantas resistentes a *Cladosporium cucumerinum* foram inoculadas com o mesmo e desafiadas com *C. lagenarium*.

Exopolissacarídeos (EPS) extraídos de células bacterianas de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* e de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, aplicados via foliar, foram capazes de induzir proteção local e sistêmica contra a ferrugem do café, causada por *Hemileia vastatrix*. A proteção ocorreu quando aplicados 72 h antes do desafio com o patógeno. As plantas tratadas com diferentes concentrações de uma preparação comercialmente disponível de goma xantana, também apresentaram proteção (GUZZO et al., 1993). Do mesmo modo, plantas de cevada tratadas com goma xantana, foram induzidas à resistência contra *Bipolaris sorokiniana* (Mancha marrom). O nível de proteção foi maior quando as plantas foram tratadas e inoculadas 48 h após, do que 24 h após. No entanto, no intervalo de 72 h, a proteção foi total. Análises bioquímicas detectaram um aumento na concentração de proteínas, bem como na atividade da enzima β -1,3-glucanase, quando comparadas ao extrato de plantas sadias (CASTRO; BACH, 2004). Gontijo (2014) verificou que a suspensão bacteriana de

Xanthomonas gardneri atenuada pela fervura, foi eficiente na redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro no controle preventivo da doença, comparado ao controle curativo.

A aplicação de bacteriófagos combinados com a proteína harpina promoveu a redução da intensidade mancha bacteriana do tomateiro. A combinação dos fagos com o acibenzolar-S-metil supriu uma reação de hipersensibilidade (HR) visível causada pelo produto, proporcionando um excelente controle da doença (OBRADOVIC et al., 2005).

Hert et al. (2009) relataram que isolados de *Xanthomonas perforans* produtores de bacteriocinas com patogenicidade atenuada foram efetivos no biocontrole de isolados de *X. euvesicatoria* sensíveis à bacteriocina. A estratégia foi utilizar um mutante de *X. perforans* atenuado através da deleção do gene envolvido na produção de glucano periplasmático, que resultou em um fenótipo patogênico com virulência parcialmente reduzida (MINSAVAGE et al., 2004). Embora este estudo tenha demonstrado que o mutante de *X. perforans* atenuado supriu *X. euvesicatoria* enquanto causava doença mínima, tal supressão ocorreu por antagonismo. O mutante reduziu populações externas do patógeno virulento.

REFERÊNCIAS

ALI, A.; SHAH, L.; RAHMAN, S.; RIAZ, M. W.; YAHYA, M.; XU, Y. J., LIU, F.; SI, W.; JIANG, H.; CHENG, B. Plant defense mechanism and current understanding of salicylic acid and NPRs in activating SAR. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 104, p. 15-22, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.08.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0885576518300705?via%3Dihub>. Acesso em: 6 mar. 2020.

ABBASI, P. A.; KHABBAZ, S. E.; WESELOWSKI, B.; ZHANG, L. Occurrence of copper-resistant strains and a shift in *Xanthomonas* spp. causing tomato bacterial spot in Ontario. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 61, n. 10, p. 753-761, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0228>. Disponível em: <https://cdnsciencepub.com/doi/10.1139/cjm-2015-0228>. Acesso em: 21 fev. 2020.

ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; SILVEIRA, P. R.; RIOS, J. A.; OLIVEIRA, J. R.; MARIANO, R. L. R. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 28-34, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013000100004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/tpp/a/HSp3kwWJnsvwRPKH4FSwZVc/?lang=pt>. Acesso em: 8 ago. 2020.

ARAÚJO, E. R.; COSTA, J. R.; FERREIRA, M. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, n. 6, p. 1479-90, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05431.x>. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2012.05431.x>. Acesso em: 15 nov. 2019.

ARAÚJO, E. R.; COSTA, J. R.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gadneri* in Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 66, p. 159-168, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12543>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.12543>. Acesso em: 19 jan. 2020.

ARAÚJO, E. R.; COSTA, J. R.; PONTES, N. C.; QUEZADO-DUVAL, A. M. *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* associated with bacterial leaf spot on weeds in Brazilian tomato fields. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 143, n. 3, p. 543-548, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0705-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10658-015-0705-9>. Acesso em: 29 out. 2020.

ARAÚJO, E. R.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Specific primers for *Xanthomonas vesicatoria*, a tomato bacterial spot causal agent. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 137, n. 1, p. 5-9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0225-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10658-013-0225-4>. Acesso em: 4 nov. 2020.

ARAÚJO, E. R.; PEREIRA, R. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; CAFÉ-FILHO, A. C.; MOITA, A. W.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 914, p. 39-42, 2011. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.914.3>. Disponível em: https://www.actahort.org/books/914/914_3.htm. Acesso em: 6 dez. 2019.

ARITUA, V.; NANYONJO, A.; KUMAKECH, F.; TUSHEMEREIRWE, W. Rep-PCR reveals a high genetic homogeneity among Ugandan isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 3, p. 179-183, 2007. Disponível em: <https://academicjournals.org/AJB>. Acesso em: 20 jan. 2021.

BASIM, H.; STALL, R. E.; MINSAVAGE, G. V.; JONES, J. B. Chromosomal gene transfer by conjugation in the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 11, p. 1044-1049, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1094/phyto.1999.89.11.1044>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.1999.89.11.1044>. Acesso em: 25 nov. 2020.

BEAULIEU, C.; MINSAVAGE, G. V.; CANTEROS, B. I.; STALL, R. E. Biochemical and genetic analysis of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 4, p. 446-51, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-4-446>. Disponível em: <https://www.apsnet.org/publications/mpmi/backissues/Documents/1991Abstracts/Microbe04-446.htm>. Acesso em: 5 dez. 2019.

BECKER, K.; HARMSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; VON EIFF, C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 11, p. 4988-4995, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.42.11.4988-4995.2004>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.42.11.4988-4995.2004>. Acesso em: 23 jan. 2021.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 4, p. 1203-1212, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.118.4.1203>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/118/4/1203/6081255>. Acesso em: 26 out. 2020.

BOUZAR, H.; JONES, J. B.; MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E.; SCOTT, J. W. Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 1, p. 39-44, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-84-39>. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1994Abstracts/Phyto_84_39.htm. Acesso em: 29 maio 2019.

BOUZAR, H.; JONES, J. B.; SOMODI, G. C.; STALL, R. E.; DAOUZLI, N.; LAMBE, R. C.; FELIX-GASTELUM, R.; TRINIDAD-CORREA, R. Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper fields of Mexico. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 18, p. 75-77, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060669609500659>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07060669609500659>. Acesso em: 15 jun. 2019.

BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 59, n. 1, p. 873-907, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.004301>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.59.070190.004301>. Acesso em: 15 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**, 2021. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 16 abr. 2021.

CAMARGO, F. P.; ALVES, S. H.; CAMARGO FILHO, W. P.; VILELA, N. J. Cadeia produtiva de tomate industrial no brasil: Resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 36, n. 11, 2006.

CASTRO, O. L.; BACH, E. E. Increased production of β -1,3 glucanase and proteins in *Bipolaris sorokiniana* pathosystem treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 2, p. 165-169, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.11.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942803002080?via%3Dihub>. Acesso em: 13 fev. 2021.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; LIMA, J. P. M. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 4-6, p. 198-208, 2006a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2006.11.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S088557650600083X?via%3Dihub>. Acesso em: 17 dez. 2020.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; PEREIRA, R. B.; COSTA, J. C. B.; CARVALHO, C. P. S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após elicitação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,

Brasília, v. 41, n. 12, p. 1721-1730, 2006b. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006001200006>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/jsFV94rjG37GrgKyDbYtvMR/?lang=pt>. Acesso em: 17 dez. 2020.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; ZACARONI, A. B.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; COSTA, J. C. B.; SOUZA, R. M. Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-380, 2006c. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000400007>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/fb/a/q6xTnxy4DKLMs5H3NRcCVRx/?lang=pt>. Acesso em: 3 dez. 2020.

CHEGE, M. N.; WAMUNYOKOLI, F.; KAMAU, J.; NYABOGA, E. N. Phenotypic and genotypic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing bacterial blight disease of cassava in Kenya. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, Gwalior, v. 5, n. 2, p. 038-044, 2017. DOI: <https://doi.org/10.7324/JABB.2017.50206>. Disponível em: http://jabonline.in/abstract.php?article_id=191. Acesso em: 19 nov. 2020.

CHESTER, K.S. The problem of acquired physiological immunity in plants. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 8, n. 3, p. 275-324, 1933. DOI: <https://doi.org/10.1086/394440>. Disponível em: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/394440>. Acesso em: 15 out. 2020.

COLE, D. L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. **Crop Protection**, Guildford, v. 18, n. 4, p. 267-273, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(99\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(99)00026-5). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219499000265?via%3Dihub>. Acesso em: 7 jan. 2021.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Boletim Hortigranjeiro**. Brasília, DF, v. 7, n. 4, p. 61, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/hortigranjeiros-prohort/boletim-hortigranjeiro>. Acesso em: 03 maio 2021.

CONSTANTIN, E. C.; CLEENWERCK, I.; MAES, M.; BAEYEN, S.; VAN MALDERGHEM, C.; DE VOS, P.; COTTYN, B. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, London, v. 65, p. 792-806, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12461>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.12461>. Acesso em: 3 mar. 2021.

CUPPELS, D. A.; LOUWS, F. J.; AINSWORTH, T. Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 4, p. 451-458, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-90-0451>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PD-90-0451>. Acesso em: 5 ago. 2020.

DOW, M.; NEWMAN, M.-A.; VON ROEPENACK, E. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, n. 1, p. 241-261, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.241>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.38.1.241>. Acesso em: 14 ago. 2020.

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

ESQUINAS-ALCAZAR, J. T. **Genetic resource of tomatoes and wild relatives**. Roma: IBPGR, 1981. 65 p.

FAHY, P. C.; HAYWARD, A. C. **Media and methods for isolation and diagnostic tests**. Plant bacterial disease - a diagnostic guide. Sidney: Academic Press, 1983. 393 p.

FAILLACE, G. R.; SANTARÉM, E. R.; ASTARITA, L. V. Extract of *Xanthomonas axonopodis* induces resistance in *Solanum tuberosum* against *Pectobacterium atrosepticum*. **Biological Control**, Orlando, v. 134, p. 53-62, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioc.2019.03.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964418308788?via%3Dihub>. Acesso em: 21 jan. 2021.

FELIX, G.; DURAN, J. D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 265-276, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00265.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-313X.1999.00265.x>. Acesso em: 23 abr. 2021.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008, 421 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas**: Agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pementão, pimenta, beringela e jiló. Lavras: UFLA, 2003, 333 p.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, n. 1, p. 839-863, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>. Acesso em: 25 jan. 2021.

GAO, Q.-M.; ZHU, S.; KACHROO, P.; KACHROO, A. Signal regulators of systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, 2015. DOI:

<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>. Disponível em:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00228/full>. Acesso em: 3 fev. 2021.

GARDNER, M. W.; KENDRICK, J. B. Bacterial spot of tomato and pepper. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 13, n. 7, p. 307-315, 1923.

GARDNER, M. W, KENDRICK, J. B. Bacterial spot of tomato. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 21, p. 123-56, 1921.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. An overview of the road map to the manual. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2000, 20 p.

GEORGE, B.; KAUR, C.; KHURDIYA, D. S.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in tomato (*Lycopersicum esculentum*) as a function of genotype. **Food Chemistry**, London, v. 84, n. 1, p. 45-51, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(03\)00165-1](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(03)00165-1). Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814603001651?via%3Dihub>. Acesso em: 4 jul. 2019.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 38, n. 4, p. 237-245, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202015000508?via%3Dihub>. Acesso em: 18 mar. 2021.

GONTIJO, L. N. **Suspensão bacteriana atenuada no controle de *Xanthomonas* spp. na cultura do tomateiro**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

GOODE, M. J.; SASSER, M. Prevention - The key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, n. 9, p. 831-834, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-64-831>. Disponível em:
https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1980Abstracts/PD_64_831.htm. Acesso em: 25 jan. 2020.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri Press, 1986. 433 p.

GÖRLACH, J; VOLRATH, S; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 4, p. 629-643, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.8.4.629>. Disponível em:
<https://academic.oup.com/plcell/article/8/4/629/5985107>. Acesso em: 19 out. 2020.

GUZZO, S. D.; BACH, E. E.; MARTINS, E. F.; MORAES, W. C. Crude exopolysaccharides (EPS) from *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and commercial xanthan gum as inducers of protection in coffee plants against *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 139, n. 2, p. 119-128, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1993.tb01408.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0434.1993.tb01408.x>. Acesso em: 9 dez. 2020.

HERT, A. P.; MARUTANI, M.; MOMOL, M. T.; ROBERTS, P. D.; OLSON, S. M.; JONES, J. B. Suppression of the bacterial spot pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on tomato leaves by an attenuated mutant of *Xanthomonas perforans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 10, p. 3323-3330, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02399-08>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02399-08>. Acesso em: 5 fev. 2021.

HERT, A. P.; ROBERTS, P. D.; MOMOL, M. T.; MINSAVAGE, G. V.; TUDOR-NELSON, S. M.; JONES, J. B. Relative importance of bacteriocin-like genes in antagonism of *Xanthomonas perforans* tomato race 3 to *Xanthomonas euvesicatoria* tomato race 1 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 3581-3588, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3581-3588.2005>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.71.7.3581-3588.2005>. Acesso em: 9 nov. 2020.

HORVATH, D. M.; STALL, R. E.; JONES, J. B.; PAULY, M. H.; VALLAD, G. E.; DAHLBECK, D.; STASKAWICZ, B. J.; SCOTT, J. W. Transgenic resistance confers effective field level control of bacterial spot disease in tomato. **Plos one**, [s.l.], v. 7, n. 8, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042036>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0042036>. Acesso em: 8 ago. 2020.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA)**. [s.l.]: IBGE, 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/lspa/tabelas>. Acesso em: 06 maio 2021.

INOUE-NAGATA, A. K.; LOPES, C. A.; REIS, A.; PEREIRA, R. B.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; PINHEIRO, J. B.; LIMA, M. F. Doenças do tomateiro. In AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2., 772 p.

ITAKO, A. T.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Chemical products induce resistance to *Xanthomonas perforans* in tomato. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 701-706, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140177>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/cTbxFDgxJszCG9DyrqTgxb/?lang=en>. Acesso em: 7 jul. 2020.

ITAKO, A. T.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Efeito de produtos químicos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas*

perforans) e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro. **Idesia**, Arica, v. 30, n. 2, p. 85-92, 2012. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292012000200011>. Disponível em: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292012000200011&lng=en&nrm=iso&tlang=en. Acesso em: 18 jun. 2020.

JELUŠIĆ, A.; BERIĆ, T.; MITROVIĆ, P.; DIMKIĆ, I.; STANKOVIĆ, S.; MARJANOVIĆ-JEROMELA, A.; POPOVIĆ, T. New insights into the genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from winter oilseed rape in Serbia. **Plant Pathology**, London, v. 70, p. 35-49, 2020. DOI: <https://doi.org/doi:10.1111/ppa.13273>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ppa.13273>. Acesso em: 29 nov. 2020.

JONES, J. B.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; ALMIRA, E. C.; ROBERTS, P. D.; BOWEN, B. W.; SUDBERRY, P. M.; STRICKLER, P. M.; CHUN, J. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 50, n. 5, p. 1211-1219, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1211>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-50-3-1211>. Acesso em: 23 jun. 2019.

JONES, J. B.; LACY, G. H.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; SCHAAD, N. W. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 755-762, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1078/0723202042369884>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202005703179?via%3Dihub>. Acesso em: 13 maio 2019.

JONES, J. B.; LACY, G. H.; BOUZAR, H.; MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E.; SCHAAD, N. W. Bacterial spot - worldwide distribution, importance and review. **Acta horticulturae**, Leuven, v. 695, p. 27-34, 2005. DOI: <https://doi.org/10.17660/actahortic.2005.695.1>. Disponível em: https://www.actahort.org/books/695/695_1.htm. Acesso em: 19 maio 2019.

JONES, J. B.; STALL, R. E.; BOUZAR, H. Diversity among Xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 41-58, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.41>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.36.1.41>. Acesso em: 18 ago. 2019

JONES, J. B.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. Compendium of tomato diseases. **American Phytopathological Society Press**, Saint Paul, 1997. 27 p.

JUNG, H. W.; TSCHAPLINSKI, T. J.; WANG, L.; GLAZEBROOK, J.; GREENBERG, J. T. Priming in systemic plant immunity. **Science**, Washington, v. 324, n. 5923, p. 89-91, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1170025>. Disponível em: <https://www.science.org/lookup/doi/10.1126/science.1170025>. Acesso em: 19 nov. 2020.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; LIGON, J.; OOSTENDORP, M.; RYALS, J. Activation of systemic acquired disease resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 100, n. 6, p. 359-369, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01874804>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF01874804>. Acesso em: 25 jan. 2021.

KIZHEVA, Y.; URSHEV, Z.; RASHEVA, I.; VANCHEVA, T.; HRISTOVA, P.; BOGATZEVSKA, N.; MONCHEVA, P. PFGE: a tool for examination of heterogeneity between the bacterial spot-causing xanthomonads of tomato plants in Bulgaria. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, [s.l.], v. 73, n. 7-8, p. 257-264, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2016-0205>. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/znc-2016-0205/html>. Acesso em: 26 fev. 2021.

KNIGHT, S. C.; ANTHONY, V. M.; BRADY, A. M.; GREENLAND, A. J.; HEANEY, S. P.; MURRAY, D. C.; POWELL, K. A.; SCHULZ, M. A.; SPINKS, C. A.; WORTHINGTON, P. A.; YOULE, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, n. 1, p. 349-372, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.349>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.35.1.349>. Acesso em: 28 out. 2020.

KOENRAADT, H.; VAN BETTERAY, B.; GERMAIN, R.; HIDDINK, G.; JONES, J. B.; OOSTERHOF, J.; RIJLAARSDAM, A.; ROORDA, P.; WOULDT, B. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 808, p. 99- 102, 2009. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.808.13>. Disponível em: https://www.actahort.org/books/808/808_13.htm. Acesso em: 19 set. 2019.

KUĆ, J.; SHOCKLEY, G.; KEARNEY, K. Protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 7, n. 2, p. 195-199, 1975. DOI: [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(75\)90010-7](https://doi.org/10.1016/0048-4059(75)90010-7). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0048405975900107?via%3Dihub>. Acesso em: 15 out. 2020.

KUÉ, J. Phytoalexins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 10, n. 1, p. 207-232, 1972. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.10.090172.001231>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.py.10.090172.001231>. Acesso em: 13 mar. 2020.

KUFLU, K. M.; CUPPELS, D. A. Development of a diagnostic DNA probe for Xanthomonads causing bacterial spot of peppers and tomatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4462-4470, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4462-4470.1997>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.63.11.4462-4470.1997>. Acesso em: 14 abr. 2021.

LAWTON, K. A.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMAN, K.; DELANEY, T.; KEESMANN, H.; STAUB, T.; RYALS, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 71-82, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10010071.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-313X.1996.10010071.x>. Acesso em: 15 fev. 2020.

LEMA, M.; CARTEA, M. E.; SOTELO, T.; VELASCO, P.; SOENGAS, P. Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by *Brassica* spp. genotypes and rep-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n.1, p. 159-169, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9929-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10658-011-9929-5>. Acesso em: 19 abr. 2020.

LIM, G. H.; LIU, H.; YU, K.; LIU, R.; SHINE, M. B.; FERNANDEZ, J.; BURCH-SMITH, T.; MOBLEY, J. K.; MCLETCHIE, N.; KACHROO, A.; KACHROO, P. The plant cuticle regulates apoplastic transport of salicylic acid during systemic acquired resistance. **Science Advances**, Washington, v. 6, n. 19, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz0478>. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.aaz0478>. Acesso em: 16 ago. 2020.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortalícias. 2005, 151 p.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa Hortalícias, 1997. 70 p.

LOPES, S. A.; DAMANN, K. E.; GRELEN, L. B. *Xanthomonas albilineans* diversity and identification based on rep-PCR fingerprints. **Current Microbiology**, New York, v. 42, n. 3, p. 155-159, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002840010196>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002840010196>. Acesso em: 15 nov. 2020.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DE BRUIJN, F. J. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, 1995, p. 528-536. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1995Articles/Phyto85n05_528.PDF. Acesso em: 18 ago. 2020.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DE BRUIJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2286-2295, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.60.7.2286-2295.1994>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.60.7.2286-2295.1994>. Acesso em: 18 ago. 2020.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three D's of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.81>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.37.1.81>. Acesso em: 27 jul. 2020.

LOUWS, F. J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H. L.; CUPPELS, D. A.; JONES, J. B.; SHOEMAKER, P. B.; SAHIN, F.; MILLER, S. A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 5, p. 481-488, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.5.481>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS.2001.85.5.481>. Acesso em: 7 abr. 2020.

LOVREKOVICH, L.; FARKAS, G. L. Induced protection against wildfire disease in tobacco leaves treated with heat-killed bacteria. **Nature**, London, v. 205, p. 823-824, 1965. DOI: <https://doi.org/10.1038/205823a0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/205823a0>. Acesso em: 19 ago. 2020.

LUNA, E.; BRUCE, T. J. A.; ROBERTS, M. R.; FLORS, V.; TON, J. Next-generation systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 158, n. 2, p. 844-853, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.187468>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/158/2/844/6109192>. Acesso em: 15 fev. 2021.

MANIGUNDAN, K; PUNEETH KUMAR, P.; SINGH, R.; SAKTHIVEL, K.; GAUTAM, R. K.; SINGH, P. K.; LAHA, G. S. Rep-PCR distinguishes rice bacterial blight pathogen (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) strains of Indian Mainland and Bay Islands. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 99, n. 3, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3988>. Disponível em: <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3988>. Acesso em: 18 jan. 2021.

MARCO, G. M.; STALL, R. E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 779-781, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-67-779>. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Abstracts/PD_67_779.htm. Acesso em: 17 jul. 2020.

MARQUES, E. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira (*Vitis* spp.). 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2007. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/3040>. Acesso em:

MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUXS, J. P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. **Annals of Botany**, London, v. 82, n. 5, p. 535-540, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0726>. Disponível em: <https://academic.oup.com/aob/article/82/5/535/2587892>. Acesso em: 18 ago. 2020.

MÉTRAUXS, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 13-18, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1008763817367>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1008763817367>. Acesso em: 3 maio 2020.

MEYER, A.; PÜHLER, A.; NIEHAUS, K. The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. **Planta**, [s.l.], v. 213, n. 2, p. 214-222, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004250000493>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs004250000493>. Acesso em: 19 nov. 2020.

MINSAVAGE, G. V.; MUDGETT, M. B.; STALL, R. E.; JONES, J. B. Importance of opgHXcv of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in host-parasite interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 2, p. 152-161, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1094/mpmi.2004.17.2.152>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI.2004.17.2.152>. Acesso em: 15 ago. 2020.

MIRIK, M.; AYSAN, Y.; CINAR, O. Copper resistance strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye in the eastern Mediterranean region of Turkey. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 89, n. 1, p. 153-154, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v89i1.737>. Disponível em: <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/737>. Acesso em: 5 abr. 2020.

MORETTI, C.; AMATULLI, M. T.; BUONAURIO, R. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 466-471, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02690.x>. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2009.02690.x>. Acesso em: 4 dez. 2019.

MORINIÈRE, L.; BURLET, A.; ROSENTHAL, E. R.; NESME, X.; PORTIER, P.; BULL, C. T.; LAVIRE, C.; FISCHER-LE SAUX, M.; BERTOLLA, F. Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach leads to combine *Xanthomonas hortorum* Vauterin et al. 1995 and *Xanthomonas cynarae* Trébaol 2000 emend. Timilsina et al. 2019. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 43, n. 4, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126087>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S07232020300382?via%3Dihub>. Acesso em: 3 mar. 2021.

MÜLLER, K. O.; BÖRGER, H. Experimentelle untersuchugen über die *Phytophthora* - resistenz der kartoffel. **Arbeiten aus der Biologischen Reichsanstalt für Land-und Forstwirtschaft**, [s.l.], v. 23, p. 189-231, 1940.

MUNHOZ, C. F.; WEISS, B.; HANAI, L. R.; ZUCCHI, M. I.; FUNGARO, M. H. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VIEIRA, M. L. C. Genetic diversity and a PCR-based method for *Xanthomonas axonopodis* detection in passion fruit. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 4, p. 416-424, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1094/phyto-06-10-0169>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-06-10-0169>. Acesso em: 5 jan. 2021.

NAIKA, S; JEUDE, J. V. L.; GOFFAU, M.; HILMI, M; DAM, B. V. **A cultura do tomate:** produção, processamento e comercialização. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, 2006. 104 p. Disponível em: <http://www.agromisa.org/wp-content/uploads/Agrodok-17-A-cultura-do-tomate-1.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2019.

NASCIMENTO, A. R.; FERNANDES, P. M.; BORGES, L. C.; MOITA, A. W.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 15-24, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000100003>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hb/a/j3L3dnPRXqnJ9D8fjwXP6MN/?lang=pt>. Acesso em: 15 nov. 2019.

NÁVAROVÁ, H.; BERNSDORFF, F.; DÖRING, A.C.; ZEIER, J. Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 12, p. 5123-5141, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103564>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plcell/article/24/12/5123/6098062>. Acesso em: 15 fev. 2021.

NEWMAN, M. -A.; DOW, J. M.; MOLINARO, A.; PARRILLI, M. Invited review: priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. **Journal of Endotoxin Research**, Los Angeles, v. 13, n. 2, p. 69-84, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1177/0968051907079399>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0968051907079399>. Acesso em: 7 jan. 2021.

NEYEN, C.; LEMAITRE, B. Sensing Gram-negative bacteria: a phylogenetic perspective. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 38, p. 8-17, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.co.2015.10.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0952791515001442?via%3Dhub>. Acesso em: 17 out. 2020.

NUNES, M. P.; MEHTA, A.; AGUIAR, P. H.; CIA, E.; PIZZINATO, M. A.; CHIAVEGATO, E. J.; MEHTA, Y. R. Análise da diversidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 2, p. 105-109, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052009000200004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/Dnr8n5PvD8s6Qm9qxxff5gn/?lang=pt>. Acesso em: 15 jan. 2021.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular

patterns. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 4, p. 318-324, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00265-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00265-0). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369526602002650?via%3Dihub>. Acesso em: 4 abr. 2021.

OBRADOVIC, A.; JONES, J. B.; MOMOL, M. T.; OLSON, S. M.; JACKSON, L. E.; BALOGH, B.; GUVEN, K.; IRIARTE, F. B. Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 7, p. 712-716, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1094/pd-89-0712>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PD-89-0712>. Acesso em: 12 jan. 2021.

PAIVA, B. A. R. **Caracterização fenotípica e molecular de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* procedentes de regiões produtoras de feijoeiro - comum no Brasil**. 2014. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/7162/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Bruna%20Alicia%20Rafael%20de%20Paiva%20-%202014.pdf>. Acesso em: 5 fev. 2021.

PAIVA, B. A. R.; WENDLAND, A.; BORBA, T.C.; ARAÚJO, L. G. Molecular characterization and differential interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* with common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr16039871>. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1114709/molecular-characterization-and-differential-interaction-of-xanthomonas-axonopodis-pv-phaseoli-and-xanthomonas-fuscans-subsp-fuscans-with-common-beans-phaseolus-vulgaris>. Acesso em: 5 fev. 2021.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

PEREIRA, R. C.; ARAÚJO, E. R.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Occurrence of *Xanthomonas* species causing bacterial spot in fresh market tomato fields in brazil. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 914, p. 61-64, 2011. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.914.8>. Disponível em: https://www.actahort.org/books/914/914_8.htm. Acesso em: 7 out. 2020.

POPOVIĆ, T.; MITROVIĆ, P.; JELUŠIĆ, A.; DIMKIĆ, I.; MARJANOVIĆ-JEROMELA, A.; NIKOLIĆ, I.; STANKOVIĆ, S. Genetic diversity and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from *Brassica napus* and six *Brassica oleracea* crops in Serbia. **Plant Pathology**, London, v. 68, n. 8, p. 1448-1457, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13064>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.13064>. Acesso em: 3 mar. 2021.

POTNIS, N.; TIMILSINA, S.; STRAYER, A.; SHANTHARAJ, D.; BARAK, J. D.; PARET, M. L.; VALLAD, G. E.; JONES, J. B. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 16, n. 9, p. 907-920, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12244>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mpp.12244>. Acesso em: 3 mar. 2021.

QIAO, K.; LIU, Q.; HUANG, Y.; XIA, Y.; ZHANG, S. Management of bacterial spot of tomato caused by copper-resistant *Xanthomonas perforans* using a small molecule compound carvacrol. **Crop Protection**, Guildford, v. 132, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105114>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219420300478?via%3Dihub>. Acesso em: 7 out. 2020.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; CAMARGO, L. E. A. Raças de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 80-86, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362004000100016>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hb/a/mpgBtY4Yd75FbYv6D5z66CF/?lang=pt>. Acesso em: 4 maio 2020.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R. P.; CAMARGO, L. E. A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 670-675, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362003000400020>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hb/a/ZsKSpzBKsVhpSjBWs4D4Lyr/?lang=pt>. Acesso em: 12 jun. 2020.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LEITE JÚNIOR, R. P.; LOPES, C. A.; LIMA, M. F.; CAMARGO, L. E. A. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. **Acta Horticultae**, Leuven, v. 695, p. 101-108, 2005. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.11>. Disponível em: https://www.actahort.org/books/695/695_11.htm. Acesso em: 4 maio 2020.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LEITE JÚNIOR, R. P.; TRUFFI, D.; CAMARGO, L. E. A. Outbreaks of Bacterial Spot Caused by *Xanthomonas gardneri* on Processing Tomato in Central-West Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 2, p. 157-161, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1094/pdis.2004.88.2.157>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS.2004.88.2.157>. Acesso em: 4 set. 2020.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A. **Mancha-bacteriana**: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. Circular Técnica 84. Brasília: Embrapa Hortalícias, 2010. 28p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/882148>. Acesso em: 19 jan. 2020.

RADEMAKER, J. L.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; DE BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 2, n. 2, p. 665-677, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-665>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-50-2-665>
Acesso em: 17 jan. 2020.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; SCHULTZ, M. H.; ROSSBACH, U.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; DE BRUIJN, F. J. A Comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 9, p. 1098-1111, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1094/phyto-95-1098>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-95-1098>. Acesso em: 15 ago. 2020.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1809>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plcell/article/8/10/1809/5985226>. Acesso em: 20 maio 2020.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3. ed. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2001. 373 p.

SHAH, J.; ZEIER, J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00030>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00030/full>. Acesso em: 3 fev. 2021.

SHARMA, S.; BHATTARAI, K. Progress in developing bacterial spot resistance in tomato. **Agronomy**, Basel, v. 9, n. 1, p. 26, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy9010026>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/9/1/26>. Acesso em: 3 fev. 2021.

SHENGE, K. C.; MABAGALA, R. B.; MORTENSEN, C. N.; WYDRA, K. Resistance of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* isolates from Tanzania to copper and implications for bacterial spot management. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 8, n. 30, p. 2881-2885, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5836>. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/CC05AAE46369>. Acesso em: 8 out. 2020.

SILVA, A. A.; CARMO, C. A. S.; MORETI, C. L.; RONCHI, C. P.; MARTINS, D. S.; PRATISSOLI, D.; ANDRADE, E. M. C.; FREITAS, F. C. L.; ALMEIDA, G. C.; COSTA, H.; SOUZA, J. L.; VENTURA, J. A.; BALBINO, J. M. S. **Tomate**. Vitória, ES: Incaper, 2010. 430 p.

SILVA, M. S.; BEDENDO, I. P.; CASAGRANDE, M. V. Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, agente causal da escaldadura das folhas da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 341-347, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052007000400004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/KJdQDL6mJT5ZhLHVkmQWhBQ/?lang=pt>. Acesso em: 23 nov. 2020.

SIMÕES, C. T.; CARVALHO, V. N.; HALFELD-VIEIRA, B. D. A. Prospecting of pathogen-derived elicitors for the control of tomato bacterial spot. **Journal of Plant Protection Research**, Poznań, v. 61, n. 2, p. 183-188, 2021. DOI: <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.13709>. Disponível em: <http://www.plantprotection.pl/Prospecting-of-pathogen-derived-elicitors-for-the-control-of-tomato-bacterial-spot,132684,0,2.html>. Acesso em: 15 fev. 2021.

SLAUGHTER, A.; DANIEL, X.; FLORS, V.; LUNA, E.; HOHN, B.; MAUCH-MANI, B. Descendants of primed arabidopsis plants exhibit resistance to biotic stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 158, n. 2, p. 835-843, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.191593>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/158/2/835/6109179>. Acesso em: 7 jul. 2020.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 12, n. 2, p. 89-100, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri3141>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri3141>. Acesso em: 7 jul. 2020.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A. D.; KÄMPFER, P.; MAIDEN, M. C. J.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWINGS, J.; TRÜPER, 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**, London, v. 52, n. 3, 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: 17 fev. 2021.

STALL, R. E.; BEAULIEU, C.; EGEL, D.; HODGE, N. C.; LEITE, R. P.; MINSAVAGE, G. V.; BOUZAR, H.; JONES, J. B.; ALVAREZ, A. M.; BENEDICT, A. A. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 1, p. 47-53, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-44-1-47>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-44-1-47>. Acesso em: 23 jun. 2019.

STALL, R. E.; JONES, J. B.; MINSAVAGE, G. V. Durability of resistance in tomato and pepper to *Xanthomonads* causing bacterial spot. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 265-284, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081752>.

Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-phyto-080508-081752>. Acesso em: 19 nov. 2019.

STALL, R.E. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: cause of bacterial spot of tomato and pepper. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. (ed.) *Xanthomonas*. London: Chapman; Hall, 1993. p. 57-60.

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. **Induced Resistance to Disease in Plants**, Dordrech, v. 4, p. 86-110, 1995. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-015-8420-3_4. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-015-8420-3_4. Acesso em: 14 jul. 2020.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUXS, J. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, n. 1, p. 235-270, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.235>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.35.1.235>. Acesso em: 14 jul. 2020.

ŠUTIC, D. Bakterioze crvenog patlidzana (Tomato bacteriosis). **Review of Applied Mycology**, Surrey, v. 36, p. 734-735, 1957.

TIMILSINA, S.; KARA, S.; JACQUES, M. A.; POTNIS, N.; MINSAVAGE, G. V.; VALLAD, G. E.; JONES, J. B.; FISCHER-LE SAUX, M. Reclassification of *Xanthomonas gardneri* (ex Šutič 1957) Jones et al. 2006 as a later heterotypic synonym of *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 and description of *X. cynarae* pv. *cynarae* and *X. cynarae* pv. *gardneri* based on whole genome analyses. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 69, p. 343-34, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003104>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.003104>. Acesso em: 3 mar. 2020.

TRÉBAOL, G.; MANCEAU, C.; TIRILLY, Y.; BOURY, S. Assessment of the genetic diversity among strains of *Xanthomonas cynarae* by randomly amplified polymorphic DNA analysis and development of specific characterized amplified regions for the rapid identification of *X. cynarae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 8, p. 3379-3384, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.67.8.3379-3384.2001>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.67.8.3379-3384.2001>. Acesso em: 15 jan. 2021.

TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 46-54, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000100008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/fb/a/tjX7qqqZjQRCKNvkbq3ymDR/?lang=en>. Acesso em: 19 nov. 2020.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 453-483, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>. Acesso em: 15 jul. 2020.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1008638109140>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1008638109140>. Acesso em: 15 jul. 2020.

VAUTERIN, L.; HOSTE B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-472>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-45-3-472>. Acesso em: 13 jul. 2020

VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J.; SWINGS, J. Synopsis on the taxonomy of the genes *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 677-682, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.7.677>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.2000.90.7.677>. Acesso em: 12 jul. 2020.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994. Disponível em: <https://scholars.houstonmethodist.org/en/publications/genomic-fingerprinting-of-bacteria-using-repetitive-sequence-base>. Acesso em: 9 jul. 2020.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerpriting of bacterial enomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/19/24/6823/1318809?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 9 jul. 2020.

VLOT, A.C.; SALES, J.H.; LENK, M.; BAUER, K.; BRAMBILLA, A.; SOMMER, A.; CHEN, Y.; WENIG, M.; NAYEM, S. Systemic propagation of immunity in plants. **New Phytologist**, Oxford, v. 229, p. 1234-1250, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.16953>. Disponível em: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.16953>. Acesso em: 19 out. 2020.

WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance: helping plants to help themselves. **Biologist, [s.l.]**, v. 52, n. 1, p. 28-33, 2005.

YOUNG, J. M.; PARK, D. C.; SHEARMAN, H. M.; FARGIER, E. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 31, n. 5, p. 366-377, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202008000581?via%3Dihub>. Acesso em: 17 nov. 2020.

ZAMANI, Z.; BAHAR, M.; JACQUES, M. A.; LAK, M. R.; AKHAVAN, A. Genetic diversity of the common bacterial blight pathogen of bean, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, in Iran revealed by rep-PCR and PCR-RFLP analyses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 2371-2378, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0705-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-011-0705-7>. Acesso em: 19 fev. 2021.

ZHAI, J.; LUO, Y.; ZHENG, D.; HUANG, X. Evaluation of genetic diversity of highly virulent strains of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* by rep-PCR Fingerprinting. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 11-12, p. 764-768, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01707.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0434.2010.01707.x>. Acesso em: 2 fev. 2021.

CAPÍTULO 1

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Xanthomonas* spp.

PATOGÊNICAS AO TOMATEIRO¹

¹ Artigo redigido de acordo com as normas do periódico *Tropical Plant Pathology*.

1 **Diversidade genética de *Xanthomonas* spp. patogênicas ao tomateiro**

2

3 **Gislaine Nascimento Vieira de Sá¹, Nilvanira Donizete Tebaldi¹**

4

5 ¹Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal
6 de Uberlândia, Uberlândia, MG CEP 38400-902, Brasil7 Autor para correspondência: Nilvanira Donizete Tebaldi, e-mail: nilvanira.tebaldi@ufu.br

8

RESUMO

9

10 A mancha bacteriana do tomateiro causada por *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Xee), *X.*
11 *euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep), *X. hortorum* pv. *gardneri* (Xhg) e *X. vesicatoria* (Xv)
12 ocasiona sérios prejuízos à cultura. Métodos bioquímicos e moleculares permitem a
13 caracterização, distinção entre espécies e a avaliação do grau de variação genética dentro das
14 populações. O objetivo do trabalho foi caracterizar 29 isolados obtidos de tomate mesa com
15 sintomas de mancha bacteriana coletados no Espírito Santo e Minas Gerais, em relação à
16 morfologia das colônias, padrões bioquímicos e moleculares. A caracterização bioquímica de
17 29 isolados foi avaliada pelos testes: reação de Gram, oxidação ou fermentação da glicose,
18 utilização de asparagina, YDC, catalase, oxidase, crescimento a 40 °C, atividade amidolítica,
19 atividade pectolítica e reação de hipersensibilidade em fumo. A patogenicidade dos isolados
20 também foi avaliada. A identificação das espécies foi realizada por PCR convencional e
21 multiplex utilizando *primers* específicos e a diversidade genética foi avaliada por rep-PCR
22 (REP, ERIC e BOX). Todos os isolados apresentaram características bioquímicas do gênero
23 *Xanthomonas* e 12 isolados não apresentaram morfologia das colônias típicas. Apenas 17
24 isolados foram identificados quanto à espécie, sendo um como Xee, 14 como Xep e dois
25 como Xhg. A PCR multiplex não permitiu a distinção entre as espécies na identificação
26 simultânea. As análises de rep-PCR revelaram alta diversidade genética entre os isolados e os
27 grupos formados não apresentaram relação direta com as espécies, morfologia das colônias,
28 caracterização bioquímica ou localização geográfica.

29 **Palavras-chave** Caracterização molecular Mancha bacteriana *Solanum lycopersicum*

30

ABSTRACT

31

32 Tomato bacterial spot caused by *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Xee), *X. euvesicatoria*
33 pv. *perforans* (Xep), *X. hortorum* pv. *gardneri* (Xhg) and *X. vesicatoria* (Xv) causes serious
34 damage to the crop. Biochemical and molecular methods allow characterization, distinction
35 between species, and assessment of the degree of genetic variation within populations. The
36 objective of the work was to characterize 29 isolates obtained from tomato plants with
37 bacterial spot symptoms collected in Espírito Santo and Minas Gerais in respect to colony
38 morphology, biochemical and molecular patterns. The biochemical characterization of 29
39 isolates were evaluated by the following tests: Gram reaction, glucose oxidation or
40 fermentation, asparagine utilization, YDC, catalase, oxidase, growth at 40°C, amidolytic
41 activity, pectolytic activity, and hypersensitivity reaction in tobacco. The pathogenicity of the
42 isolates was also evaluated. Species identification was performed by conventional and
43 multiplex PCR using specific primers, and genetic diversity was assessed by rep-PCR (REP,
44 ERIC and BOX). All isolates showed biochemical characteristics of *Xanthomonas* genus and
45 12 isolates did not show typical colony morphology. Only 17 isolates were identified as
46 species, one as Xee, 14 as Xep and two as Xhg. Multiplex PCR did not allow distinction
47 between the species in simultaneous identification. Rep-PCR analyses revealed high genetic
48 diversity among the isolates and the groups formed did not show a direct relationship with the
49 species, colony morphology, biochemical characterization or geographic location.

50 **Keywords** Molecular characterization Bacterial spot *Solanum lycopersicum*

51

52

INTRODUÇÃO

53

54 O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ocupa posição de destaque, se enquadrando nas
55 principais hortaliças produzidas e consumidas no Brasil. No entanto, diversos são os fatores
56 que contribuem para a redução da produção, incluindo doenças causadas por fungos, vírus e
57 bactérias. As principais fitobactérias que provocam doenças no tomateiro são espécies dos
58 gêneros *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e *Pectobacterium*. A mancha
59 bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas* spp. ocasiona sérios prejuízos na cultura,
60 podendo resultar na destruição do tecido foliar e derrubada de flores e frutos em formação
61 (Lopes e Ávila 2005).

62 Os agentes etiológicos da doença são espécies do gênero *Xanthomonas*, sendo elas *X.*
63 *euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Constantin et al. 2016), *X.*
64 *hortorum* pv. *gardneri* (Morinière et al. 2020) e *X. vesicatoria* (Jones et al. 2004). Algumas
65 características fenotípicas permitem a distinção entre as espécies de *Xanthomonas* spp. que
66 infectam o tomateiro, sendo frequentemente adotadas na identificação e em estudos de
67 caracterização e diversidade. Dentre elas destaca-se a atividade amidolítica e pectolítica
68 (Bouzar et al. 1994; Stall et al. 1994; Jones et al. 2004; 2005). As caracterizações cultural,
69 bioquímica e molecular são ferramentas frequentemente utilizadas em rotina de laboratório
70 como forma rápida e simples na identificação de bactérias fitopatogênicas. A diagnose correta
71 e precisa é indispensável, pois auxilia na adoção de medidas de controle eficientes e
72 específicas para cada fitobactéria.

73 A aplicação de métodos moleculares, como a amplificação de fragmentos do genoma
74 por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) promove a distinção entre espécies ou a avaliação
75 do grau de variação genética dentro das populações bacterianas (Louws et al. 1999). As
76 técnicas moleculares modernas revolucionaram as metodologias até então utilizadas para

77 detecção de bactérias fitopatogênicas. O uso de *primers* específicos proporciona a detecção e
78 identificação das espécies de maneira rápida e sensível e particular (Moretti et al. 2009).
79 Nesse sentido, Koenraadt et al. (2009) desenvolveram *primers* específicos para cada uma das
80 espécies do complexo. A partir desses iniciadores, foi estabelecido o protocolo de PCR
81 multiplex para detecção simultânea das espécies (Araújo et al. 2012).

82 Os estudos de diversidade genética baseados em PCR são geralmente realizados com
83 *primers* universais que geram uma série de amplicons de DNA, chamados de impressões
84 digitais genômicas, permitindo entender a taxonomia, estrutura populacional e dinâmica de
85 bactérias associadas a plantas (Louws et al. 1999). A técnica rep-PCR envolve a amplificação
86 de sequências de DNA repetitivas conservadas específicas, determinadas REP (“Repetitive
87 Extragenic Palindromic”), ERIC (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) e
88 elementos BOX, sendo distribuídas no genoma de diversas bactérias (Versalovic et al. 1991;
89 1994; Louws et al. 1999).

90 Alguns estudos permitem correlacionar os agrupamentos obtidos por rep-PCR a partir
91 de padrões de bandas e similaridade de acordo com a distribuição geográfica, época de coleta
92 ou cultivar de origem, da mesma forma, a ausência de correlação também pode ocorrer.
93 Louws et al. (1994) demonstraram que bactérias associadas ao mesmo hospedeiro ou
94 complexo de doenças podem ser facilmente diferenciadas, assim como bactérias intimamente
95 relacionadas, podem ter perfis de rep-PCR divergentes. Embora estudos demonstrem a
96 ausência de diversidade com determinados marcadores moleculares, o monitoramento das
97 populações de bactérias ao longo do tempo e do espaço é fundamental para gerar informações
98 oportunas sobre a estrutura genética das populações de patógenos que sejam relevantes para
99 os programas de melhoramento genético e para a obtenção de genótipos resistentes (Adhikari
100 et al. 2019).

101 A caracterização de isolados de *Xanthomonas* que infectam o tomateiro permite
102 identificar e entender a frequência, distribuição das espécies e avaliação da diversidade
103 genética presente nessas populações. Estas informações contribuem para o manejo integrado
104 da doença e o desenvolvimento de cultivares resistentes a mancha bacteriana, ainda ausentes
105 no mercado.

106 Diante disso, o objetivo do trabalho foi caracterizar 29 isolados do gênero
107 *Xanthomonas* em relação à morfologia das colônias, padrões bioquímicos e moleculares,
108 identificar as espécies por *primers* específicos e avaliar a diversidade genética dos isolados.

109

110 MATERIAL E MÉTODOS

111

112 Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e em casa de
113 vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), da Universidade Federal de Uberlândia
114 (UFU), Campus Umuarama, no período de setembro de 2019 a março de 2021.

115

116 **Obtenção dos isolados de *Xanthomonas* spp.**

117 Os isolados de *Xanthomonas* spp. (Tabela 1) provenientes da coleção de trabalho do
118 Laboratório de Bacteriologia Vegetal do ICIAG/UFU foram cultivados em meio de cultura
119 523 (Kado e Heskett 1970) a 28 °C, por 48 h. A suspensão bacteriana foi preparada em água
120 filtrada esterilizada, quantificada e calibrada em espectrofotômetro DO₅₅₀=0,5 para a
121 concentração de 10⁹ UFC/mL (Marcuzzo et al. 2009).

122

123 **Tabela 1.** Isolados obtidos de tomate mesa (*Solanum lycopersicum* L.) com sintomas de
124 mancha bacteriana, coletados no Espírito Santo e Minas Gerais, preservados e mantidos na

125 coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de
 126 Uberlândia. Uberlândia-MG.

Isolado	Ano	Isolamento	Procedência
UFU A35	2009	Fruto	Araguari-MG
UFU B3	2010	Folha	Vitória-ES
UFU B5	2010	Folha	Vitória-ES
UFU B8	2010	Folha	Uberlândia-MG
UFU B9	2010	Folha	Uberlândia-MG
UFU B27	2010	Folha	São Gotardo-MG
UFU D28	2012	Muda	Uberlândia-MG
UFU D29	2012	Muda	Uberlândia-MG
UFU D35	2012	Folha	Uberlândia-MG
UFU E1	2013	Folha	Uberlândia-MG
UFU E34	2013	Folha	Uberlândia-MG
UFU E48	2013	Folha	Uberlândia-MG
UFU E49	2013	Folha	Uberlândia-MG
UFU G78	2015	Folha	Uberlândia-MG
UFU G79	2015	Folha	Araguari-MG
UFU G80	2015	Folha	Patos de Minas-MG
UFU H29	2016	Folha	Araguari-MG
UFU H97	2016	Folha	Uberlândia-MG
UFU H172	2016	Folha	Uberlândia-MG
UFU I39	2017	Folha	Uberlândia-MG
UFU I62	2017	Folha	Uberlândia-MG
UFU I92	2017	Cultura Bacteriana	Uberlândia-MG
UFU I93	2017	Cultura Bacteriana	Uberlândia-MG
UFU I216* ¹	2009	Cultura Bacteriana	Cafelândia-SP
UFU I217* ²	2010	Cultura Bacteriana	Caçador-SC
UFU I226	2017	Folha	Indianópolis-MG
UFU I242	2017	Folha	Uberlândia-MG
UFU K1	2019	Folha	Patos de Minas-MG
UFU K40	2019	Folha	Patos de Minas-MG
UFU K41	2019	Folha	Patos de Minas-MG
UFU K42	2019	Folha	Patos de Minas-MG

127 *Isolados referência cedidos pela Embrapa Horticárias, Brasília-DF. ¹*X. euvesicatoria* pv.
 128 *euvesicatoria* (Obtido de tomate para processamento industrial), ²*X. vesicatoria*.

130 **Morfologia das colônias, caracterização bioquímica e patogenidade no hospedeiro**

131 Para a confirmação da identidade dos isolados foi realizada a avaliação de
132 características da colônia, através da análise visual ou em estereoscópio e testes bioquímicos.
133 A morfologia das colônias avaliadas foram cor, bordos, elevação e aparência. Os testes
134 bioquímicos realizados foram a reação de Gram com base na solubilidade em KOH a 3%
135 (Ryu 1940), oxidação ou fermentação (O/F) da glicose (Hugh e Leifson 1953), utilização de
136 asparagina como fonte de carbono e nitrogênio (Starr e Weiss 1943), colônias amarelas em
137 meio YDC (Yeast Extract Dextrose CaCO_3), catalase, oxidase, crescimento a 40 °C (Schaad
138 et al. 2001), reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*)
139 (Klement et al. 1964). Para a distinção entre espécies de *Xanthomonas* spp. que infectam o
140 tomateiro foram realizados os testes de atividade amidolítica e atividade pectolítica em discos
141 de batata (Schaad e Stall 1988; Schaad et al. 2001).

142 Para a confirmação da patogenicidade dos isolados, as suspensões bacterianas foram
143 preparadas em água filtrada esterilizada, quantificadas e calibradas em espectrofotômetro
144 $\text{DO}_{550}=0,5$ para a concentração de 10^9 UFC/mL (Marcuzzo et al. 2009). A inoculação foi
145 realizada em casa de vegetação através da pulverização da suspensão bacteriana em plantas de
146 tomate da cultivar Santa Cruz Kada. As plantas foram mantidas em câmara úmida 24 h antes
147 e após a inoculação. Após o aparecimento dos sintomas foi feito o reisolamento em meio de
148 cultura.

149

150 **Caracterização molecular por PCR**

151 Os extratos de DNAs de 29 isolados de *Xanthomonas* spp. foram avaliados pela reação
152 em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação das espécies utilizando o conjunto de
153 primers específicos Bs-XeF/XeR, Bs-XvF/XvR, Bs-XpF/XpR e Bs-XgF/XgR (Koenraadt et

154 al. 2009) e para o estudo da diversidade genética utilizando os *primers* REP1R/REP2,
 155 ERIC1R/ERIC2 e BOXA1R (Louws et al. 1994).

156 O DNA genômico bacteriano foi extraído utilizando o Kit Wizard Genomic DNA
 157 Purification (PROMEGA) e quantificado no NanoDrop (Thermo Scientific Nanodrop
 158 2000/2000c Spectrophotometer).

159

160 **Identificação de espécies de *Xanthomonas* utilizando *primers* específicos**

161 A identificação das espécies de 29 isolados de *Xanthomonas* spp. foi realizada através
 162 da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o conjunto de *primers* específico Bs-
 163 XeF/XeR, Bs-XvF/XvR, Bs-XpF/XpR e Bs-XgF/XgR (Koenraadt et al. 2009) (Tabela 2).

164

165 **Tabela 2.** Conjunto de *primers* para a identificação de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*
 166 (Xee), *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep), *X. hortorum* pv. *gardneri* (Xhg) e *X. vesicatoria*
 167 (Xv).

Primer	Sequência	Fragmento esperado (pb)
Bs-XeF	CAT GAA GAA CTC GGC GTA TCG	173 pb
Bs-XeR	GTC GGA CAT AGT GGA CAC ATA C	
Bs-XpF	GTC GTG TTG ATG GAG CGT TC	197 pb
Bs-XpR	GTG CGA GTC AAT TAT CAG AAT GTG G	
Bs-XgF	TCA GTG CTT AGT TCC TCA TTG TC	154 pb
Bs-XgR	TGA CCG ATA AAG ACT GCG AAA G	
Bs-XvF	CCA TGT GCC GTT GAA ATA CTT G	138 pb
Bs-XvR	ACA AGA GAT GTT GCT ATG ATT TGC	

168

169 As reações de PCR foram realizadas na concentração e no volume final de 12,5 µL de
 170 reação, composta de 50 ng/µL de DNA genômico, 1X tampão de PCR 10X com Mg²⁺, 2,0
 171 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP e 1,25 U de Taq DNA polimerase. As reações de
 172 amplificação foram realizadas em termociclador ThermoHybaid: Omn-E, nas condições de 94

173 °C por cinco minutos, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos para desnaturação, 66
174 °C por um minuto para anelamento e 72 °C por um minuto para extensão, seguido por uma
175 extensão final a 72 °C por sete minutos (Araújo et al. 2012). Os produtos de amplificação
176 foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corados com SYBR Safe,
177 visualizados sob luz ultravioleta e fotografados. Como controle negativo foram utilizados os
178 isolados UFU B39 de *Pseudomonas corrugata* e UFU F78 de *Xanthomonas campestris* pv.
179 *campestris*.

180

181 **PCR multiplex**

182 Para a identificação simultânea do complexo de espécies foram utilizados os quatro
183 pares de *primers* específicos propostos por Koenraadt et al. (2009), em formato multiplex. As
184 reações de PCR foram realizadas no volume final de 12,5 µL de reação, composta de
185 concentrações de DNA genômico que variaram de 400 ng/µL a 800 ng/µL, com as
186 composições, condições e análises anteriormente descritas para PCR convencional (Araújo et
187 al. 2012).

188

189 **PCR com suspensão bacteriana**

190 As reações utilizando as suspensões bacterianas foram realizadas nas mesmas
191 condições descritas anteriormente para a identificação de espécies e para PCR multiplex. O
192 DNA genômico extraído foi substituído pelo uso da suspensão bacteriana na concentração de
193 10⁸ UFC/mL para PCR convencional e por suspensões altamente concentradas, não calibradas
194 em espectrofotômetro, para PCR multiplex.

195

196 **Diversidade genética por rep-PCR**

197 O estudo da diversidade genética de 29 isolados de *Xanthomonas* spp. foi realizado
198 através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* REP1R (5'-
199 IIIICGICGICATCIGGC-3') e REP2 (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'); ERIC1R (5'-
200 ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-
201 3') e BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Louws et al. 1994).

202 As reações de PCR foram realizadas na concentração e no volume final de 12,5 µL de
203 reação, composta de 50 ng/µL de DNA genômico, 1X tampão de PCR 10X, 1 µM de cada
204 *primer*, 0,2 mM de dNTP e 1 U de Taq DNA polimerase. As reações de amplificação foram
205 realizadas em termociclador ThermoHybaid: Omn-E, nas condições de 95 °C por sete
206 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por um minuto para desnaturação, 40 °C (REP e
207 ERIC) e 53 °C (BOX) por um minuto para anelamento, 65 °C por cinco minutos para
208 extensão, seguido por uma extensão final a 65 °C por 15 minutos (Louws et al. 1994). Os
209 produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose como descrito
210 anteriormente.

211

212 **Dendrograma**

213 Os perfis de amplificação obtidos foram analisados visualmente e transformados em
214 dados binários, onde a presença de bandas no gel translúcido recebeu o valor um e a ausência
215 o valor zero. Para o estudo da diversidade genética foi gerado um dendrograma de
216 similaridade a partir do Coeficiente de Jaccard com base na análise de agrupamento realizada
217 pelo método UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic avarages) (Sokal e
218 Michener 1958). Os dados gerados foram analisados com o programa computacional Genes
219 (Cruz 2013).

220

221

RESULTADOS

222

223 Morfologia das colônias e caracterização bioquímica dos isolados de *Xanthomonas*

224 Dos 29 isolados, apenas 18 apresentaram colônias típicas de *Xanthomonas*, com a
 225 borda lisa, convexa e brilhante. Coincidentemente, os isolados que demonstraram essa
 226 característica fenotípica específica, com exceção de um, foram identificados em nível de
 227 espécies com os *primers* específicos (Koenraadt et al. 2009) (Tabela 3).

228

229 **Tabela 3.** Morfologia das colônias, caracterização bioquímica, molecular e patogenicidade de
 230 isolados obtidos de tomate mesa, com sintomas de mancha bacteriana.

Isolado	Colônia	Cor	Amidolítica	Pectolítica	Gram	O/F	Asparagina	YDC	Catalase	Oxidase	40 °C	HR em fumo	Patogenicidade	Espécie
UFU A35	BL, C, B	A	-	-	-	O	-	+	+	-	+	+	+	Xhg
UFU B3	BL, LE, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Nid
UFU B5	BL, LE, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Nid
UFU B8	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	+	+	Xep
UFU B9	BO, LE, B	A	-	-	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Nid
UFU B27	BL, C, B	A	-	-	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xhg
UFU D28	BL, R, S	AE	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Nid
UFU D29	BL, R, S	AE	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Nid
UFU D35	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	+	+	Xep
UFU E1	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	+	+	Xep
UFU E34	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xep
UFU E48	BL, LE, B	AE	-	-	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Nid
UFU E49	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xep

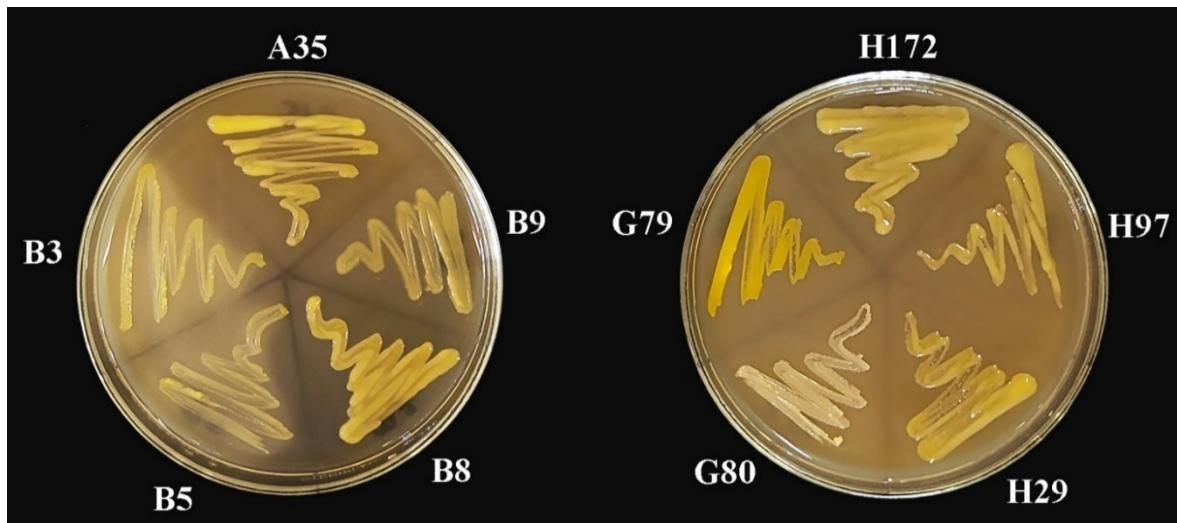
UFU G78	BL, LE, B	AC	-	-	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Nid
UFU G79	BL, R, S	AE	-	-	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Nid
UFU G80	BL, LE, B	AC	+	+	-	O	-	+	+	-	+	+	+	Nid
UFU H29	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	+	+	Xep
UFU H97	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xep
UFU H172	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	+	+	Xep
UFU I39	BL, C, B	A	-	-	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xee
UFU I62	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xep
UFU I92	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xep
UFU I93	BL, R, S	AE	-	-	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Nid
UFU I216*	BL, C, B	A	-	-	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xee
UFU I217*	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xv
UFU I226	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xep
UFU I242	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xep
UFU K1	BL, R, S	AE	-	-	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Nid
UFU K40	BL, C, B	AC	-	-	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Nid
UFU K41	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xep
UFU K42	BL, C, B	A	+	+	-	O	-	+	+	-	+	-	+	Xep

231 A: Amarelo; AC: Amarelo claro; AE: Amarelo escuro; BL: Borda lisa; BO: Borda ondulada;
 232 B: Brilhante; C: Convexa; LE: Levemente elevada; Nid: Espécie não identificada com
 233 *primers* específicos; O: Oxidação; R: Reta; S: Seca; Xee: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*;
 234 Xhg: *X. hortorum* pv. *gardneri*; Xep: *X. euvesicatoria* pv. *perforans*; Xv: *X. vesicatoria*; (+):
 235 reação positiva para o teste; (-): reação negativa para o teste. *Isolados referência cedidos pela
 236 Embraba Hortaliças, Brasília-DF.

237
 238 As cores das colônias variaram de amarelo claro a amarelo escuro, sendo a cor
 239 amarelo médio predominante. Os isolados UFU B3, B5, B9, G79 e UFU G80, não
 240 identificados em nível de espécies por PCR, apresentaram morfologia das colônias atípicas,
 241 como: colônia levemente elevada ou reta, seca, borda ondulada e coloração amarelo claro ou

242 escuro. Os isolados UFU A35 e UFU B8, H29, H97, H172, foram identificados como *X.*
 243 *hortorum* pv. *gardneri* e *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, respectivamente, apresentando
 244 morfologia das colônias típicas de *Xanthomonas* (Figura 1). Os isolados não identificados em
 245 nível de espécies, tiveram em sua maioria, características de colônia atípicas (Tabela 3).

246



247 **Figura 1.** Variação na morfologia das colônias de isolados obtidos de tomate mesa (*Solanum*
 248 *lycopersicum* L.) com sintomas de mancha bacteriana, cultivados em meio de cultura 523,
 249 após 48h de incubação.

250

251 Todos os isolados avaliados foram Gram-negativos, oxidativos e catalase positivos,
 252 asparagina e oxidase negativos, e apresentaram colônias amarelas em meio YDC à 40 °C,
 253 confirmando as descrições fenotípicas (Schaad e Stall 1988; Schaad et al. 2001). A reação de
 254 hipersensibilidade em folhas de fumo (HR) foi variável e todos os isolados foram patogênicos
 255 ao tomateiro. As espécies *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Xee) e *X. hortorum* pv. *gardneri*
 256 (Xhg) foram amidolíticas e pectolíticas negativas, enquanto *X. euvesicatoria* pv. *perforans*
 257 (Xep) e *X. vesicatoria* (Xv), positivas (Tabela 3).

258

259 **Identificação das espécies de *Xanthomonas* utilizando *primers* específicos**

260 Na identificação das espécies de *Xanthomonas* dos 29 isolados analisados, apenas 17
 261 produziram produtos na PCR com os *primers* específicos, sendo um identificado como *X.*
 262 *euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Xee), dois como *X. hortorum* pv. *gardneri* (Xhg) e 14 como
 263 *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep) (Tabela 3). Os fragmentos amplificados variaram em
 264 tamanho de acordo com a espécie, conforme esperado (Koenraadt et al. 2009) (Figura 2).

265

266

267

268

269

270

271

272

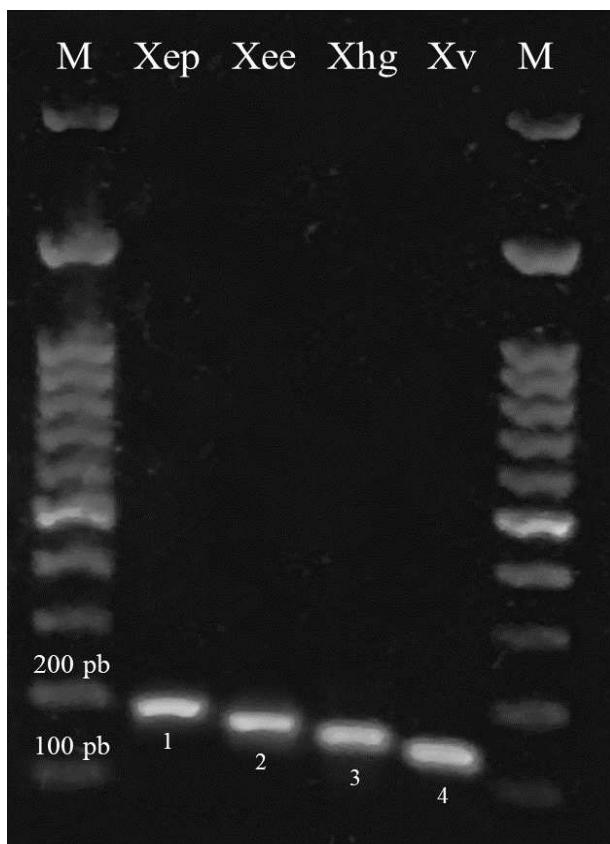
273

274

275

276

277



278 **Figura 2.** Amplificação de fragmentos de DNA de *Xanthomonas* spp. do tomateiro com
 279 *primers* específicos (Koenraadt et al. 2009). ¹Xep: *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (197 pb –
 280 K42), ²Xee: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (173 pb – I39), ³Xhg: *X. hortorum* pv.
 281 *gardneri* (154 pb – B27), ⁴Xv: *X. vesicatoria* (138 pb – I217). M: Marcador molecular (100
 282 pb DNA Ladder, Kasvi).

283

284 **PCR multiplex**

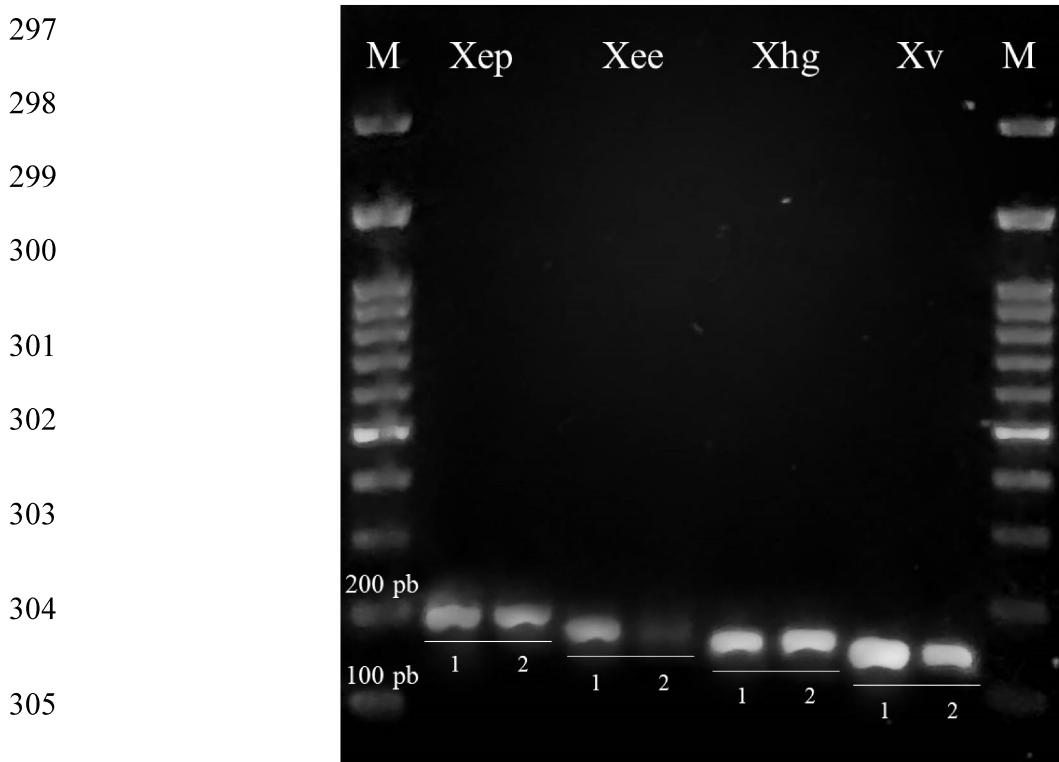
285 A PCR multiplex apresentou uma baixa sensibilidade. A utilização de DNA na
 286 concentração de 50 ng/µL resultou na amplificação de bandas claras, a níveis quase
 287 indetectáveis. Não foi possível distinguir as espécies separadamente no gel de agarose, pois as
 288 bandas estavam agregadas (Figura 4).

289

290 **PCR com suspensão bacteriana**

291 No uso da suspensão bacteriana na concentração de 10^8 UFC/mL na PCR
 292 convencional foi observada a formação de bandas no gel de agarose, podendo substituir a
 293 utilização de DNA extraído em reações de PCR (Figura 3). Comumente os kits de extração de
 294 DNA são caros, o que inviabiliza rotinas de laboratório para a diagnose da bactéria em plantas
 295 e sementes.

296



306 **Figura 3.** Amplificação de DNA genômico extraído (50 ng/µL) e suspensão bacteriana (10^8
 307 UFC/mL) de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep - K42), *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

308 (Xee – I39), *X. hortorum* pv. *gardneri* (Xhg – B27) e *X. vesicatoria* (Xv – I217), por PCR
 309 convencional com *primers* específicos (Koenraadt et al. 2009). ¹DNA genômico extraído,
 310 ²Suspensão bacteriana. M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, Kasvi).

311

312

313

314

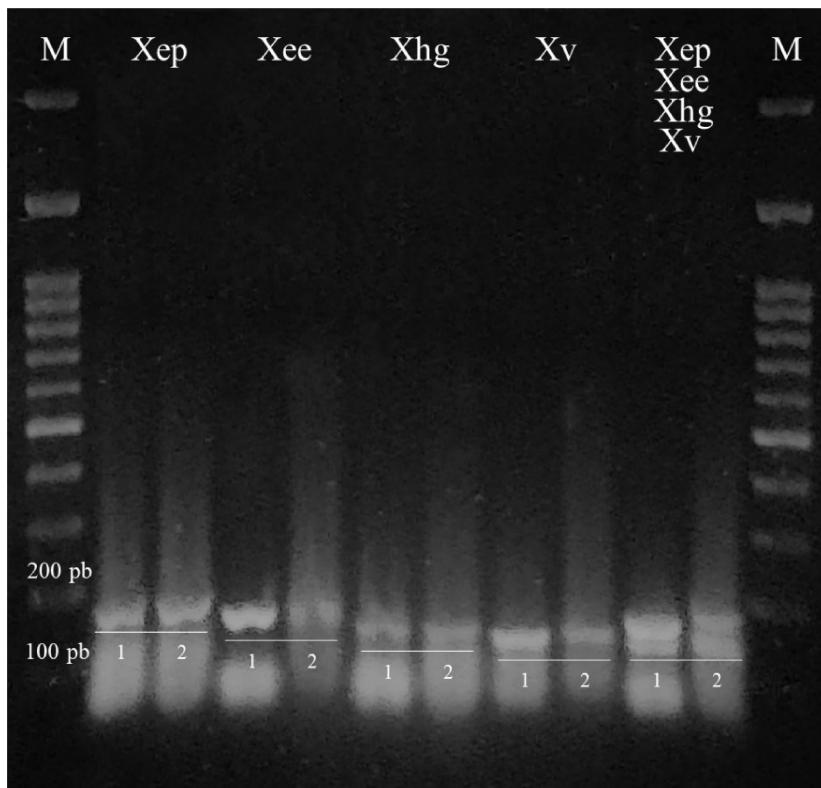
315

316

317

318

319



320 **Figura 4.** Amplificação de DNA genômico extraído (400-800 ng/µL) e suspensão bacteriana
 321 concentrada de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep – K42), *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*
 322 (Xee – I39), *X. hortorum* pv. *gardneri* (Xhg – B27), *X. vesicatoria* (Xv – I217) e das espécies
 323 simultaneamente, por PCR multiplex com *primers* específicos (Koenraadt et al. 2009). ¹DNA
 324 genômico extraído, ²Suspensão bacteriana. M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder,
 325 Kasvi).

326

327

Diversidade genética

328 O presente estudo revelou uma alta diversidade genética entre os isolados de
 329 *Xanthomonas* por rep-PCR (REP, ERIC e BOX). Para todos os conjuntos de *primers*, a 20%
 330 de similaridade houve a formação de quatro grupos (Figura 5, 6 e 7), com padrões de bandas

331 distintos que variaram de 100 a 11.000 pb. Os grupos formados não apresentaram relação
332 direta com as espécies, morfologia das colônias, caracterização bioquímica ou localização
333 geográfica. Os isolados da mesma espécie apresentaram consequentemente morfologia das
334 colônias e caracterização bioquímica idênticas.

335 As análises de REP-PCR e ERIC-PCR (Figuras 5 e 6) demonstraram 100% de
336 similaridade entre os isolados UFU K41 e UFU K42 de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep),
337 provenientes de Patos de Minas-MG e obtidos em 2019. Para ERIC-PCR e BOX-PCR
338 (Figuras 6 e 7) os isolados UFU A35 e UFU B27 de *X. hortorum* pv. *gardneri* (Xhg), apesar
339 de serem de cidades diferentes, também foram 100% similares. Os resultados de ERIC-PCR e
340 BOX-PCR demonstraram relação parcial entre a formação dos agrupamentos e as espécies de
341 *Xanthomonas* identificadas.

342 Por REP-PCR (Figura 5) os isolados não identificados com os *primers* específicos
343 (Nid) de Uberlândia-MG UFU D28, D29, G78 e UFU I93 e o isolado de Patos de Minas-MG
344 UFU K1, obtidos entre os anos de 2012 a 2019, apontaram 100% de similaridade,
345 apresentando a mesma morfologia das colônias. Os isolados UFU D28 e UFU D29 foram
346 amidolíticos e pectolíticos positivos, enquanto UFU G78, I93 e UFU K1 foram negativos,
347 descartando a possibilidade de pertencerem a mesma espécie. Em contrapartida, os isolados
348 UFU B5 e UFU K40 (Nid), que apresentaram 100% de similaridade, são morfologicamente e
349 bioquimicamente diferentes, além de serem provenientes de locais distintos. Com
350 aproximadamente 40% e 85% de similaridade os isolados UFU I39 e UFU I216 (Referência)
351 de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Xee) e UFU A35 e UFU B27 (Xhg), respectivamente,
352 pertencentes a mesma espécie e provenientes de locais distintos, formaram subgrupos. Os
353 isolados UFU E34 e UFU E49 (Xep) obtidos em 2013, advindos do mesmo local e UFU H29
354 e UFU H97 (Xep) obtidos em 2016, de locais diferentes, foram similares a 95% e 75%
355 respectivamente. Com aproximadamente 25% de similaridade com os demais, um subgrupo

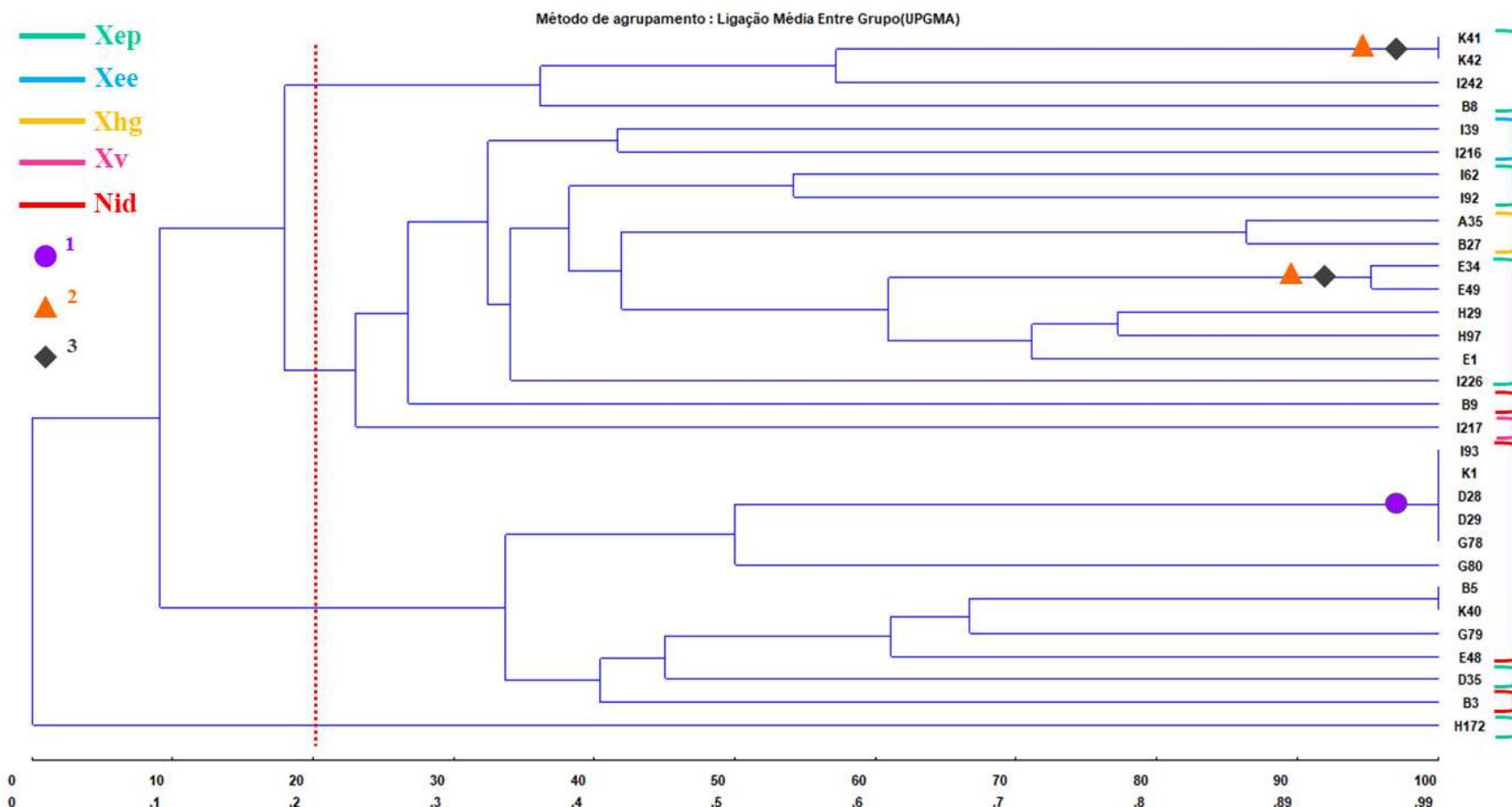
356 contendo o único isolado de *X. vesicatoria* (Xv) UFU I217 (Referência), foi formado. Os
357 isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* não se agruparam. O isolado UFU H172 (Xep) não
358 apresentou similaridade com os demais.

359 Em ERIC-PCR (Figura 6) os isolados UFU E1 e UFU E34 foram 100% similares,
360 apresentando também mais de 90% de similaridade com o UFU E49, todos pertencentes à
361 mesma espécie (Xep), provenientes de Uberlândia-MG e obtidos no mesmo ano. Os dois
362 isolados advindos de Vitória-ES no ano de 2010, UFU B3 e UFU B5 (Nid), com a mesma
363 morfologia das colônias e caracterização bioquímica, apresentaram 65% de similaridade entre
364 si. Os isolados UFU I39 (Xee) e UFU I216 (Referência – Xee) foram agrupados com
365 aproximadamente 90% de similaridade e UFU D28 e UFU D29 (Nid) com 70%. Um
366 subgrupo com cerca de 60% de similaridade foi formado por 11 dos 14 isolados de *X.*
367 *euvesicatoria* pv. *perforans* obtidos entre os anos de 2010 a 2019 (UFU K41, K42, I62, I92,
368 H29, H97, E1, E34, E49, B8 e UFU H172). O isolado UFU D35 (Xep) não apresentou
369 similaridade com os demais.

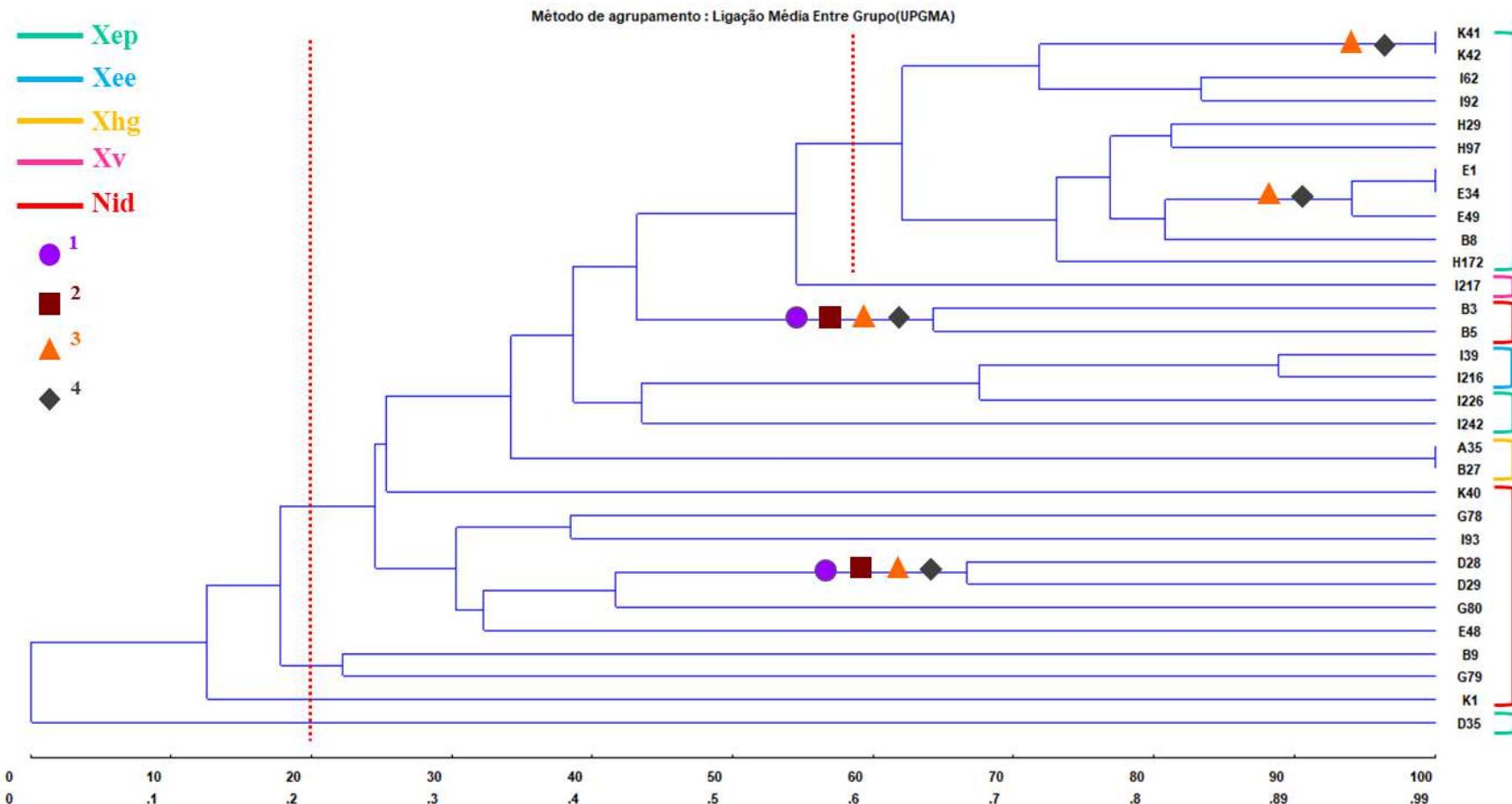
370 Para BOX-PCR (Figura 7) os isolados UFU E34 e UFU E49 (Xep) provenientes do
371 mesmo local, apresentaram 100% de similaridade, assim como os isolados UFU D28 e UFU
372 D29 (Nid). Do mesmo modo, os isolados UFU H29 e UFU H97 (Xep), de locais diferentes,
373 também foram totalmente similares. Os isolados UFU B5 (Nid) de Vitória-ES e UFU B9
374 (Nid) de Uberlândia-MG, obtidos em 2010, com a morfologia das colônias e atividade
375 amidolítica e pectolítica diferentes, apresentaram aproximadamente 70% de similaridade entre
376 si. Foram agrupados com uma similaridade mínima de 70%, 12 dos 14 isolados de *X.*
377 *euvesicatoria* pv. *perforans* (UFU H29, H97, D35, E1, E34, E49, I92, B8, I242, K41, I226 e
378 UFU K42). O isolado UFU G78 (Nid) não apresentou similaridade com os demais.

379 O dendrograma gerado a partir da análise dos três *primers* em conjunto demonstrou a
380 formação de 16 grupos com 30% de similaridade (Figura 8). Com similaridade mínima de
381 90% os isolados UFU E34 e UFU E49 (Xep), assim como UFU K41 e UFU K42 (Xep), do
382 mesmo local e os isolados UFU A35 e UFU B27 (Xhg) de locais diferentes, formaram três
383 subgrupos diferentes. Isolados UFU H29 e UFU H97 (Xep), apresentaram 80% de
384 similaridade e UFU D28 e UFU D29 (Nid), foram 70% similares. Todos os isolados não
385 identificados com os *primers* específicos e que exibiram morfologia das colônias atípicas,
386 apresentaram menos de 15% de similaridade com isolados identificados. Um subgrupo com
387 aproximadamente 15% de similaridade agrupou todos os isolados identificados, com exceção
388 do UFU H172 (Xep).

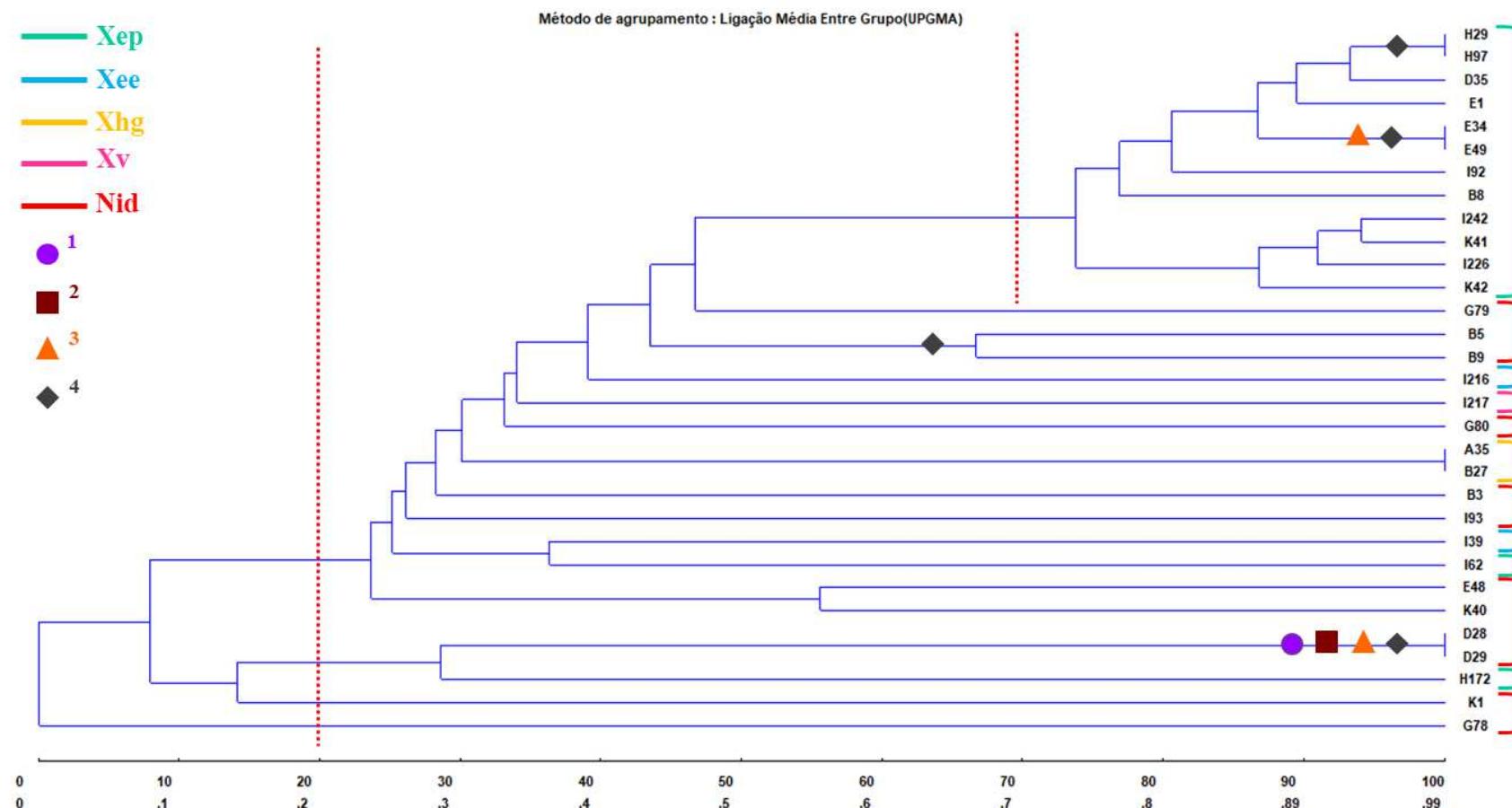
389 O coeficiente de correlação cofenética (CCC) mede o grau entre a matriz de
390 similaridade e a matriz obtida pelo método de agrupamento. Quanto maior o grau de ajuste ou
391 o valor obtido para o CCC, menor será a distorção ocasionada pelo método (Regazzi e Cruz
392 2020). Desse modo, os valores de coeficiente de correlação alcançados indicaram um bom
393 ajuste entre a matriz obtida pelo método de agrupamento e a matriz original.



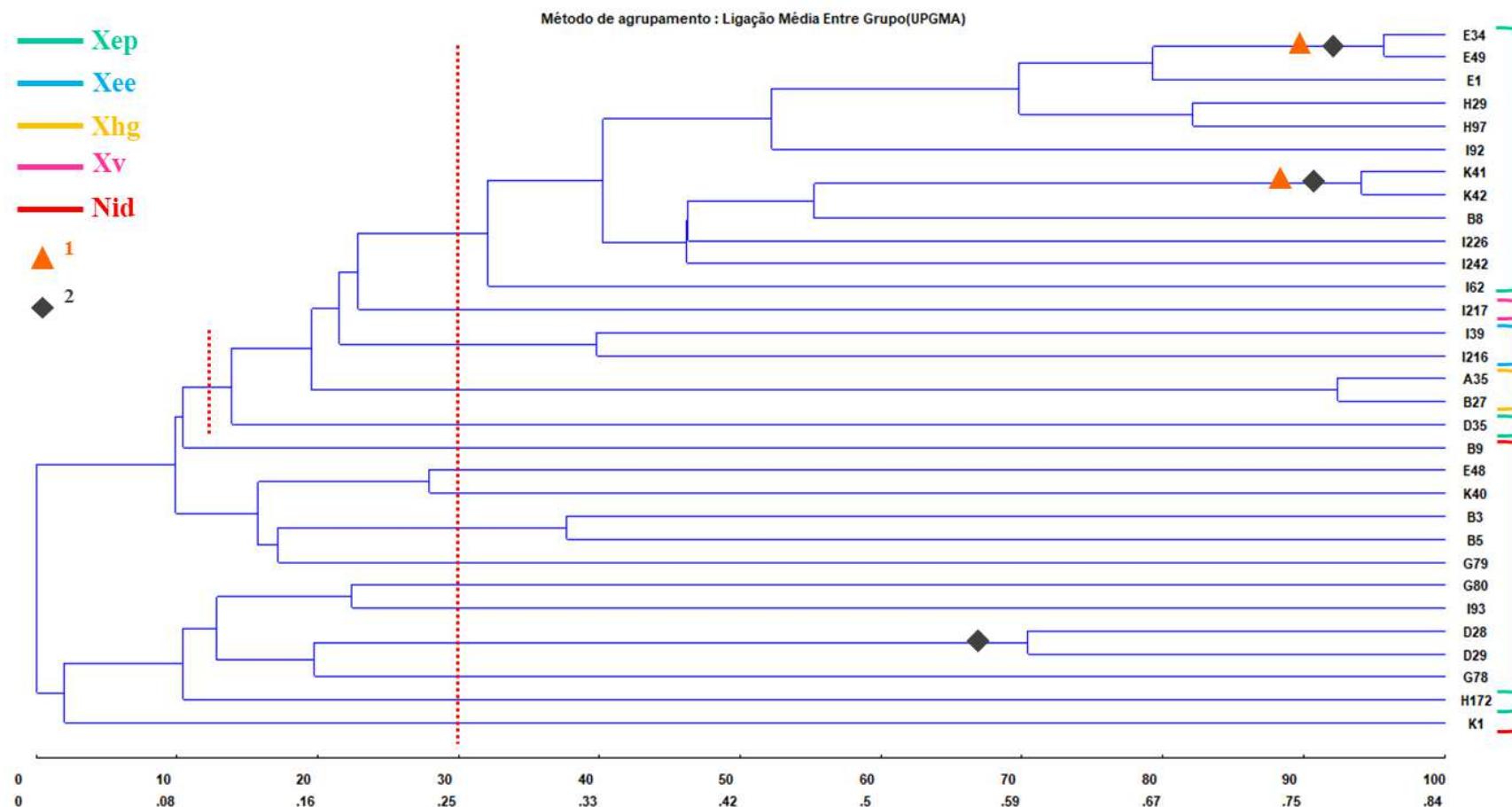
394 **Figura 5.** Dendrograma de agrupamento pelo método UPGMA de isolados obtidos de tomate mesa com sintomas de mancha bacteriana
 395 utilizando os *primers* REP1R e REP2. Coeficiente de correlação cofenética: 0,95. Similaridade máxima: 1,0. Similaridade mínima: 0.
 396 ¹Morfologia das colônias idêntica, ²Provenientes da mesma cidade, ³Obtidos no mesmo ano. Xep: *X. euvesicatoria* pv. *perforans*; Xee:
 397 *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*; Xhg: *X. hortorum* pv. *gardneri*; XV: *X. vesicatoria*; Nid: Não identificados com *primers* específicos.



398 **Figura 6.** Dendrograma de agrupamento pelo método UPGMA de isolados obtidos de tomate mesa com sintomas de mancha bacteriana
 399 utilizando os *primers* ERIC1R e ERIC2. Coeficiente de correlação cofenética: 0,94. Similaridade máxima: 1,0. Similaridade mínima: 0.
 400 ¹Morfologia das colônias idêntica, ²Caracterização bioquímica idêntica, ³Provenientes da mesma cidade, ⁴Mesmo ano. Xep: *X. euvesicatoria* pv.
 401 *perforans*; Xee: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*; Xhg: *X. hortorum* pv. *gardneri*; XV: *X. vesicatoria*; Nid: Não identificados com *primers*
 402 específicos.



403 **Figura 7.** Dendrograma de agrupamento pelo método UPGMA de isolados obtidos de tomate mesa com mancha bacteriana
 404 utilizando o primer BOXA1R. Coeficiente de correlação cofenética: 0,96. Similaridade máxima: 1,0. Similaridade mínima: 0. ¹Morfologia das
 405 colônias idêntica, ²Caracterização bioquímica idêntica, ³Provenientes da mesma cidade, ⁴Mesmo ano. Xep: *X. euvesicatoria* pv. *perforans*; Xee:
 406 *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*; Xhg: *X. hortorum* pv. *gardneri*; XV: *X. vesicatoria*; Nid: Não identificados com primers específicos.



407 **Figura 8.** Dendrograma de agrupamento pelo método UPGMA de isolados obtidos de tomate mesa com sintomas de mancha bacteriana por rep-
 408 PCR (REP, ERIC e BOX-PCR). Coeficiente de correlação cofenética: 0,91. Similaridade máxima: 1,0. Similaridade mínima: 0. ¹Provenientes da
 409 mesma cidade, ²Mesmo ano. Xep: *X. euvesicatoria* pv. *perforans*; Xee: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*; Xhg: *X. hortorum* pv. *gardneri*; XV: *X.*
 410 *vesicatoria*; Nid: Não identificados com primers específicos.

411

DISCUSSÃO

412

413 De acordo com Jones et al. (2004), geralmente, as espécies *X. euvesicatoria* e *X.*
414 *gardneri* são amidolíticas e pectolíticas negativas, enquanto a *X. perforans* e *X. vesicatoria*
415 são positivas, corroborando os resultados obtidos neste estudo (Tabela 4). A predominância
416 de isolados pertencentes a espécie *X. perforans* evidencia, até o momento, a maior ocorrência
417 dessa espécie, juntamente com *X. gardneri*, na região e no Brasil (Quezado-Duval et al. 2004;
418 2005; Pereira et al. 2011; Araújo et al. 2011; 2017).

419 As causas da não amplificação de 12 isolados em estudo ainda são desconhecidas. Em
420 caso de não amplificação por qualquer motivo adverso, supõe-se que os isolados UFU B3,
421 B5, D28, D29 e UFU G80, que apresentaram atividade amidolítica e pectolítica positiva e
422 UFU B9, E48, G78, G79, I93, K1 e UFU K40, que são amidolíticos e pectolíticos negativos,
423 possam ser enquadrados nas espécies *Xep/Xv* e *Xee/Xhg*, respectivamente. Mesmo
424 apresentando morfologia das colônias não semelhantes as espécies identificadas, não se
425 descarta a possibilidade do surgimento de uma nova espécie infectando o tomateiro, visto que
426 todos os isolados não identificados foram patogênicos. Tais suposições carecem de mais
427 estudos, como a PCR para goma xantana, heteropolissacarídeo produzido por espécies de
428 *Xanthomonas* (Leela e Sharma 2000), ou o sequenciamento da região 16S RNA ribossomal
429 para serem elucidadas.

430 Araújo et al. (2012) observaram o limite de detecção para DNA purificado de 0,05
431 ng/µL para espécies individuais em PCR multiplex. No presente estudo, a utilização de DNA
432 na concentração de 50 ng/µL resultou na amplificação de bandas claras, a níveis quase
433 indetectáveis. A baixa sensibilidade na presença de todas as espécies, a impossibilidade da
434 distinção entre espécies na presença das quatro bandas e a ocorrência de “arrastes” e “restos”,

435 provavelmente provocados por excesso de produtos ou similares, evidencia a necessidade de
436 ajustes no protocolo.

437 Os fragmentos amplificados que permitem a diferenciação das espécies de
438 *Xanthomonas* por PCR variam de 197 pb a 138 pb, devido a proximidade dos fragmentos a
439 distinção das bandas fica comprometida. A ocorrência de uma separação robusta entre bandas
440 possivelmente exigiria um gel de agarose mais concentrado ou de um tempo de corrida mais
441 longo, tornando o procedimento dispendioso e demorado. Araújo et al. (2012) ressaltam ainda
442 que processos de otimização da PCR multiplex devem ser elaborados para uma melhor
443 eficiência do método para este patossistema.

444 Araújo et al. (2013) utilizaram a suspensão bacteriana de *X. vesicatoria* na
445 concentração de 5×10^8 UFC/mL para PCR convencional utilizando os *primers*
446 desenvolvidos especificamente para a espécie. No entanto, Araújo et al. (2012) verificaram a
447 sensibilidade de detecção da suspensão bacteriana para PCR convencional e multiplex
448 utilizando os primers de Koenraadt et al. (2009) variando de 5×10^2 UFC/mL para Xee e Xep
449 e 5×10^4 UFC/mL para Xhg e Xv. No presente trabalho a suspensão bacteriana utilizada para
450 PCR multiplex foi preparada a fim de apresentar uma aparência final altamente turva, não
451 sendo calibrada e quantificada. Moretti et al. (2009) também testaram o limite de detecção da
452 suspensão bacteriana de *X. euvesicatoria* para PCR convencional utilizando *primers*
453 desenvolvidos para a espécie. As concentrações variaram de 2×10^1 a 2×10^9 UFC/mL e a
454 sensibilidade mínima encontrada foi de 2×10^2 UFC/mL.

455 O uso simultâneo de *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis*, *Pseudomonas*
456 *syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* em PCR multiplex, usando 3
457 UFC proveniente de cada cultura pura em 50 µL de água destilada esterilizada foi suficiente a
458 detecção dos três gêneros simultaneamente. Porém a sensibilidade de detecção foi reduzida
459 em 10 vezes comparada a PCR convencional (Özdemir 2009). Um estudo realizado por

460 Louws et al. (1994) também demonstrou a eficiência do uso de células bacterianas de
461 *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, comparadas ao DNA genômico purificado, para rep-PCR. As
462 células bacterianas produziram padrões de bandas indistinguíveis daqueles gerados com DNA
463 modelo purificado. A substituição do DNA genômico bacteriano extraído pela suspensão
464 bacteriana preparada a partir da cultura pura permite a otimização e agilidade no processo de
465 identificação das espécies de *Xanthomonas* spp., suprimindo a etapa de extração do DNA,
466 sendo este um procedimento minucioso, demorado e relativamente caro.

467 As análises por rep-PCR revelaram agrupamentos de *Xanthomonas* spp. que infectam
468 o tomateiro sem relação direta com as espécies, morfologia das colônias, caracterização
469 bioquímica ou localização geográfica. Bouzar et al. (1999), por exemplo, na caracterização
470 por rep-PCR de mais de 400 isolados de *Xanthomonas* spp. do Caribe e América Central,
471 observaram a pouca associação entre algumas características fenotípicas e o padrão de bandas
472 do patógeno, como a designação de raça.

473 As análises por ERIC-PCR e BOX-PCR revelaram uma baixa variabilidade genética
474 entre 11 e 12 isolados, respectivamente, dos 14 isolados de *X. perforans* em estudo. A análise
475 por ERIC-PCR demonstrou uma similaridade mínima de 65%, enquanto por BOX a
476 similaridade foi de 70% ou mais. Esse resultado corrobora o estudo realizado por Aiello et al.
477 (2013), onde foram observados os padrões genômicos de isolados de *X. perforans*, coletados
478 em plantações de tomate na Itália e todos os isolados exibiram padrões de ERIC-PCR e BOX-
479 PCR semelhantes, além de um alto grau de diversidade genética entre isolados das espécies
480 distintas de *Xanthomonas* associadas ao tomate. O estudo realizado por Adhikari et al. (2019)
481 também revelou baixa variabilidade genética entre isolados de *X. perforans* coletados na
482 Carolina do Norte em 2015 e 2016, por meio de BOX-PCR.

483 Em contraste, Araújo et al. (2017) constataram através de BOX-PCR uma alta
484 variabilidade genética de *X. perforans* em lavouras comerciais de tomate no Brasil, entre 2009

485 e 2012. A similaridade máxima alcançada entre os isolados de XP foi de 76,2% e entre XG,
486 61,1%. Algumas limitações para a correta separação das espécies também foram observadas,
487 principalmente entre *X. perforans* e *X. euvesicatoria*. No presente estudo, os dois isolados de
488 XE (UFU I39 e UFU I216) também não foram separados de isolados de Xep.

489 A análise de clusters utilizando o método UPGMA realizada por Osdaghi et al. (2018)
490 demonstrou que BOX-PCR foi capaz de discriminar quatro grupos de *Xanthomonas* spp. que
491 causa a mancha bacteriana do tomateiro no Irã, sendo compostos pelas quatro espécies. Tal
492 formação de grupos não ocorreu claramente no presente trabalho.

493 Por REP-PCR não foi observada relação entre os grupos formados e os isolados
494 identificados como *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. Em contrapartida, Pereira et al. (2011)
495 identificaram por meio de rep-PCR, 81 isolados de *Xanthomonas* spp. coletados em campos
496 comerciais de tomate para consumo *in natura*, provenientes de 11 estados localizados nas
497 regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, entre os anos de 2005 e 2009. Os
498 perfis genômicos de BOX-PCR e REP-PCR permitiram a diferenciação das quatro espécies
499 de *Xanthomonas*.

500 Para as análises de BOX-PCR e ERIC-PCR, os isolados UFU A35 e UFU B27 de *X.*
501 *hortorum* pv. *gardneri* apresentaram padrões idênticos, revelando 100% de similaridade. Os
502 padrões de REP-PCR demonstraram 85% de similaridade. Cuppels et al. (2006) também
503 compararam isolados de *X. gardneri* de Ontário, Iugoslávia e Costa Rica, concluindo que
504 tinham padrões de rep-PCR idênticos com os iniciadores BOX, ERIC e REP. Diferentes
505 resultados podem ser obtidos de acordo com os *primers* utilizados, demonstrando a
506 importância do uso das três abordagens REP-, ERIC- e BOX-PCR, na avaliação da
507 diversidade genética (Lópes et al. 2006).

508

509

CONCLUSÃO

510

511 Todos os isolados avaliados apresentaram características bioquímicas de *Xanthomonas*
512 e 12 isolados não apresentaram morfologia das colônias típicas. Apenas 19 isolados foram
513 identificados em nível de espécie, sendo dois Xee, um XV, 14 Xep e dois Xhg. A PCR
514 multiplex não permitiu a distinção entre as espécies na identificação simultânea.

515

516 Os isolados não identificados pela espécie com os *primers* específicos, apresentaram
517 morfologia das colônias atípicas de *Xanthomonas*, mesmo sendo enquadrados no gênero pelos
518 testes bioquímicos. Estudos de sequenciamento da região 16S RNA ribossomal seriam
necessários para maiores elucidações.

519

520 As análises de rep-PCR revelaram alta diversidade genética entre os isolados e uma
521 baixa variabilidade genética entre isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. Uma vez que
522 não houve relação direta na formação dos agrupamentos com as espécies, morfologia das
523 colônias, caracterização bioquímica ou localização geográfica, conclui-se que esses fatores
não foram determinantes na similaridade genética dos isolados.

524

525

REFERÊNCIAS

526

527 Adhikari P, Adhikari T, Timilsina S, Meadows I, Jones JB, Panthee D, Louws F (2019)
528 Phenotypic and genetic diversity of *Xanthomonas perforans* populations from tomato in
529 North Carolina. *Phytopathology* 109:1533-1543 <https://doi.org/10.1094/phyto-01-19-0019-r>

530

531 Aiello D, Scuderi G, Vitale A, Firrao G, Polizzi G, Cirvilleri G (2013) A pith necrosis caused
532 by *Xanthomonas perforans* on tomato plants. *European Journal of Plant Pathology* 137:29-41
533 <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0214-7>

534

535 Araújo ER, Costa JR, Ferreira MASV, Quezado-Duval AM (2017) Widespread distribution of
536 *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. Plant Pathology 66:159-
537 168 <https://doi.org/10.1111/ppa.12543>

538

539 Araújo ER, Ferreira MASV, Quezado-Duval AM (2013) Specific primers for *Xanthomonas*
540 *vesicatoria*, a tomato bacterial spot causal agent. European Journal of Plant Pathology 137:5-
541 9 <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0225-4>

542

543 Araújo ER, Pereira RC, Ferreira MASV, Café-Filho AC, Moita AW, Quezado-Duval AM
544 (2011) Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and
545 competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. Acta Horticulturae 914:39-42
546 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.914.3>

547

548 Araújo ER, Costa JR, Ferreira MA, Quezado-Duval AM (2012) Simultaneous detection and
549 identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot
550 using species-specific primers and multiplex PCR. Journal of Applied Microbiology
551 113:1479-90 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05431.x>

552

553 Bouzar H, Jones JB, Minsavage GV, Stall RE, Scott JW (1994) Proteins unique to
554 phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver
555 staining. Phytopathology 84:39-44 <https://doi.org/10.1094/Phyto-84-39>

556

- 557 Bouzar H, Jones JB, Stall RE, Louws FJ, Schneider M, Rademaker JLW, De Bruijn FJ,
558 Jackson LE (1999) Multiphasic analysis of *Xanthomonads* causing bacterial spot disease on
559 tomato and pepper in the caribbean and central america: evidence for common lineages within
560 and between countries. *Phytopathology* 89:328-335
561 <https://doi.org/10.1094/phyto.1999.89.4.328>
- 562
- 563 Constantin EC, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, Van Malderghem C, De Vos P, Cottyn B
564 (2016) Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv.
565 *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant*
566 *Pathology* 65:792-806 <https://doi.org/10.1111/ppa.12461>
- 567
- 568 Cruz CD (2013) GENES: a software package for analysis in experimental statistics and
569 quantitative genetics. *Acta Scientiarum* 35:271-276
- 570
- 571 Cuppels DA, Louws FJ, Ainsworth T (2006) Development and evaluation of PCR-based
572 diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Disease*
573 90:451-458 <https://doi.org/10.1094/pd-90-0451>
- 574
- 575 Hugh R, Leifson E (1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative
576 metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*
577 66:24-26 <https://doi.org/10.1128/jb.66.1.24-26.1953>
- 578
- 579 Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Minsavage GV, Stall RE, Schaad NW (2005) Bacterial spot -
580 worldwide distribution, importance and review. *Acta horticulturae* 695:27-34
581 <https://doi.org/10.17660/actahortic.2005.695.1>

- 582
- 583 Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW (2004) Reclassification of the
584 Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. Systematic and
585 Applied Microbiology 27:755-762 <https://doi.org/10.1078/0723202042369884>
- 586
- 587 Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*,
588 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology, Saint Paul
589 60:969-976 <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-969>
- 590
- 591 Klement Z, Farkas GL, Lovrekovic L (1964) Hypersensitive reaction induced by
592 phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology 54:474-477 In: Malathrakis NE,
593 Goumas DE (1987) Bacterial soft rot of tomato in plastic greenhouses in Crete. Annals of
594 Applied Biology 111:115-123 <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1987.tb01438.x>
- 595
- 596 Koenraadt H, Van Betteray B, Germain R, Hiddink G, Jones JB, Oosterhof J, Rijlaarsdam A,
597 Roorda P, Wouldt B (2009) Development of specific primers for the molecular detection of
598 bacterial spot of pepper and tomato. Acta Horticulturae, 808:99-102
599 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.808.13>
- 600
- 601 Leela JK, Sharma G (2000) Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*.
602 Bioprocess Engineering, 23:687-689 <https://doi.org/10.1007/s004499900054>
- 603
- 604 Lopes CA, Ávila AC (2005) Doenças do tomateiro. Brasília: Embrapa Hortaliças. 151 p.
605

- 606 López R, Asensio C, Gilbertson RL (2006) Phenotypic and genetic diversity in strains of
607 common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv.
608 *phaseoli* var. *fuscans*) in a secondary center of diversity of the common bean host suggests
609 multiple introduction events. *Phytopathology* 96:1204-1213 <https://doi.org/10.1094/phyto-96-1204>
- 611
- 612 Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, Bruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints of
613 phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with
614 repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2286-2295
615 <https://doi.org/10.1128/aem.60.7.2286-2295.1994>
- 616
- 617 Louws FJ, Rademaker JLW, Bruijn FJ (1999) The three D's of PCR-based genomic analysis
618 of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annual Review of
619 Phytopathology* 7:81-125 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.81>
- 620
- 621 Marcuzzo LL, Becker WF, Fernandes JMC (2009) Alguns aspectos epidemiológicos da
622 mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro na região de Caçador/SC. *Summa
623 Phytopathologica* 5:132-135 <https://doi.org/10.1590/S0100-54052009000200009>
- 624
- 625 Moretti C, Amatulli MT, Buonauro R (2009) PCR-based assay for the detection of
626 *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. *Letters in Applied
627 Microbiology* 49:466-471 <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2009.02690.x>
- 628
- 629 Morinière L, Burlet A, Rosenthal ER, Nesme X, Portier P, Bull CT, Lavire C, Fischer-Le
630 Saux M, Bertolla F (2020) Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot

- 631 of lettuce through a polyphasic approach leads to combine *Xanthomonas hortorum* Vauterin
632 et al. 1995 and *Xanthomonas cynarae* Trébaol 2000 emend. Timilsina et al. 2019. Systematic
633 and Applied Microbiology 43:126087 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126087>
- 634
- 635 Osdaghi E, Taghavi SM, Koebnik R, Lamichhane JR (2018) Multilocus sequence analysis
636 reveals a novel phylogroup of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* causing bacterial
637 spot of tomato in Iran. Plant Pathology 67:1601-1611 <https://doi.org/10.1111/ppa.12864>
- 638
- 639 Özdemir Z (2009) Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of
640 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and
641 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* using pure cultures. Journal of Plant Pathology
642 91:495-497 <https://www.jstor.org/stable/41998650>
- 643
- 644 Pereira RC, Araújo ER, Ferreira MASV, Quezado-Duval AM (2011) Occurrence of
645 *Xanthomonas* species causing bacterial spot in fresh market tomato fields in Brazil. Acta
646 Horticulturae 914:61-64 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.914.8>
- 647
- 648 Quezado-Duval AM, Camargo LEA (2004) Raças de *Xanthomonas* spp. associadas à
649 mancha-bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil. Horticultura Brasileira
650 22:80-86 <https://doi.org/10.1590/S0102-05362004000100016>
- 651
- 652 Quezado-Duval AM, Leite Júnior RP, Lopes CA, Lima MF, Camargo LEA (2005) Diversity
653 of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. Acta
654 Horticulturae 695:101-108 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.11>

- 655
- 656 Regazzi AJ, Cruz CD (2020) Análise multivariada aplicada. Universidade Federal De Viçosa
657 - UFV. Viçosa, MG 408p.
- 658
- 659 Ryu E (1940) A simple method for differentiation between Gram-positive and Gram-negative
660 organisms without staining. Kitazato Archives of Experimental Medicine 17:58-63 In: Suslow
661 TV, Schroth MN, Isaka M (1982) Application of a rapid method for Gram differentiation of
662 plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72:917-918
663 <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-917>
- 664
- 665 Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic
666 bacteria. 3th Ed. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 373p.
- 667
- 668 Schaad NW, Stall RE (1988) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.
669 2th Ed. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 163p.
- 670
- 671 Sokal RR, Michener CD (1958) A statistical methods for evaluating systematic relationships.
672 Kansas University Science Bulletin, 38:1409-1438
- 673
- 674 Stall RE, Beaulieu C, Egel D, Hodge NC, Leite RP, Minsavage GV, Bouzar H, Jones JB,
675 Alvarez AM, Benedict AA (1994) Two genetically diverse groups of strains are included in
676 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. International Journal of Systematic Bacteriology
677 44:47-53 <https://doi.org/10.1099/00207713-44-1-47>
- 678

679 Starr MP, Weiss JE (1943) Grow of phytopathogenic bactéria in a synthetic asparagun
680 medium. *Phytopathology* 334:314-318

681
682 Versalovic J, Koeuth T, Lupski R (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in
683 eubacteria and application to finerpriting of bacterial enomes. *Nucleic Acids Research*,
684 19:6823-6831 <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>

685
686 Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of
687 bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular
688 and Cellular Biology* 5:25-40

CAPÍTULO 2

CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO COM SUSPENSÃO INATIVADA²

² Artigo redigido de acordo com as normas do periódico *Tropical Plant Pathology*.

1 **Controle da mancha bacteriana do tomateiro com suspensão bacteriana inativada**

2

3 **Gislaine Nascimento Vieira de Sá¹, Nilvanira Donizete Tebaldi¹**

4

5 ¹Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal
6 de Uberlândia, Uberlândia, MG CEP 38400-902, Brasil

7 Autor para correspondência: Nilvanira Donizete Tebaldi, e-mail: nilvanira.tebaldi@ufu.br

8 **RESUMO**
9

10 A mancha bacteriana do tomateiro causada por *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* pode
11 causar perdas significativas à cultura. O controle químico da doença não é eficiente, e
12 medidas alternativas de controle devem ser avaliadas. O objetivo do trabalho foi avaliar o uso
13 da suspensão de *X. hortorum* pv. *gardneri* inativada por radiação ultravioleta, esterilização e
14 envelhecimento, em aplicação preventiva e curativa para o controle da mancha bacteriana do
15 tomateiro. As suspensões bacterianas inativadas (SBI) foram obtidas por exposição à radiação
16 de luz ultravioleta (SBI-UV); esterilização em autoclave (SBI-E); envelhecimento em meio de
17 cultura (SBI-MC); e envelhecimento da suspensão em bancada de laboratório (SBI-S). No
18 primeiro ensaio, as plantas foram pulverizadas preventivamente com as SBIs, hidróxido de
19 cobre, acibenzolar-S-metil (ASM) e água (testemunha), e dois dias após foram inoculadas
20 com a suspensão bacteriana patogênica (10^8 e 10^9 UFC/mL). Na aplicação curativa, as plantas
21 foram inoculadas com a suspensão bacteriana patogênica e dois dias após, pulverizadas com
22 os produtos. No segundo ensaio, as plantas foram pulverizadas preventivamente com as SBI-
23 UV (10^8 UFC/mL) e SBI-E (10^8 e 10^9 UFC/mL), hidróxido de cobre, ASM e água. Após dois
24 dias, foram inoculadas com a suspensão bacteriana patogênica (10^7 e 10^8 UFC/mL). A
25 severidade da doença foi avaliada e calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da
26 Doença (AACPD). No primeiro e no segundo ensaio em aplicação preventiva os produtos
27 SBI-UV, SBI-E e ASM reduziram significativamente a severidade da doença. No primeiro
28 ensaio, na aplicação curativa não houve diferença significativa entre os produtos. As SBI-UV
29 e SBI-E foram eficazes em aplicação preventiva para o controle da mancha bacteriana do
30 tomateiro. A SBI consiste em uma medida promissora para o controle de doenças plantas.

31 **Palavras-chave** Controle biológico Indução de resistência *Solanum lycopersicum*
32 *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*

33

ABSTRACT

34

35 Bacterial spot caused by *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* may produce significant losses
36 in tomato crops. Chemical control of the disease is not eficiente, and alternative control
37 measures should be assessed. The objective of the work was to evaluate the use of *X.*
38 *hortorum* pv. *gardneri* suspension inactivated by ultraviolet radiation, sterilization, and aging,
39 in preventive and curative applications to control tomato bacterial spot. The inactivated
40 bacterial suspensions (IBS) were obtained by exposure to ultraviolet radiation (IBS-UV);
41 autoclave sterilization (IBS-E); aging in culture medium (IBS-MC); and aging of the
42 suspension on a laboratory bench (IBS-S). In the first assay, plants were preventively sprayed
43 with the IBSs, copper hydroxide, acibenzolar-S-methyl (ASM) and water (control), and two
44 days later were inoculated with the pathogenic bacterial suspension (10^8 and 10^9 CFU/mL). In
45 the curative application, the plants were inoculated with the pathogenic bacterial suspension
46 and two days later, sprayed with the products. In the second assay, plants were sprayed
47 preventively with IBS-UV (10^8 CFU/mL) and IBS-E (10^8 and 10^9 CFU/mL), copper
48 hydroxide, ASM and water. After two days, were inoculated with the pathogenic bacterial
49 suspension (10^7 and 10^8 CFU/mL). Disease severity was assessed and the Area Under the
50 Disease Progress Curve (AUDPC) was calculated. In the first and second assay, in preventive
51 application, IBS-UV, IBS-E and ASM significantly reduced disease severity. In the first
52 assay, in the curative application there was no significant difference between the products.
53 IBS-UV and IBS-E effectively controlled tomato bacterial spot in the preventive application.
54 IBS is a promising measure for the control of plant diseases.

55 **Keywords** Biological control Induced resistance *Solanum lycopersicum* *Xanthomonas*
56 *hortorum* pv. *gardneri*

57

INTRODUÇÃO

58

59 A mancha-bacteriana do tomateiro causada por espécies do gênero *Xanthomonas*: *X.*
60 *euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Constantin et al. 2016), *X.*
61 *hortorum* pv. *gardneri* (Morinière et al. 2020) e *X. vesicatoria* (Jones et al. 2004) pode
62 provocar perdas significativas na produção da cultura (Quezado-Duval e Lopes 2010). A
63 doença é favorecida por temperaturas que variam de 20 °C a 30 °C, elevada umidade (>90%),
64 chuvas e ventos (Lopes e Ávila 2005; Inoue-Nagata et al. 2016).

65 Os métodos utilizados para o controle da doença não são eficazes, devido à limitação
66 de produtos registrados e eficiência variável, além do surgimento de isolados resistentes a
67 produtos à base de cobre (Quezado-Duval et al. 2003; Mirik et al. 2007; Potnis et al. 2015).
68 Portanto, novas medidas de controle de doenças devem ser avaliadas, como o uso de produtos
69 que induzem a resistência e o emprego de agentes biológicos (Andrade et al. 2013; Faillace et
70 al. 2019).

71 Os agentes indutores de resistência podem ser bióticos ou abióticos, como certos
72 compostos químicos, agentes não patogênicos, formas avirulentas ou raças incompatíveis de
73 patógenos (Van Loon 1997; Van Loon et al. 1998). O uso de raças e agentes não patogênicos,
74 patógenos atenuados ou mortos pelo calor podem conferir uma proteção contra o ataque
75 subsequente de cepas virulentas do mesmo ou de microrganismos relacionados (Chester 1933;
76 Kué 1972). Tubérculos de batata quando inoculados com uma raça avirulenta de
77 *Phytophthora infestans* e posteriormente inoculados com uma raça virulenta do mesmo
78 patógeno não apresentavam sintomas da doença, a raça avirulenta aparentemente protegia os
79 tecidos contra a consequente infecção pela raça virulenta (Müller e Börger 1940). Cultivares
80 de pepino suscetíveis quando inoculados previamente com *Colletotrichum lagenarium* em
81 baixas concentrações apresentaram proteção à doença (Kuć et al. 1975). Também foi

82 constatada a indução de resistência em plantas de arroz quando inoculadas com um isolado
83 avirulento de *Magnaporthe oryzae* e apresentaram redução significativa da severidade de
84 brusone, quando inoculadas com o isolado virulento (Filippi et al. 2007).

85 No processo evolutivo as plantas desenvolveram a capacidade de reconhecimento de
86 inúmeros compostos derivados da superfície microbiana, como glicoproteínas, peptídeos,
87 carboidratos e lipídeos, que induzem respostas de defesa em plantas hospedeiras e não
88 hospedeiras (Nürnberger e Brunner 2002; Walters et al. 2005). Os lipopolissacarídeos,
89 componentes indispensáveis da parede celular de bactérias Gram-negativas podem
90 desencadear respostas relacionadas a defesa das plantas (Dow et al. 2000; Meyer et al. 2001;
91 Newman et al. 2007; Neyen e Lemaitre 2016). Exopolissacarídeos extraídos de células
92 bacterianas de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* e de *Xanthomonas campestris* pv.
93 *campestris* quando aplicados em folhas de café foram capazes de induzir proteção local e
94 sistêmica a *Hemileia vastatrix*. As plantas tratadas com diferentes concentrações de uma
95 preparação comercialmente disponível de goma xantana, também apresentaram proteção
96 (Guzzo et al. 1993), assim como plantas de cevada contra *Bipolaris sorokiniana*, sendo
97 observado um aumento na concentração de proteínas e da atividade da enzima β -1,3-
98 glucanase, quando comparadas ao extrato de plantas sadias (Castro e Bach 2004).

99 É urgente e indispensável à busca e desenvolvimento de um método de controle
100 inovador, que seja eficiente e sustentável. A suspensão bacteriana inativada apresenta
101 potencial de uso no controle de doenças bacterianas de plantas, contribuindo na redução do
102 uso de produtos químicos.

103 Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar o uso da suspensão de *Xanthomonas*
104 *hortorum* pv. *gardneri* inativada por radiação UV, por esterilização e por envelhecimento, em
105 aplicação preventiva e curativa para o controle da mancha bacteriana do tomateiro. A espécie
106 foi utilizada como modelo do patossistema.

107

108 **MATERIAL E MÉTODOS**

109

110 Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e em casa de
111 vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), da Universidade Federal de Uberlândia
112 (UFU), Campus Umuarama, no período de fevereiro de 2020 a abril de 2021.

113

114 **Obtenção do inóculo patogênico**115 O isolado patogênico UFU A35 de *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* pertencente a
116 coleção de trabalho do LABAC, ICIAG/UFU foi cultivado em meio de cultura 523 (Kado e
117 Heskett 1970), a 28 °C por 48 h. A suspensão bacteriana foi preparada em água filtrada
118 esterilizada e ajustada em espectrofotômetro a $DO_{550}=0,5$ (10^9 UFC/mL), que foi utilizada
119 como suspensão bacteriana patogênica e como suspensão bacteriana inativada.

120

121 **Obtenção das suspensões bacterianas inativadas**122 Para a obtenção da suspensão bacteriana inativada (SBI) foram utilizados os seguintes
123 procedimentos: a) SBI-UV: a suspensão bacteriana foi exposta a radiação de luz ultravioleta
124 (UV) por 5 horas, em fluxo laminar; b) SBI-E: a suspensão bacteriana foi esterilizada em
125 autoclave a 120 °C por 20 minutos; c) SBI-MC: a bactéria foi cultivada em meio de cultura
126 523, em placa de Petri (8 cm de diâmetro) a 28 °C por 8 meses, para o envelhecimento,
127 posteriormente foi preparada a suspensão bacteriana em água filtrada; d) SBI-S: a suspensão
128 bacteriana foi preparada em água filtrada em erlenmeyers, vedados e envelhecida em bancada
129 de laboratório por 9 meses.130 Para o primeiro ensaio foram utilizadas as diferentes SBI na concentração de 10^8
131 UFC/mL e para o segundo ensaio as concentrações de 10^8 UFC/mL e 10^9 UFC/mL. Para

132 confirmar a morte das células bacterianas, as SBI foram cultivadas em meio de cultura 523 a
133 28 °C, por 48 h.

134

135 **Primeiro ensaio em casa de vegetação: aplicações preventiva e curativa da suspensão**
136 **bacteriana inativada**

137 Plantas de tomate cultivar Santa Cruz Kada foram cultivadas em vasos com
138 capacidade de 500 mL, contendo substrato composto de solo, areia, húmus e vermiculita
139 (4:1:1:1). Após 28 dias da semeadura, as plantas (três a quatro folhas), na aplicação
140 preventiva foram pulverizadas até o ponto de escorrimento com as SBIs, hidróxido de cobre
141 (2 g/L), acibenzolar-S-metil (ASM) (0,1 g/L) e água (testemunha). Após dois dias, as plantas
142 foram inoculadas com a suspensão bacteriana patogênica nas concentrações 10^8 e 10^9
143 UFC/mL. Na aplicação curativa, as plantas foram inoculadas com a suspensões bacterianas
144 patogênicas e dois dias após foram pulverizadas com os produtos. As plantas foram mantidas
145 em câmara úmida 24 h antes e após a inoculação.

146 O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 x 2 x 7, composto de duas
147 aplicações (preventiva e curativa), duas concentrações suspensões bacterianas patogênicas
148 (10^8 e 10^9 UFC/mL) e sete produtos (4 SBIs, hidróxido de cobre, ASM e água), com quatro
149 repetições, sendo considerado como unidade experimental um vaso, contendo duas plantas.

150

151 **Segundo ensaio em casa de vegetação: aplicação preventiva da suspensão bacteriana**
152 **inativada**

153 As plantas de tomate foram cultivadas como descrito anteriormente. Na aplicação
154 preventiva as plantas foram pulverizadas até o ponto de escorrimento com as SBI-UV (10^8
155 UFC/mL) e SBI-E (nas concentrações 10^8 e 10^9 UFC/mL), hidróxido de cobre (2 g/L),
156 acibenzolar-S-metil (ASM) (0,1 g/L) e água. Após dois dias, as plantas foram inoculadas com

157 a suspensão bacteriana patogênica nas concentrações 10^7 e 10^8 UFC/mL. As plantas foram
158 mantidas em câmara úmida 24 h antes e após a inoculação.

159 O experimento foi conduzido em esquema fatorial 6 x 2, composto de seis produtos
160 (três SBIs, hidróxido de cobre, ASM e água), duas concentrações suspensões bacterianas
161 patogênicas (10^7 e 10^8 UFC/mL), com quatro repetições, sendo considerado como unidade
162 experimental um vaso contendo duas plantas.

163

164 **Avaliação da severidade**

165 A severidade da doença foi avaliada empregando-se a escala diagramática (Mello et al.
166 1997), aos 6, 9, 12 e 15 dias após a inoculação no primeiro ensaio e aos 6, 9, 12, 15 e 18 dias
167 após a inoculação no segundo ensaio. A área abaixo da curva de progresso da doença
168 (AACPD) foi calculada pela fórmula: AACPD = $\sum((Y_i + Y_{i+1})/2)(t_{i+1} - t_i)$, onde: Y representa
169 a intensidade da doença; t o tempo (intervalo entre as avaliações, em dias) e i representa o
170 número de avaliações no tempo (Campbell e Madden 1990).

171 Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e testadas as pressuposições
172 de normalidade e homogeneidade. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a
173 5% de significância, utilizando o programa computacional R (2021).

174

175 **RESULTADOS**

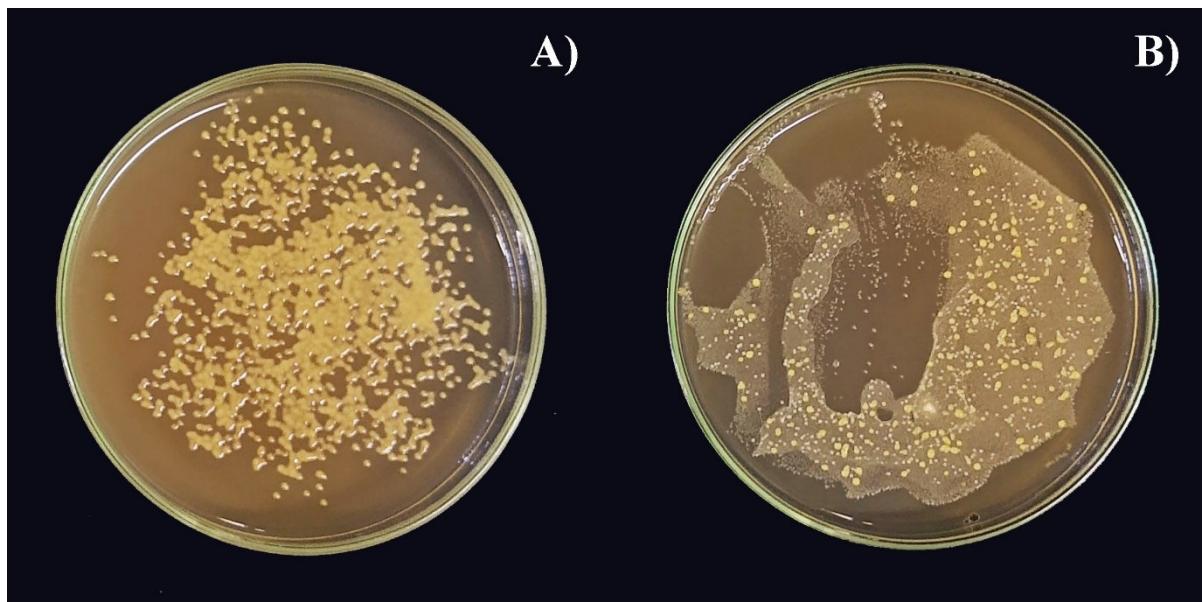
176

177 **Primeiro ensaio**

178 No primeiro ensaio, a morte da bactéria da SBI-UV e da SBI-E foi confirmada pelo
179 cultivo em meio de cultura 523, onde não foi observado o crescimento bacteriano. No entanto,
180 para a SBI-MC envelhecida em meio de cultura em placa de Petri, por 8 meses e da SBI-S
181 suspensão envelhecida em bancada do laboratório por 9 meses, foi observado o crescimento

182 bacteriano, ou seja, este período de envelhecimento não foi suficiente para morte total da
183 bactéria. A SBI-S por 9 meses, acondicionada em Erlenmeyer vedado apresentou ainda o
184 crescimento de outros microrganismos não identificados (Figura 1).

185



186 **Figura 1.** Crescimento de *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* da suspensão bacteriana
187 envelhecida em meio de cultura por 8 meses (A) e envelhecida em bancada de laboratório por
188 9 meses (B), após 72 h de incubação.

189

190 Para a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) da mancha
191 bacteriana do tomateiro (Tabela 1), na aplicação preventiva da SBI-UV (121,5), SBI-E
192 (129,9) e o acibenzolar-S-metil (ASM) (104,6) reduziram a severidade da doença, diferindo
193 significativamente dos demais produtos. O uso da SBI-MC e da SBI-S não diferiram do
194 hidróxido de cobre e da água (testemunha).

195

196 **Tabela 1.** Área abaixo da curva de progresso da mancha bacteriana do tomateiro, em
197 aplicação preventiva e curativa das suspensões bacterianas inativadas (SBI-UV, -E, -MC, -S),

198 com duas concentrações de inóculo patogênico (*X. hortorum* pv. *gardneri*) (10^8 e 10^9
 199 UFC/mL).

Produtos	Preventiva		Média	Curativa		Média
	10^8	10^9		10^8	10^9	
SBI-UV ¹	93,0	150,0	121,5 aA	160,9	178,5	169,7 aA
SBI-E ²	130,9	129,0	129,9 aA	146,3	253,9	200,1 aA
SBI-MC ³	177,4	262,1	219,8 bA	145,9	219,4	182,6 aA
SBI-S ⁴	184,9	195,4	190,1 bA	169,5	259,1	214,3 aA
Acibenzolar-S-Metil	60,4	148,9	104,6 aA	151,1	288,0	219,6 aB
Hidróxido de cobre	153,4	151,1	152,3 bA	164,3	174,4	169,3 aA
Água	181,5	245,5	213,4 bA	121,1	186,4	153,8 aA
Média	140,2A	183,2B		151,3A	222,8B	
CV (%)	43,57					

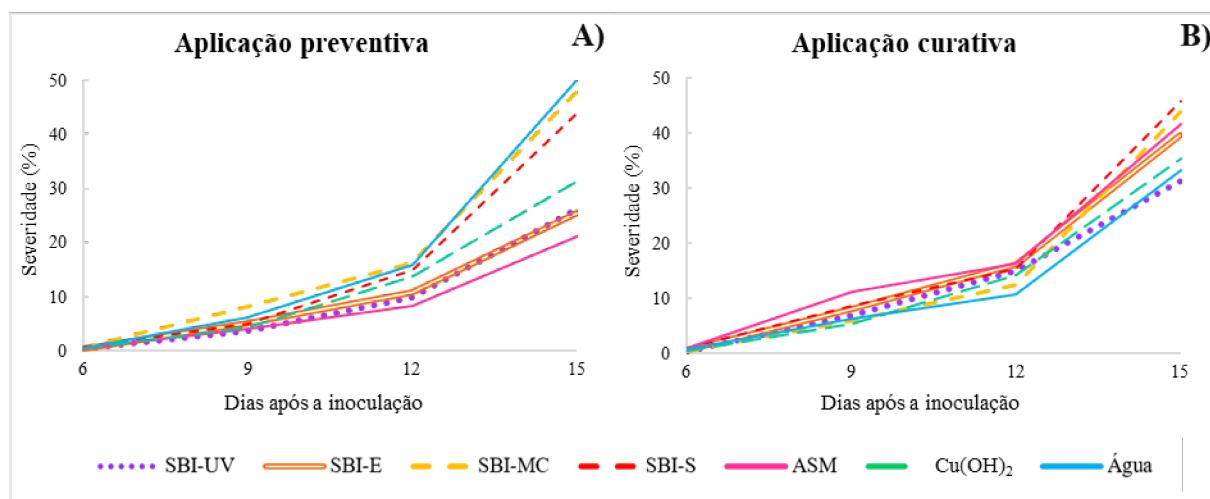
200 Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre
 201 si pelo teste de Scott-Knott ($P<0,05$). Para os testes de normalidade e homogeneidade, os
 202 resíduos apresentaram distribuição normal e as variâncias foram homogêneas ($P>0,05$). ¹UV:
 203 Luz ultravioleta, ²E: Esterilização, ³MC: Meio de cultura, ⁴S: Suspensão.

204
 205 Tanto na aplicação preventiva, como na aplicação curativa (Tabela 1), quanto maior a
 206 concentração de inóculo aplicada, maior foi a AACPD. A inoculação das plantas com a
 207 suspensão bacteriana patogênica na concentração de 10^9 UFC/mL (183,2 e 222,8)
 208 apresentaram maior quantidade de doença, diferindo estatisticamente da concentração 10^8
 209 UFC/mL (140,2 e 151,3). Na aplicação curativa dos produtos ou aplicação pós-inoculação
 210 com a bactéria patogênica não houve diferença significativa na severidade da doença entre os
 211 produtos usados, ou seja, a aplicação curativa dos produtos não foi suficiente para controlar a
 212 doença. Somente o ASM diferiu significativamente na aplicação preventiva (104,6) da
 213 aplicação curativa (219,6), apresentando menor AACPD da mancha bacteriana.

214

215 Na aplicação preventiva, aos 12 dias após a inoculação houve um progresso acentuado
 216 da mancha bacteriana do tomateiro, principalmente para a testemunha (água). O ASM, a SBI-
 217 E, SBI-UV e o hidróxido de cobre apresentaram a menor curva de progresso da doença,
 218 reduzindo a severidade da doença (Figura 2A). No entanto, na aplicação curativa as SBIs,
 219 assim como o ASM e o hidróxido de cobre não reduziram a severidade da mancha bacteriana
 220 do tomateiro (Figura 2B).

221



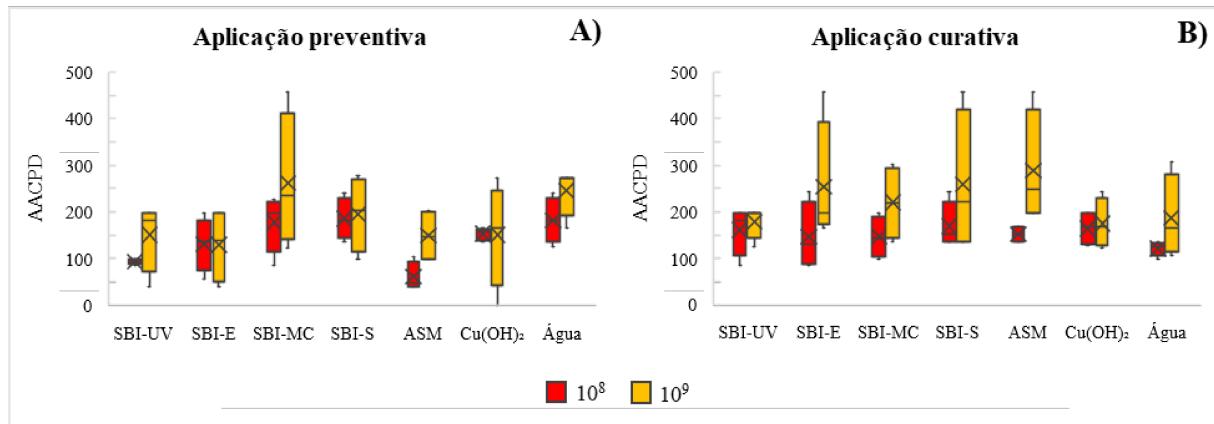
222 **Figura 2.** Curva de progresso da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, em aplicação
 223 preventiva (A) e curativa (B), com diferentes suspensões bacteriana inativadas (SBI). UV:
 224 Luz ultravioleta; E: Esterilização; MC: Meio de cultura; S: Suspensão; AMS: Acibenzolar-S-
 225 metil; Cu(OH)₂: Hidróxido de cobre.

226

227 A análise gráfica por boxplot representa a dispersão dos dados analisados. Na
 228 aplicação preventiva, as plantas quando pulverizadas com SBI-UV e hidróxido de cobre, e
 229 inoculadas com a suspensão bacteriana patogênica 10^8 UFC/mL apresentaram a menor
 230 variação de AACPD (Figura 3A). Na aplicação curativa, na concentração de inóculo a 10^8
 231 UFC/mL, o ASM e a água (testemunha) apresentaram a menor variação de AACPD (Figura

232 3B). O uso da suspensão bacteriana patogênica a 10^8 UFC/mL apresentou menor AACPD, do
 233 que a suspensão bacteriana a 10^9 UFC/mL.

234



235 **Figura 3.** Boxplot da área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha bacteriana
 236 do tomateiro, em aplicação preventiva (A) e curativa (B), de diferentes suspensões bacterianas
 237 inativadas (SBI) e diferentes concentrações de inóculo patogênico (*X. hortorum* pv. *gardneri*)
 238 (10^8 e 10^9 UFC/mL). UV: Luz ultravioleta; E: Esterilização; MC: Meio de cultura; S:
 239 Suspensão; AMS: Acibenzolar-S-metil; Cu(OH)₂: Hidróxido de cobre.

240

241 A partir dos resultados obtidos no primeiro ensaio, as concentrações de inóculo
 242 inativado e patogênico foram ajustadas. As SBI-MC e SBI-S por apresentarem o crescimento
 243 bacteriano durante o período de armazenamento, não foram utilizados no segundo ensaio.

244

245 **Segundo ensaio**

246 Para AACPD da mancha bacteriana do tomateiro (Tabela 2), todos os produtos
 247 utilizados com a SBI-UV, SBI-E, ASM e o hidróxido de cobre diferiram significativamente
 248 da água (testemunha), reduzindo a severidade da doença. Todos os produtos reduziram a
 249 curva de progresso da doença quando comparado à testemunha (água) (Figura 4). As SBIs

250 apresentaram controle semelhante ao ASM e o hidróxido de cobre. Não houve diferença
 251 significativa entre as concentrações do inóculo patogênico a 10^7 e 10^8 UFC/mL. A quantidade
 252 de doença foi semelhante para as duas concentrações de inóculo patogênico usados, 83,1 e
 253 95,6, respectivamente. As SBI-UV a 10^8 UFC/mL e as SBI-E a 10^8 e 10^9 UFC/mL reduziram
 254 a severidade da mancha bacteriana do tomateiro, com controle semelhante ao ASM e ao
 255 hidróxido de cobre, em uma única pulverização.

256

257 **Tabela 2.** Área abaixo da curva de progresso da mancha bacteriana do tomateiro, em
 258 aplicação preventiva das suspensões bacterianas inativadas (SBI-UV 10^8 , -E 10^8 , -E 10^9), com
 259 duas concentrações do inóculo patogênico (*X. hortorum* pv. *gardneri*) (10^7 e 10^8 UFC/mL).

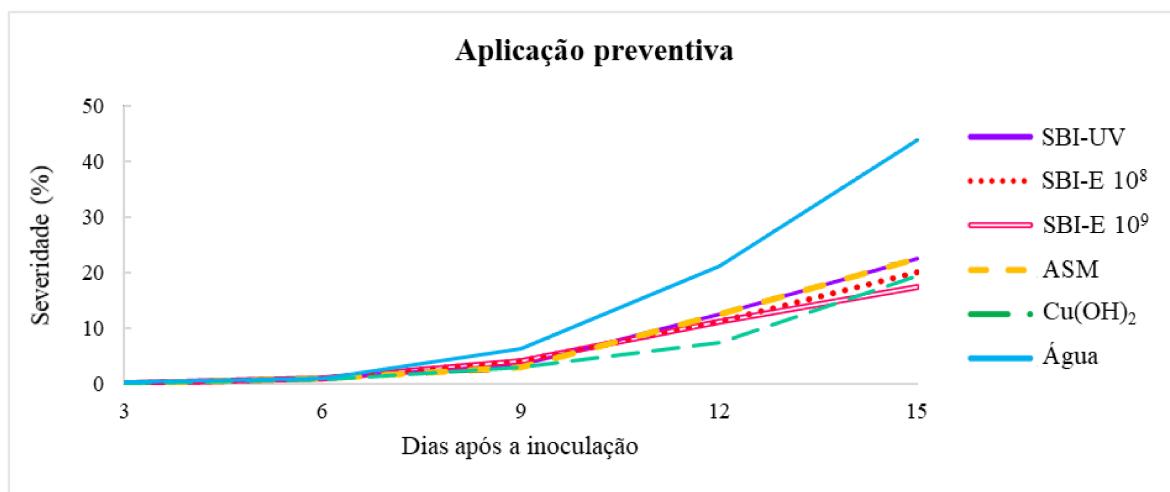
Produtos	Concentração do inóculo patogênico (UFC/mL)		Média
	10^7	10^8	
SBI-UV ¹ (10^8)	86,3	83,3	84,8 a
SBI-E ² (10^8)	75,0	82,5	78,8 a
SBI-E (10^9)	72,0	78,0	75,0 a
Acibenzolar-S-Metil	79,5	87,0	62,8 a
Hidróxido de cobre	51,8	73,9	83,3 a
Água	134,3	168,8	151,5 b
Média	83,1	95,6	
CV (%)	40,01		

260 Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre
 261 si pelo teste de Scott-knott ($P<0,05$). Para os testes de normalidade e homogeneidade, os
 262 resíduos apresentaram distribuição normal e as variâncias foram homogêneas ($P>0,05$). ¹UV:
 263 Luz ultravioleta, ²E: Esterilização.

264

265 Para a curva de progresso da mancha bacteriana do tomateiro houve um aumento na
 266 severidade da doença, aos 9 dias após a inoculação, para as plantas pulverizadas com água

267 (testemunha) (Figura 4). O hidróxido de cobre, o ASM, as SBI-E a 10^8 e 10^9 UFC/mL e SBI-
 268 UV apresentaram a menor curva de progresso da doença, reduzindo a severidade da doença.
 269



270 **Figura 4.** Curva de progresso da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, em aplicação
 271 preventiva, com diferentes suspensões bacterianas inativadas (SBI). UV: Luz ultravioleta na
 272 concentração de 10^8 UFC/mL; E 10^8 : Esterilização na concentração de 10^8 UFC/mL; E 10^9 :
 273 Esterilização na concentração de 10^9 UFC/mL; AMS: Acibenzolar-S-metil; Cu(OH)₂:
 274 Hidróxido de cobre.

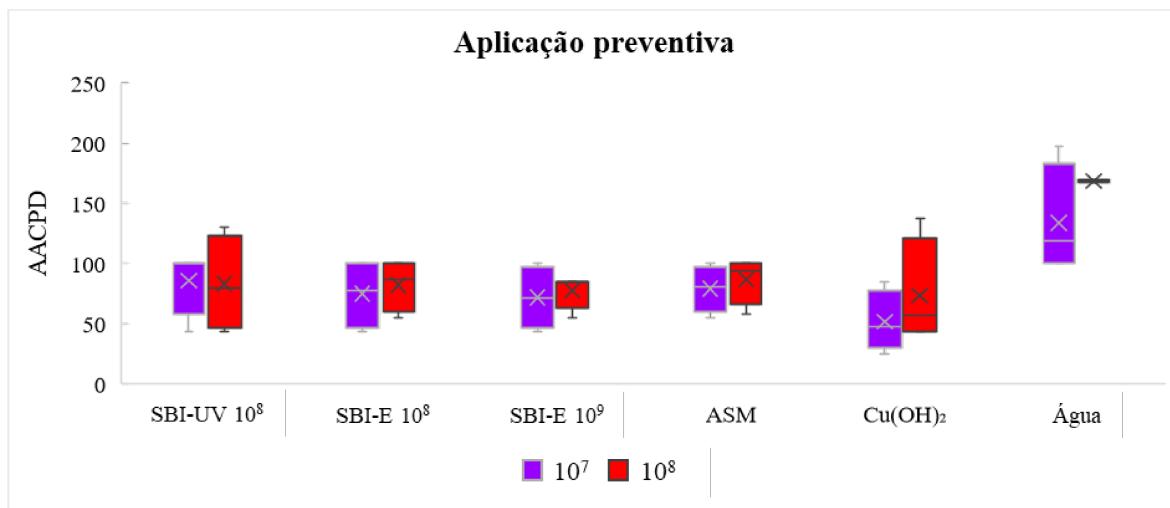
275

276 Na análise gráfica por boxplot (Figura 5) a menor variação de AACPD foi apresentada
 277 pela SBI-E a 10^9 UFC/mL e a água (testemunha). Os tratamentos realizados na concentração
 278 de inóculo patogênico a 10^7 UFC/mL demonstraram menores AACPD, do que a 10^8 UFC/mL.

279

280

281



282 **Figura 5.** Boxplot da área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha bacteriana
 283 do tomateiro, em aplicação preventiva, de diferentes suspensões bacterianas inativadas (SBI)
 284 e diferentes concentrações de inóculo patogênico (*X. hortorum* pv. *gardneri*) (10^7 e 10^8
 285 UFC/mL). UV: Luz ultravioleta na concentração de 10^8 UFC/mL; E 10^8 : Esterilização na
 286 concentração de 10^8 UFC/mL; E 10^9 : Esterilização na concentração de 10^9 UFC/mL; AMS:
 287 Acibenzolar-S-metil; Cu(OH)₂: Hidróxido de cobre.

288

289

DISCUSSÃO

290

291 Este estudo mostrou que a bactéria morta pelo calor pode conferir uma proteção a
 292 planta contra ataques subsequentes do microrganismo virulento. A SBI-UV apresentou
 293 resultados semelhantes à SBI-E, com as seguintes desvantagens: tempo de preparo (5 h) e
 294 desgaste da lâmpada UV utilizada na inativação da suspensão. O uso da SBI-E pode ser mais
 295 vantajoso, pela praticidade e rapidez no preparo e obtenção do produto.

296

297

298 A concentração do inóculo patogênico foi reduzida para o segundo ensaio, devido a
 severidade da doença observada nas plantas com a suspensão na concentração a 10^9 UFC/mL.

299 concentrações que mais se aproximam das condições de campo. O aumento da severidade da
300 doença com o uso da SBI-MC e a SBI-S foi devido ao tempo de envelhecimento não ter sido
301 suficiente para a morte total da bactéria.

302 O ASM é um produto químico sintético que ativa o mecanismo de defesa da planta
303 utilizado no controle de diversas doenças bacterianas (Walters et al. 2005), responsável por
304 estimular a produção das enzimas peroxidase e oxidase de polifenóis, que atuam no controle
305 da mancha bacteriana do tomateiro (Cavalcanti et al. 2006). O produto diferiu
306 significativamente na aplicação preventiva da aplicação curativa devido a planta necessitar de
307 um tempo para o reconhecimento do agente indutor e a ativação dos mecanismos de defesa, a
308 fim de evitar a colonização do patógeno. Já na aplicação curativa, as plantas foram inoculadas
309 inicialmente, favorecendo a infecção/colonização da bactéria no tecido vegetal e
310 consequentemente o desenvolvimento da doença.

311 A hipótese do uso de mais de uma pulverização em aplicação preventiva das SBIs em
312 diferentes intervalos poderia melhorar o controle da doença. A aplicação preventiva das SBI
313 pode induzir o mecanismo de defesa da planta, na ativação de enzimas e o desenvolvimento
314 da resistência sistêmica, protegendo a planta contra o patógeno. No entanto, ensaios futuros
315 deverão ser realizados para avaliar as enzimas relacionadas ao mecanismo de defesa da planta
316 e a resistência sistêmica adquirida.

317 Lovrekovich e Farkas (1965) demonstraram que o pré-tratamento das folhas de tabaco
318 com bactérias mortas pelo calor, através da fervura, induziu proteção contra a infecção por
319 *Pseudomonas tabaci*. Também foi observada uma redução da severidade de podridão mole
320 causada por *Pectobacterium atrosepticum* em folhas destacadas de batata, quando pré tratadas
321 com uma suspensão autoclavada de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Faillace et al. 2019).

322 No presente trabalho foi constatado um menor AACPD ou menor severidade da
323 doença com a utilização da SBI-E na concentração de 10^9 UFC/mL, evidenciando que quanto

324 maior o número de células bacterianas inativadas concedidas à planta, maior foi a proteção.
325 Do mesmo modo, Filippi et al. (2007) constataram a indução de resistência em plantas de
326 arroz a *Magnaporthe oryzae*, utilizando um isolado avirulento da mesma espécie como agente
327 de indução. As plantas apresentaram uma redução significativa da severidade de brusone do
328 arroz. Também foi observado um gradiente de indução, ou seja, quanto maior a concentração
329 do agente indutor aplicado, menor foi a área foliar afetada pela doença.

330 O uso SBI-E a 10^8 e 10^9 UFC/mL teve como objetivo avaliar se uma concentração
331 mais elevada da SBI acarretaria em uma maior redução da severidade da doença e também a
332 viabilização de produção da SBI-E, para posterior diluição e uso. As SBI-E a 10^8 e 10^9
333 UFC/mL também não mostrou efeito tóxico às plantas de tomate.

334 As doenças bacterianas são de difícil controle, principalmente se já estiverem
335 presentes no campo, e medidas preventivas são consideradas mais efetivas para evitar a
336 infecção inicial ou o controle do patógeno. O uso das SBI-UV e SBI-E foram eficientes e
337 reduziram a curva de progresso da doença, controlando a mancha bacteriana do tomateiro,
338 podendo ser recomendadas para o manejo da doença, reduzindo o uso de agroquímicos e o
339 impacto ambiental.

340 Até o momento não há uma metodologia semelhante descrita na literatura, de fácil
341 preparo e de baixo custo, apresentando-se como uma tecnologia inovadora no controle de
342 doenças bacterianas de plantas de importância agrícola, onde a própria suspensão bacteriana
343 inativada pode controlar a própria doença, semelhante as vacinas utilizadas no controle de
344 doenças infectocontagiosas.

345 Esse método inovador foi depositado como “Patente de invenção” em 20 de julho de
346 2021 no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial), com número de registro: BR 10
347 2021 014300 2 (Anexo A) (Tebaldi et al. 2021).

348 Este é o primeiro estudo do uso de SBI no controle da mancha bacteriana do
349 tomateiro. Outros ensaios deverão ser conduzidos para avaliar a sua eficácia no controle de
350 doenças bacterianas de plantas. As SBI apresentam grande potencial para o manejo de da
351 mancha bacteriana do tomateiro.

352

353 CONCLUSÃO

354

355 Conclui-se que as SBI-UV e SBI-E foram eficazes em aplicação preventiva para o
356 controle da mancha-bacteriana do tomateiro. No entanto, é indispensável o desenvolvimento
357 de estudos futuros que identifiquem as enzimas relacionadas ao mecanismo de defesa das
358 plantas, os melhores momentos e intervalos de aplicação e a eficácia do controle no campo.
359 Com o crescente estímulo em busca de novas alternativas de controle de doenças, inovações
360 são essenciais, como o uso SBI no controle da doença, sendo uma forma de controle
361 sustentável.

362

363 REFERÊNCIAS

364

365 Andrade CCL, Resende RS, Rodrigues FA, Silveira PR, Rios JA, Oliveira JR, Mariano RLR
366 (2013) Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de
367 enzimas de defesa. Tropical Plant Pathology 38:28-34 <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013000100004>

369

370 Campbell CL, Madden LV (1990) Introduction to plant disease epidemiology. New York:
371 John Wiley, 532 p.

372

- 373 Castro OL, Bach EE (2004) Increased production of β -1,3 glucanase and proteins in *Bipolaris*
374 *sorokiniana* pathosystem treated using commercial xanthan gum. Plant Physiology and
375 Biochemistry 42:165-169 <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.11.006>
- 376
- 377 Cavalcanti FR, Resende MLV, Zacaroni AB; Ribeiro Júnior PM, Costa JCB, Souza RM
378 (2006) Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra
379 a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). Fitopatologia Brasileira 31:372-380
380 <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000400007>
- 381
- 382 Chester KS (1933) The problem of acquired physiological immunity in plants. The Quarterly
383 Review of Biology 8:275-324 <https://doi.org/10.1086/394440>
- 384
- 385 Dow M, Newman MA, Von Roepenack E (2000) The induction and modulation of plant
386 defense responses by bacterial lipopolysaccharides. Annual Review of Phytopathology
387 38:241-261 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.241>
- 388
- 389 Faillace GR, Santarém ER, Astarita LV (2019) Extract of *Xanthomonas axonopodis* induces
390 resistance in *Solanum tuberosum* against *Pectobacterium atrosepticum*. Biological Control
391 134:53-62 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.03.012>
- 392
- 393 Filippi MCC, Silva GB, Prabhu AS (2007) Indução de resistência à brusone em folhas de
394 arroz por isolado avirulento de *Magnaporthe oryzae*. Fitopatologia brasileira 32:387-392
395 <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000500003>
- 396

- 397 Guzzo SD, Bach EE, Martins EF, Moraes WC (1993) Crude exopolysaccharides (EPS) from
398 *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and
399 commercial xanthan gum as inducers of protection in coffee plants against *Hemileia vastatrix*.
400 Journal of Phytopathology 139:119-128 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1993.tb01408.x>
401
- 402 Inoue-Nagata AK, Lopes CA, Reis A, Pereira RB, Quezado-Duval AM, Pinheiro JB, Lima
403 MF (2016) Doenças do tomateiro. In Amorim L, Bergamin Filho A, Rezende JAM, Camargo
404 LEA (Eds) (2016) Manual de fitopatologia. Vol. 2 Doenças das plantas cultivadas, 5th Ed.
405 Agronômica Ceres, São Paulo. pp. 697-723
406
- 407 Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW (2004) Reclassification of the
408 Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. Systematic and
409 Applied Microbiology 27:755-762 <https://doi.org/10.1078/0723202042369884>
410
- 411 Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*,
412 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976
413 <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-969>
414
- 415 Kuć J, Shockley G, Kearney K (1975) Protection of cucumber against *Colletotrichum*
416 *lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. Physiological Plant Pathology 7:195-199
417 [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(75\)90010-7](https://doi.org/10.1016/0048-4059(75)90010-7)
418
- 419 Kué J (1972) Phytoalexins. Annual Review of Phytopathology 10:207-232
420 <https://doi.org/10.1146/annurev.py.10.090172.001231>
421

- 422 Lopes CA, Ávila AC (2005) Doenças do tomateiro. Brasília: Embrapa Hortaliças. 151 p.
- 423
- 424 Lovrekovich L, Farkas GL (1965) Induced protection against wildfire disease in tobacco
- 425 leaves treated with heat-killed bacteria. *Nature* 205:823-824 <https://doi.org/10.1038/205823a0>
- 426
- 427 Mello SC, Takatsu A, Lopes CA (1997) Escala diagramática para avaliação da mancha-
- 428 bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 22:447-448
- 429
- 430 Meyer A, Pühler A, Niehaus K (2001) The lipopolysaccharides of the phytopathogen
- 431 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of
- 432 *Nicotiana tabacum*. *Planta* 213:214-222 <https://doi.org/10.1007/s004250000493>
- 433
- 434 Mirik M, Aysan Y, Cinar O (2007) Copper resistance strains of *Xanthomonas axonopodis* pv.
- 435 *vesicatoria* (Dodge) Dye in the eastern Mediterranean region of Turkey. *Journal of Plant*
- 436 *Pathology* 89: 153-154 <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v89i1.737>
- 437
- 438 Müller KO, Börger H (1940) Experimentelle untersuchugen über die *Phytophthora* - resistenz
- 439 der kartoffel. *Arbeiten aus der Biologischen Reichsanstalt, Land-und Forstwirtschaft* 23:189-
- 440 231
- 441
- 442 Newman MA, Dow JM, Molinaro A, Parrilli M (2007) Invited review: Priming, induction and
- 443 modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *Journal of Endotoxin*
- 444 *Research* 13:69-84 <https://doi.org/10.1177/0968051907079399>
- 445

- 446 Neyen C, Lemaitre B (2016) Sensing Gram-negative bacteria: a phylogenetic perspective.
447 Current Opinion in Immunology 38:8-17 <https://doi.org/10.1016/j.co.2015.10.007>
- 448
- 449 Nürnberg T, Brunner F (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels
450 between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns.
451 Current Opinion in Plant Biology 5:318-324 [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00265-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00265-0)
- 452
- 453 Potnis N, Timilsina S, Strayer A, Shantharaj D, Barak JD, Paret ML, Vallad GE, Jones JB
454 (2015) Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety
455 of virulence factors posing a worldwide challenge. Molecular Plant Pathology 16: 907-920
456 <https://doi.org/10.1111/mpp.12244>
- 457
- 458 Quezado-Duval AM, Gazzoto Filho A, Leite Júnior RP, Camarg LEA (2003) Sensibilidade a
459 cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana
460 do tomate para processamento industrial. Horticultura Brasileira 21:670-675
461 <https://doi.org/10.1590/S0102-05362003000400020>
- 462
- 463 Quezado-Duval AM, Lopes CA (2010) Mancha-bacteriana: Uma Atualização Para o Sistema
464 de Produção Integrada de Tomate Indústria. Circular Técnica 84. Brasília: Embrapa
465 Hortaliças, 28p.
- 466
- 467 R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation
468 for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>
- 469

470 Tebaldi ND, Sá, GNV, Gontijo, LN, Mota, LCBM (2021) Método de preparo de suspensão
471 bacteriana inativada para o controle da mancha bacteriana do tomateiro. Depositante:
472 Universidade Federal de Uberlândia (BR/MG); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
473 Minas Gerais - FAPEMIG (BR/MG). BR 10 2021 014300 2. Depósito: 20 jul. 2021

474

475 Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by
476 rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology 36:453-483

477 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>

478

479 Van Loon LC (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related
480 proteins. European Journal of Plant Pathology 103:753-765

481 <https://doi.org/10.1023/A:1008638109140>

482

483 Walters D, Newton A, Lyon G (2005) Induced resistance: helping plants to help themselves.
484 Biologist 52:28-33

485

ANEXO A – PATENTE DE INVENÇÃO

20/07/2021

870210065948

17:34



29409161932910912

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**Número do Processo:** BR 10 2021 014300 2**Dados do Depositante (71)****Depositante 1 de 1**

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25648387000118

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. João Naves de Ávila, 2121 - Campus Santa Mônica - Reitoria

Cidade: Uberlândia

Estado: MG

CEP: 38400-902

País: Brasil

Telefone: (34)3239 4977

Fax:

Email: propriedade@intelecto.ufu.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de MÉTODO DE PREPARO DE SUSPENSÃO BACTERIANA

Utilidade (54): INATIVADA PARA O CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

Resumo: A presente invenção propõe o preparo e o uso de uma suspensão bacteriana inativada para o controle da mancha bacteriana do tomateiro causada por *Xanthomonas gardneri*, uma vez que os agroquímicos disponíveis não são eficientes, propondo-se um método alternativo de controle sem impacto ambiental. Esta modalidade mostra-se promissora para o controle de doenças bacterianas que ocorre em diversas fruteiras e culturas de importância agrícola, como milho, soja, algodão, repolho, melão, citros e maracujá entre outras.

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 20/07/2021 às 17:34,
Petição 870210065948