

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Xanthomonas*
euvesicatoria DE PIMENTÃO NO BRASIL**

MAYSA SOUZA AREAS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP- Campus
de Botucatu, para obtenção do Título de
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP
NOVEMBRO – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Xanthomonas*
euvesicatoria DE PIMENTÃO NO BRASIL**

MAYSA SOUZA AREAS

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni

Co-orientador: Dr. Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP- Campus de Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP
NOVEMBRO – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Areas, Maysa Souza, 1984-
A678i Identificação e caracterização de *Xanthomonas euvesicatoria* de pimentão no Brasil / Maysa Souza Areas. - Botucatu : [s.n.], 2013
ix, 56 f. : tabs., grafs., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2013
Orientador: Antonio Carlos Maringoni
Coorientador: Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior
Inclui bibliografia

1. Pimentão - Brasil. 2. Resistência a doenças e pragas - Aspectos genéticos. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Solanacea. I. Maringoni, Antonio Carlos. II. Silva Júnior, Tadeu Antônio Fernandes da. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Xanthomonas euvesicatoria*
EM PIMENTÃO NO BRASIL”

ALUNA: MAYSÁ SOUZA AREAS

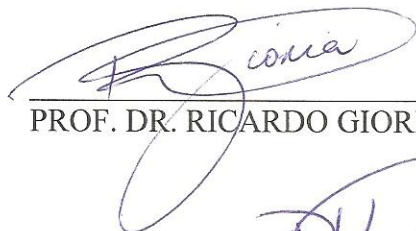
ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI

COORIENTADOR: PROF. DR. TADEU ANTÔNIO FERNANDES DA SILVA JUNIOR

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



PROF. DR. RICARDO GIORIA



PROF. DR. RENATE KRAUSE SAKATE

Data da Realização: 20 de novembro de 2013.

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais
Maria de Fatima Souza Areas e José Benedito Areas,
aos meus amores e irmãos
Thamírys Souza Areas e José Víctor Souza Areas
e ao meu querido Jean Moraes Rocha.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por todo aprendizado e conquistas, por guiar meus pensamentos, acalmar meu coração e pelas pessoas maravilhosas que conheci.

Aos meus pais José Benedito Areas e Maria de Fátima Souza Areas, pelo amor, educação, confiança, por acreditarem na minha vitória, me ensinarem sobre a vida, não desanimar com as dificuldades e perseverar nos meus objetivos.

Aos meus irmãos Thamirys Souza Areas e José Victor Souza Areas, pela alegria de compartilhar momentos, por me ouvirem quando estes foram difíceis, pela amizade, amor, apoio, carinho, risadas quando estamos juntos e por entenderem minha ausência.

Ao meu querido Jean Moraes Rocha pelo carinho, companheirismo, incentivo, por me apoiar nas decisões e crescer junto comigo perante os desafios, sempre com dedicação e amor.

Ao meu padrinho Heliton Camilo de Almeida Areas e minha tia Natalícia de Souza por sempre incentivarem meus estudos, assim como meus avós paternos Filomena Aparecida de Almeida Areas e João Pereira Areas, a minha avó materna Vicência Avelina de Souza e mesmo com pouco tempo de convivência ao meu avô materno Manoel Hilário Fortunato (*in memoriam*).

À minha família em Botucatu, Vanderléia, Wilmar, Aline e Bruno, pessoas maravilhosas que me acolheram com carinho, trazendo alegria em meus momentos de dificuldade.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, paciência, carinho e dedicação depositados em mim.

Ao meu co-orientador Dr. Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior, pelo apoio e ensinamentos mesmo quando distante, e também pela amizade, paciência e o incansável incentivo à pesquisa.

Aos meus amigos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Ricardo Marcelo Gonçalves pela paciência e ajuda principalmente com os testes moleculares; José Marcelo Soman pela ajuda e opiniões; ao Júlio César Rodrigues e Ronaldo Caravieri de Souza Filho por me ajudarem com os trabalhos do laboratório e também pelas conversas e conselhos. Agradeço de coração a vocês que tive o prazer de trabalhar dividindo dificuldades e somando aprendizado sempre com muitas risadas.

À Professora Dr. Renate Krause Sakate pela ajuda e contribuições neste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Giória, da Sakata Seed Sudamerica Ltda. por fornecer os isolados de *Xanthomonas* spp

À Dr^a Suzete Aparecida Lanza Destéfano, do Instituto Biológico de Campinas-SP, por fornecer os isolados tipo de *Xanthomonas* spp.

Aos amigos Leysimar Ribeiro Ptzer Guimarães e Felipe Vitório Castro Faria pela amizade, por me incentivarem e apoiarem na decisão do mestrado e na vinda para a FCA/UNESP.

Às minhas amigas Thalita Cervezan e Aline Rabonato, pela companhia, apoio, incentivo, por me ensinarem ainda mais sobre amizade e vontade de ajudar, seja com atos, palavras ou boas energias.

À minha amiga Natália de Brito Lanna, pessoa maravilhosa, que tive o privilégio de conhecer e construir uma grande amizade.

Aos amigos da Pós Graduação, Tatiane Mituti, Erika Cristina Correia, Evelynne Leão, Paula Leite, Mônica Fecury, Daiana Bampi, Bruno de Marchi, Milena Leite, Dalton Dorighello, Ana Paula Paiva, Laís Peixoto, Kelly Rocha, Pamela Gomes Nakada, Djanira Negrão, Késsia Pantoja, Cristiane Melo, Leonardo Barbosa e Raimundo Monteiro pela companhia, aprendizado e inúmeras risadas.

Aos professores João Sebastião de Paula Araújo e Débora Alves Gonzaga da Silva, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e aos amigos Maruzanete Pereira de Melo, Antonio Roberto Gomes de Farias, Guilherme de Oliveira Tostes e Luciene Souza Ferreira pelo carinho e incentivo. Também ao Edvar Silva, Laís Lorena, Natália Rodrigues, Itaynara e Emanuel pelo apoio e aprendizado em Botucatu.

Aos Professores Marcelo Agenor Pavan, Edson Luís Furtado, Marli Teixeira de Almeida Minhoni, Carlos Gilberto Raetano e aos demais professores do Departamento de Proteção Vegetal que contribuíram para a minha formação ao longo do curso.

Aos funcionários da FCA: Samuel, Sr. Paulinho, Sr. Norberto, Adriana, Luciana e Maria Aparecida.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Curso de Pós Graduação em Agronomia - Proteção de Plantas, da Faculdade de Ciências Agrônomicas (UNESP - Campus de Botucatu) pela oportunidade da realização deste curso.

A todos estes e aos que não foram citados, eu agradeço por contribuírem com esta conquista!

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
1.RESUMO	1
2. SUMMARY	3
3.INTRODUÇÃO.....	5
4.REVISÃO DE LITERATURA	7
4.1. Aspectos gerais da cultura do pimentão	7
4.2. Mancha bacteriana do pimentão e características de <i>Xanthomonas</i> spp.	9
4.3. Medidas de controle da mancha bacteriana e resistência de <i>Xanthomonas</i> spp. a produtos químicos	14
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1. Local da realização dos ensaios.....	18
5.2. Obtenção e preservação dos isolados	18
5.3. Caracterização bioquímica e morfológica	20
5.3.1. Coloração diferencial de Gram.....	20
5.3.2. Teste de KOH	20
5.3.3. Hidrólise de amido	21
5.3.4. Atividade pectinolítica.....	21
5.3.5. Utilização de diferentes fontes de carbono.....	22
5.4. Identificação molecular	22
5.5. Sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>Xanthomonas</i> spp. de pimentão ao sulfato de cobre e ao sulfato de zinco	24
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6.1. Caracterização bioquímica	25
6.1.1. Utilização de diferentes fontes de carbono.....	29
6.2. Identificação molecular	33
6.3. Sensibilidade ao sulfato de cobre e ao sulfato de zinco	36
7.CONCLUSÕES	40
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
APÊNDICE 1	50
APÊNDICE 2	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Diferenciação de quatro espécies de <i>Xanthomonas</i> spp. patogênicas ao pimentão e/ou tomateiro, com base na utilização de treze diferentes fontes de carbono.....	13
Tabela 2: Relação dos isolados de <i>Xanthomonas</i> spp.	19
Tabela 3: Testes de hidrólise de amido e atividade pectinolítica de isolados de <i>Xanthomonas</i> spp. patogênicos ao pimentão.....	28
Tabela 4: Resultado da utilização de 13 fontes de carbono para diferenciação das quatro espécies de <i>Xanthomonas</i> que causam a mancha bacteriana em pimentão e tomateiro.....	32
Tabela 5: Porcentagem de inibição, do teste de sensibilidade <i>in vitro</i> , dos isolados de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Hidrólise positiva de amido em *X. vesicatoria* (1), *X. perforans* (2) e isolado Xcv 191 (5) e hidrólise negativa em *X. euvesicatoria* (3) e *X. gardneri* (4). 27
- Figura 2:** Atividade pectinolítica positiva em *X. vesicatoria* (1), *X. perforans* (2) e atividade pectinolítica negativa em *X. euvesicatoria* (3), *X. gardneri* (4) e Xcv 266 (5). .. 27
- Figura 3:** Microplaca GN2, contendo 95 diferentes fontes de carbono, 24 horas após a incubação do isolado Xcv 236, com indicação das 13 fontes de carbono diferenciais para as quatro espécies causadoras de mancha bacteriana: 1- ácido acético, 2- ácido cis-acônico, 3- ácido glicil-L- aspártico, 4- ácido malônico, 5- ácido propiônico, 6- D-alanina, 7- D-galactose, 8- D-lactose, 9- dextrina, 10- glicogênio, 11- gentibiose, 12- L-treonina, 13- N-acetil-D-glucosamina..... 30
- Figura 4:** Identificação das fontes de carbono existentes na microplaca GN2 da Biolog®31
- Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos das ampliações de isolados de *Xanthomonas* spp. utilizando iniciadores específicos. M - Marcador Molecular; 1 - Isolado Xcv 02; 2 - Xcv 190; 3 - Xcv 191; 4 - Xcv 201; 5 - Xcv 202; 6 - Xcv 251; 7 - Xcv 258; 8 - Xcv 266; 9 - Xcv 287; 10 - P-13; 11 - IBSBF 2363 (*Xanthomonas euvesicatoria*); 12 - IBSBF 2364 (*Xanthomonas vesicatoria*); 13 - IBSBF 2370 (*Xanthomonas perforans*); 14 - IBSBF 2373 (*Xanthomonas gardneri*); N - Negativo. A - produto da PCR obtido com os iniciadores específicos para *X. euvesicatoria* (BS-XeF e BS-XeR); B - produto do PCR obtido com os iniciadores específicos para *X. vesicatoria* (BS-XvF e BS-XvR); C - produto do PCR obtido com os iniciadores específicos para *X. perforans* (BS-XpF e BS-XpR); D - produto do PCR obtido com os iniciadores específicos para *X. gardneri* (BS-XgF e BS-XgR). 35
- Figura 6:** Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* de pimentão ao sulfato de cobre nas concentrações de 0 (1), 50 (2), 100 (3), 200 (4) e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (5)..... 38
- Figura 7:** Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* de pimentão a diferentes concentrações de sulfato de cobre, sulfato de zinco e a mistura desses dois produtos. 38

1. RESUMO

O pimentão é uma hortaliça com grande apreciação no Brasil, tendo elevada importância no mercado de condimentos, temperos e conservas. O Estado de São Paulo é o principal produtor desta hortaliça, com produção aproximada de 85.000 toneladas na safra 2010. Dentre os principais problemas fitossanitários da cultura do pimentão, destaca-se a mancha bacteriana, causada por espécies de *Xanthomonas* spp. A doença pode ocasionar perdas substanciais na produtividade da cultura, especialmente em períodos de elevadas pluviosidade e temperatura, além da baixa eficácia de controle com produtos químicos, como fungicidas cúpricos. Em vista do exposto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar 59 isolados de *Xanthomonas* spp. de pimentão obtidos de diferentes regiões produtoras do Brasil, através da utilização de técnicas bioquímicas/fisiológicas, moleculares e verificar a sensibilidade *in vitro* dos isolados aos sulfatos de cobre e zinco e suas misturas. Para os ensaios bioquímicos/fisiológicos, foram realizados os testes de reação diferencial de Gram, solubilidade em KOH a 3%, hidrólise de amido, atividade pectinolítica e a utilização de 13 fontes de carbono, em microplacas GN2 da Biolog[®]. A identificação molecular foi realizada através de reações de PCR com os iniciadores específicos para *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans*. A sensibilidade *in vitro* dos isolados aos sulfatos de cobre e zinco foi avaliada nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, além da mistura de 50% de cada um dos produtos, nas mesmas concentrações finais no meio de cultura PSA. Com base nos resultados dos testes bioquímicos/fisiológicos e moleculares (PCR) com iniciadores específicos revelaram a prevalência de *X. euvesicatoria* em pimentão no Brasil. Todos os isolados avaliados foram resistentes ao sulfato de zinco e 85% deles foram resistentes ao

sulfato de cobre. A mistura dos dois produtos na concentração de $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ inibiu o crescimento de todos os isolados avaliados.

Palavras-chave: Biolog, mancha bacteriana, PCR, resistência, solanáceas.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *Xanthomonas euvesicatoria* FROM PEPPER IN BRAZIL. Botucatu, 2013. 56 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MAYSÁ SOUZA AREAS

Adviser: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MARINGONI

Co-adviser: Dr. TADEU ANTÔNIO FERNANDES DA SILVA JÚNIOR

2. SUMMARY

Pepper is a vegetable with great appreciation in Brazil and high importance for the market of condiments, spices and canned goods. Sao Paulo state is the main producer of pepper in Brazil with almost 85.000 ton in 2010. One of the most important phytosanitary problems for this crop is the bacterial spot, caused by species of *Xanthomonas* spp. This disease can cause crop productivity losses, especially during periods of high rainfall and temperature, in addition to the low efficacy of chemicals, as copper fungicides. In this study, we characterized 59 strains of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot from different producing regions of Brazil, using biochemical/physiological and molecular techniques, and evaluated the *in vitro* sensitivity of strains to copper and zinc sulfates. For the biochemical/physiological assays, Gram staining, KOH string test, starch hydrolysis, pectinolytic activity and the utilization of 13 carbon sources on Biolog[®] GN2 microplates were performed. Molecular characterization was performed by PCR with specific initiators for *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* and *X. perforans*. *In vitro* sensitivity of strains to copper and zinc sulfates was evaluated at concentrations 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, together with the mixing of the chemicals, in the same final concentration in culture medium. Based on starch hydrolysis and pectinolytic activity results, strains were divided in two distinct groups: *X. vesicatoria* with *X. perforans* (positive pectinolytic and amylolytic activities) and *X. euvesicatoria* with *X. gardneri* (negative pectinolytic and amylolytic activities). PCR and carbon sources utilization results revealed the prevalence of *X. perforans* on pepper in Brazil. All strains were resistant to zinc sulfate and 85% to copper sulfate. The mixing of the chemicals at concentration of 400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ inhibited the growth of all strains assessed.

Keywords: bacterial spot, Biolog, PCR, resistance, solanaceous.

2. INTRODUÇÃO

O pimentão é uma das hortaliças mais cultivadas em todo o mundo, sendo comercializado na forma de fruto fresco e conservas. Sua importância é dada pela presença de substâncias químicas que conferem sabor e aroma aos alimentos, além de serem fontes consideráveis de vitaminas (REIFSCHNEIDER, 2000; FINGER; SILVA, 2005).

A cultura do pimentão está sujeita à ocorrência de diversos problemas fitossanitários, sendo a mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas* spp., um dos mais importantes. A doença ocorre, predominantemente, em épocas chuvosas, associadas a temperaturas em torno de 25 a 28°C (KUROZAWA et al., 2005; QUEZADO-DURVAL; LOPES, 2010).

O controle da mancha bacteriana é dificultado pela variabilidade das bactérias causadoras da doença e pela baixa eficiência de produtos químicos. Além disso, a eficiência do controle varia com a região, época do ano e a intensidade e frequência de pulverizações com produtos químicos na cultura (MARINGONI et al., 1986; AGUIAR, et al., 2000; CARMO et al., 2001).

Em vista do exposto, este trabalho teve como objetivo a caracterização de isolados de *Xanthomonas* spp. de pimentão oriundos de diversas regiões do Brasil, utilizando testes bioquímicos/fisiológicos e a identificação molecular, além da avaliação da sensibilidade *in vitro* dos isolados aos sulfatos de cobre e zinco e à mistura dos produtos. Estas informações são de grande importância para pesquisas direcionadas ao melhoramento genético da cultura, visando a seleção de germoplasma resistentes para

serem utilizados em cruzamentos, a incorporação de genes de resistência à mancha bacteriana em cultivares suscetíveis e o direcionamento para o controle químico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais da cultura do pimentão

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é originário do continente Americano, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o Chile. Séculos antes da colonização espanhola, o pimentão e a pimenta já eram amplamente cultivados e consumidos pelos povos indígenas nas Américas. No ano de 1493, o pimentão foi introduzido na Espanha, chegando a outras nações da Europa, Ásia e África (FILGUEIRA, 2008). Há registros históricos de que as primeiras cultivares de pimentão foram desenvolvidas na Espanha, sendo pertencentes ao grupo denominado “Casca dura”, com frutos de formato cônico. No Brasil, o pimentão foi introduzido inicialmente no Estado de São Paulo, nos municípios de Mogi das Cruzes e Suzano (REIFSCHNEIDER, 2000).

Segundo dados da FAO (2013), na safra de 2011, foram produzidas 29,6 milhões de toneladas de pimentão em todo o mundo, ocupando uma área de 1,8 milhões de hectares. A Ásia foi responsável por 69,3% do pimentão produzido, seguida das Américas (12,4%), Europa (9,7%), África (8,4%) e Oceania (0,2%). Os principais países produtores de pimentão, na safra 2011, foram China (15,5 milhões de ton.), México (2,1 milhões de ton.), Turquia (1,9 milhões de ton.), Indonésia (1,4 milhões de ton.) e Espanha (0,9 milhões de ton.).

No Brasil, conforme dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra 2010, foram produzidas 197 mil toneladas de pimentão, sendo os estados da região Sudeste, os maiores produtores. No Estado de São Paulo, a produção de pimentão foi de 85 mil toneladas, em uma área de 2,1 mil hectares, seguido de

Minas Gerais (45 mil ton.), Rio de Janeiro (27 mil ton.), Espírito Santo (25 mil de ton.) e Goiás (6,5 mil de ton.) (CONAB, 2011; Instituto de Economia Agrícola, 2012).

O conteúdo nutricional dos frutos de pimentão é relativamente alto, sendo ricos em vitaminas A, B1, B2, C e E, proteínas, carotenóides, glicídios, lipídios, minerais, água e fibras que auxiliam no processo de digestão e previnem problemas intestinais. Por serem fontes de antioxidantes naturais, os pimentões estão sendo pesquisados por áreas relacionadas à medicina e à farmácia para fins terapêuticos e utilização na prevenção de doenças cardiovasculares e degenerativas como o câncer, catarata, e os mals de Parkinson e Alzheimer. Os frutos possuem diversos pigmentos, como os carotenóides, que são responsáveis pela sua coloração, e pelo corante vermelho denominado páprica (REIFSCHNEIDER, 2000; MOREIRA, 2012).

O cultivo do pimentão ocorre tanto em campo aberto quanto em estufas. O cultivo em campo aberto é o grande responsável pela grande maioria das áreas cultivadas no Brasil. No cultivo protegido, são empregados híbridos de frutos coloridos, que possuem maior valor agregado, quando comparados aos pimentões de coloração verde. O custo de produção desses frutos é maior, principalmente pelo extenso período de maturação, especialmente durante o inverno (GOTO; ROSSI, 1997; CERQUEIRA-PEREIRA et al., 2007).

Segundo Filgueira (2008), trata-se de uma solanácea arbustiva, perene, porém cultivada como cultura anual. De acordo com Goto e Rossi (1997), o pimentão é uma planta de clima tropical, exige temperatura ao redor de 25 e 28°C, atinge altura média de 0,50 a 2,50m. A raiz principal pode chegar de 0,30 a 0,60m, as raízes adventícias são numerosas e alcançam de 0,30 a 0,50m. As folhas são ovaladas, terminadas em ápice agudo, dispostas alternadamente na haste e apresentam cor verde brilhante. As flores solitárias, hermafroditas e brancas surgem em cada bifurcação da haste, nas axilas das folhas.

Assim como em qualquer cultura, a cultivar e/ou híbrido de pimentão produzido é determinado pelas preferências do mercado, condições climáticas e fitossanitárias favoráveis. Os frutos diferem pelo tamanho, formato, coloração e maturação. Os frutos imaturos apresentam coloração verde, e quando maduros são de coloração vermelha, amarela, entre outras cores (FONTES, 2005). De acordo com Moreira (2012), os frutos de pimentão não apresentam sabor picante devido à ausência do alcalóide capsaicina.

Apesar dos avanços tecnológicos incorporados aos sistemas de produção da cultura do pimentão, as doenças de distintas origens, bióticas e abióticas, são sério entrave à produção da cultura (LOPES; ÁVILA, 2003). As doenças que afetam o pimentão podem comprometer a quantidade e a qualidade da produção em diversos estágios de desenvolvimento. Segundo Pernezny (2003) e Kurozawa et al. (2005), as principais doenças fúngicas que incidem sobre a cultura são canela preta (*Phytophthora capsici*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. capsici* e *C. coccodes*) e míldio pulverulento (*Oidiopsis seculo*). As principais doenças de etiologia viral são causadas pelo Potato Virus Y (PVY), Pepper Yellow Mosaic Virus (PepYMV), o vira-cabeça causado por diversas espécies do gênero Tospovírus, Cucumber Mosaic Virus (CMV) e o mosaico do fumo causado por espécies do gênero Tobamovírus (TMV, ToMV, PMMoV). A principal nematose é o nematóide das galhas causado pelas espécies *Meloidogyne incógnita*, *M. javanica* e *M. enterolobi*. As principais doenças bacterianas são a murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), talo oco (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) e mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.).

3.2. Mancha bacteriana do pimentão e características de *Xanthomonas* spp.

A mancha bacteriana, incitada por *Xanthomonas* spp., é uma das principais doenças bacterianas da cultura do pimentão, em regiões ou épocas de cultivo com alta umidade e temperaturas na faixa de 25-28°C. No Brasil, nas Regiões Sudeste e Sul, ela ocorre em maior incidência em pimentão durante o verão, principalmente devido à alta pluviosidade e suscetibilidade dos cultivares e híbridos plantados (KUROZAWA et al., 2005). Atualmente, a doença encontra-se distribuída nas regiões mais quentes do mundo, como as Américas, África, Ásia, Europa Meridional e Oceania (CABI, 1996).

Os sintomas da mancha bacteriana em pimentão atingem toda a parte aérea da planta, durante todos os estágios de desenvolvimento. De acordo com Pernezny (2003), nas folhas os sintomas iniciam como pequenas manchas encharcadas, tornando-se marrons e necróticas no centro. Quando submetidas a períodos chuvosos ou água de irrigação, progridem para mais de 3 mm de diâmetro e se aglutinam, levando à queda prematura das folhas. Nos frutos, as lesões iniciais são verdes circulares, atingindo 2 a 3 mm diâmetro, tornando-se de coloração marrom, áspera e com aspecto de verruga. De acordo com Kurozawa et al. (2005), a bactéria pode colonizar todo o fruto, atingir as

sementes e contaminá-las, além de favorecer o apodrecimento dos frutos por microrganismos secundários.

Representantes do gênero *Xanthomonas* spp. são Gram-negativos, aeróbicos, baciliformes (0,4 - 0,7 x 0,7 - 1,8 µm), móveis por um único flagelo polar, não reduzem nitrato, oxidase negativa, catalase positiva, e não utilizam asparagina como única fonte de carbono (SCHAAD et al., 2001). As colônias são lisas, mucóides, amarelas e produzem o pigmento xantomonadina (BRADBURY, 1986).

A mancha bacteriana foi relatada pela primeira vez afetando plantas de tomateiro na África do Sul, em 1914, sendo descrita como cancro do tomateiro, em 1920, por Ethel Doidge. Quase na mesma época do trabalho de Doidge, uma doença similar foi descrita nos Estados Unidos por Gardner e Kendrick, e referida como mancha bacteriana. No trabalho desenvolvido por Doidge, ele identificou o agente causal da doença como *Bacterium vesicatorium*, enquanto que nos Estados Unidos, o patógeno foi nomeado *B. exitiosa*. Doidge descreveu *B. vesicatorium* como fracamente amilolítica, enquanto Gardner e Kendrick caracterizaram *B. exitiosa* como fortemente amilolítica (JONES et al., 1998).

Durante o mesmo período, em 1918, a mancha bacteriana do pimentão foi descrita por Sherbakoff. Em 1922, Higgins determinou que o organismo era altamente relacionado a *B. vesicatorium* e *B. exitiosa*, mas diferentes em algumas importantes reações fisiológicas. Em 1924, Gardner e Kendrick usaram vários testes para comparar *B. exitiosa* e *B. vesicatorium* a um isolado obtido de pimentão na Flórida. Os pesquisadores falharam na comparação das atividades amilolíticas dos isolados, mas mesmo assim, concluíram que os três eram muito semelhantes, denominando-os *B. vesicatorium* Doidge. Como resultado, por aproximadamente quatro décadas, apenas uma espécie bacteriana foi considerada o agente causador da mancha bacteriana do pimentão e tomate (JONES et al., 1998).

Em 1925, *B. vesicatorium* foi renomeada para *Pseudomonas vesicatoria*, em 1930 para *Phytomonas vesicatoria*, em 1939 para *Xanthomonas vesicatoria* (JONES et al., 1998). Trabalho desenvolvido por Burkholder e Li (1941) demonstrou que isolados de *X. vesicatoria* de tomate hidrolisavam amido, enquanto que os de pimentão não apresentavam atividade amilolítica.

No ano de 1947, a mancha bacteriana foi relatada pela primeira vez no Brasil, em pimentão, no Estado de Pernambuco, e posteriormente constatada no Rio de Janeiro (ROBBS, 1953).

Em 1957, Sutic identificou uma doença bacteriana em tomateiro na Iugoslávia, responsável pelo sintoma "olho de pássaro" e identificou seu agente causal como *Pseudomonas gardneri*, estabelecendo uma variedade especial, *X. gardneri* var. *capsici* para isolados patogênicos ao pimentão (JONES et al., 1998). Embora esta bactéria não tenha sido formalmente classificada como pertencente ao gênero *Xanthomonas*, Dye (1966) comparou *P. gardneri* a um grupo de isolados e determinou que ela era pertencente ao gênero *Xanthomonas*. Além disso, Dye demonstrou que *X. gardneri* era um sinônimo de *X. vesicatoria*, uma vez que ambas as bactérias eram patogênicas ao tomateiro e não eram diferenciáveis por técnicas laboratoriais e patogenicidade. Algumas décadas depois, análises de ácidos graxos, testes de utilização de fontes de carbono e análise do rRNA 16S confirmaram que esta bactéria pertencia ao gênero *Xanthomonas*, sendo reclassificada como *X. gardneri* (JONES, et al., 2000).

Um estudo desenvolvido por Dye (1966) comparou isolados de *X. vesicatoria* de pimentão e tomate de diversas regiões do mundo e observou que não era possível diferenciá-los por testes bioquímicos, sendo portanto, pertencentes à mesma espécie. Os isolados pertencentes à espécie *X. vesicatoria* foram então renomeados para *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Entretanto, alguns isolados de pimentão apresentavam uma fraca atividade amilolítica quando comparados a isolados de tomate (JONES et al., 1998; JONES et al., 2004).

Em 1976 foi criado o termo patovar, independente do hospedeiro, portanto *X. vesicatoria* passou a ser denominada *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Dye et al., 1980).

Em trabalhos de caracterização de isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* de tomate e pimentão no Brasil, Maringoni e Kimati (1987 a; b) demonstraram que os isolados de tomate hidrolisavam amido, enquanto os isolados de pimentão apresentavam reação negativa. A diferenciação sorológica entre os isolados de pimentão e tomate em dupla-difusão em gel-ágar demonstrou que os isolados de pimentão, com exceção do isolado P-14, reagiram com antissoro homólogo. Os isolados de tomate reagiram com o antissoro heterólogo, demonstrando a diferença sorológica entre os isolados de tomate e pimentão.

No final da década de 80 e início da década de 90, Vauterin et al. (1990) e Stall et al. (1994), independentemente, observaram que *X. campestris* pv. *vesicatoria* era constituída por dois grupos de isolados geneticamente distintos. Posteriormente, Vauterin et al. (1995) dividiram *X. campestris* pv. *vesicatoria* em duas espécies e grupos distintos: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Grupo A) e *Xanthomonas vesicatoria* (Grupo B). Esta nova divisão foi baseada em estudos envolvendo hibridização DNA-DNA, expressão de bandas de proteínas, hipersensibilidade em hospedeiros diferenciais e sorologia. Foi evidenciado que a homologia entre o DNA das duas espécies era inferior a 50%. Os isolados do Grupo A não hidrolisam amido e pectina e possuem proteína de 32 Kda. A maioria desses isolados contém o gene de avirulência *avrBsT*, que resulta em incompatibilidade em pimentão. Os isolados do Grupo B hidrolisam amido, possui atividade pectinolítica, proteínas de 27 KDa e na maioria dos isolados o gene de avirulencia *avrBsP* está presente.

Trabalho desenvolvido por Jones et al. (1995) e Bouzar et al. (1996 b; c) revelaram um outro grupo de isolados que hidrolisam amido, mas que diferiam dos isolados do Grupo B em patogenicidade e caracterização sorológica. Estes isolados foram designados como pertencentes ao Grupo C.

Anos mais tarde, Jones et al. (2000) realizaram estudos com marcadores genéticos, hibridização DNA-DNA, comparação de sequências de RNA, atividade enzimática e testes de patogenicidade, e concluíram que as *Xanthomonas* spp. patogênicas ao tomate e pimentão podiam ser divididas em quatro grupos fenotípicos distintos, representados por três espécies. Os Grupos A e C com *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*; o grupo B com *X. vesicatoria*; e o grupo D com *X. gardneri*. Os grupos A e C apresentaram alta homologia em estudos filogenéticos, sendo o grupo C classificado como uma subespécie do grupo A.

Finalmente, Jones et al. (2004), baseando-se em testes com treze fontes de carbono (Tabela 1) e hibridização DNA-DNA, reclassificou as espécies de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha bacteriana em tomate e pimentão em quatro espécies. Os isolados do Grupo A foram classificados como *X. euvesicatoria*; os isolados do Grupo B como *X. vesicatoria*; isolados do Grupo C como *X. perforans*, e os isolados do Grupo D como *X. gardneri*.

Tabela 1: Diferenciação de quatro espécies de *Xanthomonas* spp. patogênicas ao pimentão e/ou tomateiro, com base na utilização de treze diferentes fontes de carbono.

Utilização de:	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>X. perforans</i>	<i>X. gardneri</i>
Dextrina	+	+	+	-
Glicogênio	+	V	V	-
N-acetil-D-glucosamina	+	V	+	-
D-galactose	+	V-	+	-
Gentibiose	+	V	+	-
α -D-lactose lactulose	V	V-	+	-
Ácido acético	V	-	+	-
Ácido cis-aconítico	+ ²	- ²	V	-
Ácido malônico	+	V	+	-
Ácido propiônico	V-	V	+	-
D-alanina	V	V	+	-
Ácido glicil-L-aspártico	-	V-	+	-
L-treonina	V	V-	+	-

+ = reação positiva para todos os isolados; V = 50% ou mais de isolados utilizaram a fonte de carbono; V- = <50% dos isolados utilizaram a fonte de carbono; e - = nenhum dos isolados utilizou a fonte de carbono.

Adaptado de Jones et al., (2004).

Na cultura do tomateiro foi observada a ocorrência das quatro espécies de *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*), enquanto que em pimentão ocorrem as espécies *X. euvesicatoria* (JONES et al., 2005) e *X. vesicatoria* (VAUTERIN et al., 1995).

No Brasil, conforme Quezado-Durval et al. (2005), Quezado-Durval et al. (2010), Pereira et al. (2011) e Costa et al. (2012), há relatos da ocorrência das quatro espécies (*X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*) em tomateiro, porém em pimentão esta informação não está esclarecida até a presente data.

A virulência ao tomateiro ou pimentão é resultado da interação dos genes de avirulência do patógeno com os genes de resistência do hospedeiro, que resulta em considerável variação nos isolados do gênero *Xanthomonas*. Foram identificados três grupos de *Xanthomonas* spp. (Xcv): o grupo patogênico apenas a tomate (XcvT); o grupo patogênico ao pimentão (XcvP) e o grupo patogênico a tomate e pimentão (XcvTP) (MINSAVAGE et al., 1990)

Testes moleculares utilizando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizados por Leite Jr. et al. (1995) que detectaram *Xanthomonas*

spp. em sementes de tomate e pimentão, utilizando os iniciadores RST2/RST3 com amplificação de uma banda de DNA de 840 pb e os iniciadores RST9/RST10 com amplificação de uma banda de DNA de 355 pb.

Alguns estudos recentes desenvolveram diversos iniciadores para a detecção de *Xanthomonas* spp. em tomate e pimentão. Cuppels et al. (2006) desenvolveram os iniciadores BSX1 e BSX2 que foram eficazes em detectar *X. gardneri* patogênica ao tomateiro, com amplificação de uma banda de DNA de 579 pb. Entretanto, os iniciadores foram ineficazes na detecção de *X. perforans*. Moretti et al. (2009) utilizaram os iniciadores Xeu 2.4 e Xeu 2.5 para detectar *Xanthomonas euvesicatoria* em plantas de tomate e pimentão, com amplificação de fragmento de DNA contendo 208 pb.

Em trabalho desenvolvido por Koenraadt et al. (2009), quatro iniciadores moleculares foram desenvolvidos para a diferenciação e detecção das quatro espécies de *Xanthomonas* spp. patogênicas a tomate e pimentão. Para *X. euvesicatoria* os iniciadores específicos: BS-XeF e BS-XeR, com amplificação esperada de um fragmento de DNA de 173 pb; para *X. vesicatoria*, os iniciadores BS-XvF e BS-XvR com fragmentos de 138 pb; para *X. gardneri*, com iniciadores BS-XgF e BS-XgR com fragmentos de 154 pb; e *X. perforans*, os iniciadores BS-XpF e BS-XpR com fragmento de 197 pb.

3.3. Medidas de controle da mancha bacteriana e resistência de *Xanthomonas* spp. a produtos químicos

De acordo com Kurozawa et al (2005), é recomendado o uso de sementes sadias rotação de culturas com espécies não-solanáceas por um período de dois a três anos e instalação da cultura apenas em locais não propensos a cerração ou orvalho em épocas com temperaturas de 25 a 28°C. O plantio em ambiente protegido também é recomendado durante as épocas mais quentes e chuvosas do ano. O controle químico da mancha bacteriana é baseado na pulverização periódica com fungicidas a base de cobre. Quando disponíveis é recomendado o uso de cultivares de pimentão resistentes (KUROZAWA et al., 2005). No mercado brasileiro existem híbridos com genes específico de resistência a algumas raças do agente causal da mancha bacteriana, como por exemplo: Impacto, Commandant e Dahra RX (SAKATA, 2013; SEMINIS, 2013; SYNGENTA, 2013).

Na literatura foram descritas a existência de genes de resistência em *C. annuum*: gene Bs1, encontrado no PI 163192 (COOK; STALL, 1963); o gene Bs3, no PI 271322 (KIM; HARTMAN, 1985); Bs2, observado em *C. chacoense* e PI 260435 (COOK; GUEVARA, 1984, Bs4, no PI 235047 de *C. pubescens* (SAHIN; MILLER, 1998) e Bs5 citado por Jones et al. (1998); Bs5, no PI271322 (Jones et al., 2002) e Bs6, no PEP13 (Jones et al., 2002). Atualmente existem 11 raças *Xanthomonas* spp. patogênicas ao pimentão (P0, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10) (WIERZBICK, 2003). As distintas raças são classificadas utilizando as linhas quase-isogênicas da cultivar “*Early-Calwonder*” denominadas ECW-10R (Bs1), ECW-20R (Bs2), ECW-30R (Bs3), *C. pubensis* (Bs4), PI271322 (Bs5) e PEP13 (Bs6) (Jones et al., 2002). No Brasil há relatos das raças 0, 2, 7 e 8, de acordo com (WIERZBICK, 2003), o gene Bs1 confere resistência as raças 0, 2 e 5; o gene Bs2 à 0, 1, 2, 3, 7 e 8; o gene Bs3 à 0, 1, 4, 7 e 9; o gene Bs4 à 0, 1, 3, 4 e 6.

A baixa eficácia do controle químico da mancha bacteriana em campos de cultivo pode ser explicada pela seleção de isolados resistentes aos produtos químicos utilizados. O primeiro relato de resistência de *Xanthomonas* spp. de pimentão a produtos cúpricos ocorreu na Flórida, em 1983 (MARCO; STALL, 1983). No México, isolados de *Xanthomonas* spp. resistentes a cobre foram identificados em lavouras comerciais de pimentão. Nessas áreas, compostos cúpricos foram utilizados para o controle da mancha bacteriana por mais de 30 anos (ADASKAVEG; HINE, 1985).

Pesquisa realizada no estado norte-americano do Arizona, Adaskaveg et al. (1985) relataram a sensibilidade *in vitro* de isolados de *Xanthomonas* spp., patogênicos ao pimentão a produtos químicos a base de zinco (sulfato de zinco e zineb) e cobre (hidróxido de cobre, sulfato de cobre, carbonato de amônio de cobre e sulfato de cobre básico). Os autores relataram que as formulações de zinco empregadas foram eficientes no controle da mancha bacteriana, mesmo quando os isolados eram resistentes ao cobre.

No Brasil, Maringoni e Kimati (1987c) relataram a baixa sensibilidade de isolados de *Xanthomonas* spp., obtidos de tomateiro e pimentão ao sulfato de cobre, oxiclreto de cobre e hidróxido de cobre, na concentração de 100 µg.ml⁻¹. Entretanto, os isolados se mostraram sensíveis às misturas de fungicidas cúpricos (hidróxido de cobre, oxiclreto de cobre e óxido cuproso) com ditiocarbamatos (maneb, mancozeb e zineb), evidenciando um efeito sinérgico entre os produtos, este é definido

como uma interação entre os agentes tóxicos que produz um efeito maior que o esperado em relação às ações individuais (Castro, 2009).

Em estudo desenvolvido por Ritchie e Dittapongpitch (1991), 63% dos isolados de *Xanthomonas* spp. obtidos de plantas de tomate e pimentão, coletadas entre 1986 a 1990, no estado norte-americano da Carolina do Norte, foram resistentes a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de sulfato de cobre.

Ward e O'Garro (1992) utilizaram 240 isolados de *Xanthomonas* spp. patogênicos ao tomate e pimentão, provenientes de Barbados, no Caribe, para avaliar a sensibilidade ao sulfato de cobre, na concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; ao sulfato de zinco, na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e ao sulfato de estreptomicina, na concentração de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ observaram que 61% dos isolados foram resistentes ao sulfato de cobre; 64% ao sulfato de zinco; 47% a sulfato de estreptomicina, 30% foram resistentes à mistura dos três produtos, e 28% a mistura de cobre e zinco. Os autores relataram que para controlar a mancha bacteriana, produtos à base de cobre e/ou zinco têm sido utilizados frequentemente nos últimos 20-25 anos, portanto oferecem pouco ou nenhum controle da doença, devido a seleção de isolados resistentes.

Nos Estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, Aguiar et al. (2000) encontraram isolados de *Xanthomonas* spp. de pimentão e tomateiro resistentes a até 1800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de sulfato de cobre. Carmo et al. (2001), avaliando o efeito de pulverizações semanais de oxicleto de cobre, no progresso da mancha bacteriana em pimentão, observaram que a eficiência deste produto químico é variável, e na maioria das vezes, ineficiente, principalmente, quando as condições ambientais são propícias ao desenvolvimento da doença.

Aguiar et al. (2003) também avaliaram o efeito da pulverização de sulfato de cobre, oxicleto de cobre, óxido cuproso e óxido cuproso + mancozeb no controle da mancha bacteriana do pimentão. As pulverizações com óxido cuproso e a sua mistura com mancozeb reduziram significativamente a população epifítica de *Xanthomonas* spp. e a doença teve bons níveis de controle com esses produtos.

Estudo desenvolvido por Martin et al. (2004), em plantios de pimentão na Austrália, revelou a ocorrência de isolados de *Xanthomonas* spp. resistentes a sulfato de cobre. No campo, a proporção de isolados resistentes aumentou após 12 pulverizações de cobre e tornaram-se prevalentes após 21 pulverizações, devido à pressão de seleção exercida pelas constantes aplicações do produto químico.

Araújo et al. (2012) compararam os seus resultados com os de Ritchie e Dittapongpitch (1991) e Quezado-Duval et al. (2003) e observaram que o nível de resistência de *Xanthomonas* spp. ao sulfato de cobre encontrado em plantações de tomate no Brasil é menor do que os registrados nos E.U.A.

O aumento de resistência a estes produtos químicos deve-se a pulverizações continuadas, provocando uma pressão de seleção, no sentido de intensificar a resistência em populações bacterianas (AGUIAR et al., 2000). E também, os isolados de *Xanthomonas* spp. podem apresentar genes de resistência, ao cobre, que estão contidos no plasmídeo pXvCu, identificado pela primeira vez na Florida por Stall et al. (1986). Plasmídeos são usualmente transferíveis por conjugação para isolados sensíveis que passaram a apresentar resistência, o que explica o rápido aumento de populações naturalmente resistentes no campo (TETAZ; LUKE, 1983).

A resistência bacteriana a antibióticos é governada por genes de resistência que podem estar no cromossoma principal, em alguns casos a bactéria é resistente a um ou vários antibióticos. O emprego de antibióticos em fitobacteriologia pode envolver problemas técnicos, éticos e ecológicos, assim como econômicos. Do ponto de vista econômico, é bom sempre ter em mente que antibióticos são relativamente caros, o que acaba causando um aumento do custo de produção. Quanto as questões éticas, deve-se enfatizar que existem poucos estudos sobre a persistência de antibióticos, como estreptomicina e tetraciclina em órgãos vegetais utilizados para o consumo humano e que a ingestão de alimentos contendo antibióticos pode acarretar problemas médicos. Ainda, em termos ecológicos, pulverizar antibióticos em uma cultura pode interferir no equilíbrio dos ecossistemas (ROMEIRO, 2011).

Atualmente, no Brasil, para o controle químico da mancha bacteriana do pimentão, há registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento apenas dos princípios ativos hidróxido de cobre e sulfato de cobre (AGROFIT, 2013). Porém, quando o sulfato de estreptomicina era utilizado na cultura no país, há relatos da ocorrência de isolados de *Xanthomonas* spp. resistentes (MARINGONI; KIMATI, 1987b).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local da realização dos ensaios

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Departamento de Proteção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP, Campus de Botucatu.

4.2. Obtenção e preservação dos isolados

Foram utilizados isolados de *Xanthomonas* spp. de pimentão, provenientes de diversas regiões produtoras do país (Tabela 2). Cinquenta e quatro isolados foram fornecidos pelo Dr. Ricardo Gioria da Sakata Seed Sudamerica Ltda.; cinco isolados da Coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da FCA/UNESP; e quatro isolados tipos de *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardeneri* e *X. perforans* da Coleção de Culturas de Bactérias Fitopatogênicas do Instituto Biológico (IBSBF), foram fornecidos pela Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano.

Tabela 2: Relação dos isolados de *Xanthomonas* spp.

Isolado	Procedência	Isolado	Procedência	Isolado	Procedência
Xcv 01	Botucatu/SP *	Xcv 209	Belém/PA *	Xcv 255	Apodi/RN *
Xcv 02	Lins/SP *	Xcv 214	Bacuriti/SP *	Xcv 256	Apodi/RN *
Xcv 53	Lins/SP *	Xcv 215	Bacuriti/SP *	Xcv 257	Apodi/RN *
Xcv 54	Lins/SP *	Xcv 216	Bacuriti/SP *	Xcv 258	Apodi/RN *
Xcv 62	Lins/SP *	Xcv 218	Bacuriti/SP *	Xcv 259	CL. 7393-4 Apodi/RN*
Xcv 70	Lins/SP *	Xcv 219	Bacuriti/SP *	Xcv 261	São Miguel Aracanjó/SP *
Xcv 81	Bertioga/SP *	Xcv 231	Pouso Alegre/MG *	Xcv 263	Socorro/SP *
Xcv 93	Elias Fausto/SP *	Xcv 232	Pouso Alegre/MG *	Xcv 266	Tianguá/CE *
Xcv 96	Mogi das Cruzes/SP *	Xcv 233	Pouso Alegre/MG *	Xcv 274	Cardeal/SP *
Xcv 97	Mogi das Cruzes/SP *	Xcv 236	Ibiúna/SP *	Xcv 287	Tinguá/CE *
Xcv 98	Mogi das Cruzes/SP *	Xcv 237	Campinas/SP *	Xcv 288	Tinguá/CE *
Xcv 154	Brag. Paulista/SP *	Xcv 238	Elias Fausto/SP *	Xcv 289	Tinguá/CE *
Xcv 157	Bragança Paulista/SP *	Xcv 239	Bragança Paulista/SP *	P-1	Nova Friburgo/RJ **
Xcv 188	Elias Fausto/SP *	Xcv 240	Elias Fausto/SP *	P-3	Elias Fausto/SP **
Xcv 190	Belém/PA *	Xcv 242	Pouso Alegre/MG *	P-7	Brasília/DF **
Xcv 191	Belém/PA *	Xcv 248	São Miguel Aracanjó/SP *	P-13	Nova Friburgo/RJ **
Xcv 198	Belém/PA *	Xcv 249	Pouso Alegre/MG *	P-14	Piracicaba/SP **
Xcv 199	Belém/PA *	Xcv 250	Cardeal/SP *	IBSBF 2363	São Paulo/SP ***
Xcv 201	Belém/PA *	Xcv 251	Cardeal/SP *	IBSBF 2364	São Paulo/SP ***
Xcv 202	Belém/PA *	Xcv 252	Cardeal/SP *	IBSBF 2370	São Paulo/SP ***
Xcv 207	Belém/PA *	Xcv 253	Cardeal/SP *	IBSBF 2373	São Paulo/SP ***

* Sakata Seed Sudamérica

** FCA/Unesp

*** Instituto Biológico, Campinas-SP

Os isolados foram cultivados em meio de cultura Nutriente-Sacarose-Ágar (NSA) (5g de peptona, 3g de extrato de carne, 5g de sacarose/L, 15g de ágar e 1.000 mL de água) (Schaad et al., 2001). Após a confirmação da pureza, os isolados foram preservados em tubos de ensaio contendo meio NSA e óleo mineral esterilizado, e para preservação por longos períodos, em meio caldo nutriente (5g de peptona, 3g de extrato de carne e 1.000 mL de água) com 30% de glicerol a -80°C.

4.3. Caracterização bioquímica e morfológica

A caracterização bioquímica e morfológica dos isolados foi efetuada pelos testes de reação diferencial de Gram, solubilidade em KOH a 3%, hidrólise de amido, atividade pectinolítica e utilização de 13 fontes de carbono em microplacas GN2 da Biolog[®] (ácido acético, ácido cis-aconítico, ácido malônico, ácido propiônico, D-alanina, D-galactose, D-lactose lactulose, dextrina, gentiobiose, glicil-L-ácido aspártico, glicogênio, L-treonina e N-acetil-D-glucosamina) (Jones et al., 2004).

4.3.1. Coloração diferencial de Gram

Para avaliar a reação diferencial de Gram, os isolados foram cultivados em meio NSA (48 h/28°C) e um esfregaço foi preparado em lâmina de vidro contendo uma gota de água destilada. O esfregaço foi fixado com ar quente, tratado com cristal violeta (1 min.) e lavado em água corrente. Em seguida, as lâminas foram tratadas com lugol (1 min.), descoloridas em álcool etílico, lavadas em água corrente, e submetidas a contra-coloração com safranina (30 seg.). As lâminas foram lavadas em água corrente, secas com ar quente, e analisadas em microscópio ótico quanto ao formato e coloração das células bacterianas, no aumento de 1000X (MARINGONI, 2010).

4.3.2. Teste de KOH

Para avaliar a reação em KOH, pequenas porções de colônias bacterianas cultivadas em NSA (48 h/28°C) foram transferidas para lâminas de vidro contendo duas gotas de solução de hidróxido de potássio a 3%, e homogeneizadas com palito dental (30 seg.). O palito foi levantado para observação da formação (reação

positiva, indicando isolado Gram-negativo) ou não (reação negativa, indicando isolado Gram-positivo) de um fio viscoso (MARINGONI, 2010).

4.3.3. Hidrólise de amido

Para avaliação de hidrólise de amido foi utilizada a metodologia descrita em Maringoni (2010). Adiciona-se 2g de amido solúvel por litro de meio de cultura Nutriente-Ágar (NA) (5g/L de peptona, 3g/L de extrato de carne, 15g/L de ágar e 1L de água).

Os isolados foram previamente cultivados em meio NSA (48 h/28°C) e suspensões foram preparadas em 10 ml de água destilada esterilizada. Dez microlitros das suspensões foram depositados, em quatro pontos equidistantes, na superfície do meio de cultura, seguido de incubação (72h/28°C). Após a incubação, 5 mL de uma suspensão de lugol (1 g de iodo, 5 g de iodeto de potássio e 330 mL de água destilada) foram adicionados às placas. Para cada isolado avaliado foram preparadas 5 repetições.

As placas foram avaliadas quanto à presença de halo transparente ao redor do crescimento bacteriano (reação positiva) ou à presença de áreas com coloração avermelhada/acastanhada ou totalmente azuladas (reação negativa) (MARINGONI, 2010)..

4.3.4. Atividade pectinolítica

A atividade pectinolítica foi avaliada no meio de cultura MP (5g/l de pectina cítrica, 4g/l KH₂PO₄, 6g/l Na₂HPO₄, 1g/l extrato de levedura, 2g/l (NH₄)₂SO₄, 1g/l FeSO₄.7H₂O, 0,2g/l MgSO₄.7H₂O, 1mg/l CaCl₂, 1mg/l H₃BO₃, 10mg/l MnSO₄, 70mg/l ZnSO₄, 50mg/l CuSO₄, 10mg/l MoO₃, 15g/l Agar e 1000ml de água destilada).

A partir dos isolados com 48 horas de idade no meio NSA, foi realizada uma suspensão bacteriana em 10 ml de água destilada esterilizada, desta 10 µl foram semeados em 4 pontos da placa contendo o meio de cultura MP, com 5 repetições, e incubados durante 72h a 28°C.

Para avaliação da atividade pectinolítica, foi adicionado 5 ml de hexadecyltrimethylammonium bromide 1%. A presença de um halo esbranquiçado ao redor das colônias indicou reação positiva (MARINGONI, 2010).

4.3.5. Utilização de diferentes fontes de carbono

Para avaliar a utilização de diferentes fontes de carbono foi utilizado microplacas GN2 Biolog®, contendo 95 diferentes fontes de carbono, para identificação de bactérias Gram-negativas, do sistema Microlog/Biolog. Destas fontes de carbono, apenas 13 delas, foram avaliadas (ácido acético, ácido cis-aconítico, ácido malônico, ácido propiônico, D-alanina, D-galactose, D-lactose lactulose, dextrina, gentibiose, glicil-L-ácido aspártico, glicogênio, L-treonina e N-acetil-D-glucosamina) conforme Jones et al. (2004).

Os isolados de *Xanthomonas* spp. foram cultivados em meio NSA (48 h/28°C) e repicados duas vezes consecutivas em meio BUG-Ágar (Biolog Universal Growth Agar) (24 h/30°C). As células bacterianas desenvolvidas em BUG-Ágar foram transferidas, utilizando “swabs”, para tubos contendo solução de fluido inoculante, obtendo-se suspensões bacterianas, padronizadas por colorimetria (54% de transmitância/comprimento de onda de 600 nm). Cento e cinquenta microlitros das suspensões foram transferidos para cada um dos poços da microplaca GN contendo as fontes de carbono, seguido de incubação em câmara úmida (24h/30°C). A leitura da microplaca foi realizada em espectrofotômetro, empregando-se o programa Microbiolog 4.20.05, e observando-se a utilização ou não das 13 fontes de carbono para a diferenciação das espécies *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (Jones et al., 2004).

4.4. Identificação molecular

A identificação molecular dos isolados de *Xanthomonas* spp (Tabela 2) foi realizada pela reação de PCR (reação de polimerização em cadeia), utilizando iniciadores específicos para as espécies: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*, causadoras de mancha bacteriana em tomateiro e pimentão, conforme Koenraadt et al. (2009).

Para extração do DNA total bacteriano, os isolados foram cultivados no meio de cultura NSA a 28°C, por 48h, e porções de colônias desenvolvidas na superfície do meio de cultura foram retiradas e homogenizadas em 500 µl de água destilada e esterilizada e submetida ao tratamento térmico a 95°C durante, 15 minutos,

adaptado de Castro et al. (2011). Também foi utilizado o protocolo de extração de DNA proposto por Dellaporta et al. (1983).

Foram utilizados os iniciadores específicos BS-XeF (5'- CTA GAA CTC GGC GTA TCG) e BS-XeR (5'- GTC GGA CAT AGT GGA CAC ATA C) (amplificação de um fragmento de DNA de 173 pb) para *X. euvesicatoria*; BS-XvF (5'- CCA TGT GCC GTT GAA ATA CTT G) e BS-XvR (5'- ACA AGA GAT GTT GCT ATG ATT TGC) (fragmento de DNA de 138 pb) para *X. vesicatoria*; BS-XgF (5'- TCA GTG AGT TCC TCA TTG TC) e BS-XgR (5'- TGA CCG ATA AAG ACT GCG AAA G) (fragmento de DNA de 154 pb) para *X. gardneri*; e BS-XpF (5'- GTC GTG TTG ATG GAG CGT TC) e BS-XpR (5'- GTG CAG GTC AAT TAT CAG AAT GTG G) (fragmento de DNA de 197 pb) para *X. perforans* (Koenraadt et al., 2009).

Na reação da PCR foi utilizado volume total de 12,5 µl, contendo 6,25 µl de maternix Gotaq (Promega), 4,25 µl de água Milli-Q, 1,5 µl do DNA bacteriano, 0,25 µl de cada um dos iniciadores.

Os programas utilizados no termociclador para reação da PCR foram adaptados de Pereira (2010). Para *X. euvesicatoria* consistiu de temperatura inicial de 95°C, por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de: 95°C, por 30 segundos, para desnaturação, 58°C, por 30 segundos, para anelamento, 72°C, por 45 segundos, para extensão e 72°C, por 5 minutos, para extensão final. Para *X. vesicatoria* foi utilizado o mesmo programa diferindo apenas a temperatura de anelamento que foi de 61,3°C, por 30 segundos. Para *X. perforans* foi utilizada a temperatura inicial de 95°C, por 5 minutos, 48°C, por 30 segundos, 72°C, por 60 segundos, seguidos de 30 ciclos de: 95°C, por 30 segundos para desnaturação, 56°C, por 30 segundos para anelamento, 72°C, por 60 segundos para extensão com a mesma temperatura de extensão final. Para *X. gardneri*, também foi utilizado o mesmo programa de *X. euvesicatoria* diferindo a temperatura de anelamento que foi de 63°C, por 1 minuto e a temperatura de extensão que 72°C, por 1 minuto.

Os fragmentos amplificados resultantes da PCR foram analisados em gel horizontal de agarose 1% (Sigma/EUA), em tampão TBE 5X (Tris/Ácido bórico/EDTA) 50%, utilizando-se o intercalante Gel Red (Invitrogen/EUA), na proporção de 5µl de intercalante para 100 ml de gel. Foi utilizado Marcador Molecular de 1Kb Plus (Sigma/EUA).

A eletroforese foi conduzida a 86 V, durante 50 minutos e as bandas de DNA foram digitalizados em fotodocumentador, sob luz UV (Gel Imaging Systems UVP/EUA).

4.5. Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Xanthomonas* spp. de pimentão ao sulfato de cobre e ao sulfato de zinco

A sensibilidade *in vitro* de 59 isolados de *Xanthomonas* spp. (listados na Tabela 2, com exceção dos isolados tipo) foi avaliada aos sulfatos de cobre e zinco e a mistura dos dois produtos contendo 50% de cada um deles, nas concentrações de 0, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em meio de cultura PSA (20g de sacarose, 5g de peptona, 0,5g de K_2HPO_4 , 0,25g de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15g de ágar e 1.000 mL de água), conforme Ritchie & Dittapongpitch (1991), Gore & O'Garro (1999) e Mirik et al. (2007).

Os isolados foram previamente cultivados em meio NSA, durante 48h, a 28°C. Porções de colônias desenvolvidas na superfície do meio de cultura foram transferidas e homogenizadas em 10 ml de água destilada, esterilizada e padronizada por colorimetria à concentração de 10^8 UFC. As suspensões bacterianas obtidas foram transferidas (10 μl) em pontos equidistantes na superfície do meio de cultura contendo ou não os sulfatos de cobre e zinco e de suas misturas. Para cada isolado e para cada concentração dos produtos foram utilizadas 5 placas contendo os meios de cultura.

As placas foram submetidas à incubação a 28°C, por 24h, e a seguir avaliado o crescimento bacteriano na superfície do meio de cultura.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização bioquímica e morfológica

Na coloração diferencial de Gram, todos os isolados apresentaram formato bastonete e coloração rósea, indicando ser Gram negativos, estando de acordo com Schaad (2001). Assim como no teste de KOH, houve a formação de um fio viscoso, indicando reação positiva, indicadora de Gram negativa.

Na avaliação dos resultados de hidrólise de amido (Figura 1) e atividade pectinolítica (Figura 2), conforme a Tabela 3, os isolados tipos de *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2363) e de *X. gardneri* (IBSBF 2373) não apresentaram atividade pectinolítica e hidrólise de amido, já os isolados *X. vesicatoria* (IBSBF 2364) e *X. perforans* (IBSBF 2370) apresentaram atividade pectinolítica e hidrólise de amido.

Dos 59 isolados de *Xanthomonas* spp. de pimentão analisados neste trabalho, todos apresentaram resultado negativo para atividade pectinolítica, destes, 56 isolados, apresentaram resultado negativo para hidrólise de amido. Os isolados (Xcv 191, Xcv 201 e Xcv 202) apresentaram reação positiva para hidrólise de amido (Tabela 3).

De acordo com Jones et al. (2004), os isolados *X. vesicatoria* e *X. perforans* são fortemente amilolíticos e pectinolíticos, já a espécie *X. euvesicatoria* é fracamente amilolítica e pectinolítica e *X. gardneri* não possuem essas atividades. Entretanto, Jones et al. (2004), ao fazerem inferências ao trabalho de Bouzar et al. (1994a) relataram que há isolados de *X. euvesicatoria* com atividade de hidrólise de amido, encontrado no estudo de diversidade entre isolados de *Xanthomonas* spp. patogênicos ao tomate e pimentão, das regiões de Sinaloa e Sorrora, no México. Na pesquisa aqui

desenvolvida, conforme citado, também foi observada hidrólise de amido em três isolados (Xcv 191, Xcv 201 e Xcv 202), coincidentemente oriundos da mesma região do Brasil, Belém-PA, além dos isolados tipos *X. vesicatoria* (IBSBF 2364) e *X. perforans* (IBSBF 2370) (Tabela 3).

No trabalho realizado por Kornev et al. (2009), para avaliação da mancha bacteriana em tomateiros de diferentes regiões da Rússia, utilizando testes bioquímicos e moleculares, vinte e três isolados de *Xanthomonas* spp. foram identificados como *X. gardneri* devida à ausência de atividade amilolítica e pectolítica, restando 18 isolados com atividade amilolítica e pectolítica, identificados como *X. vesicatoria*, os autores não encontraram *X. euvesicatoria* e *X. perforans*.

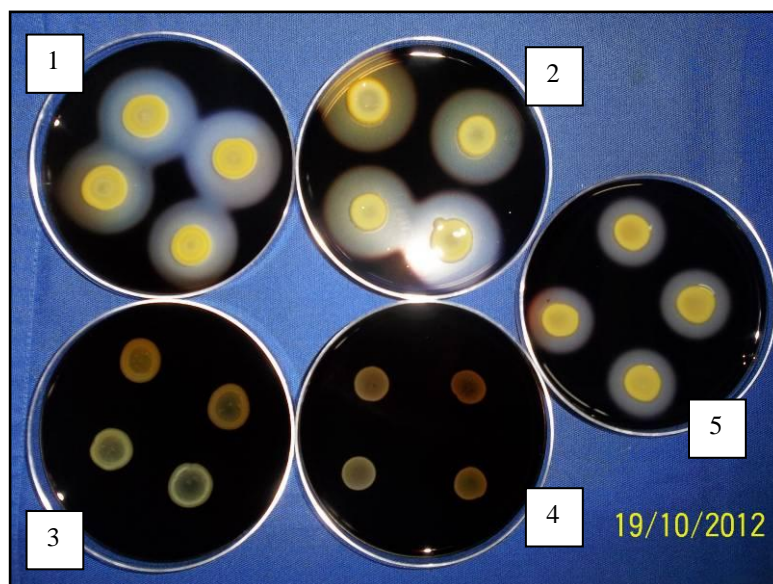


Figura 1: Hidrólise positiva de amido em *X. vesicatoria* (1), *X. perforans* (2) e isolado Xcv 191 (5) e hidrólise negativa em *X. euvesicatoria* (3) e *X. gardneri* (4).

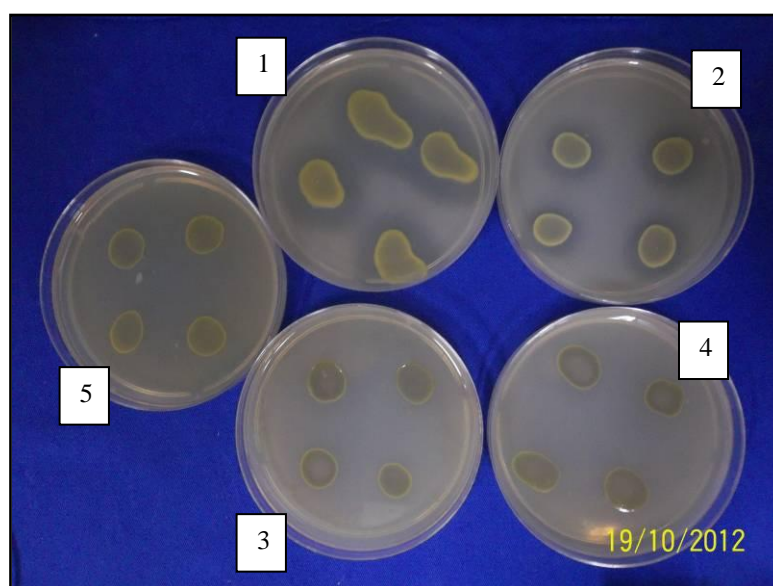


Figura 2: Atividade pectinolítica positiva em *X. vesicatoria* (1), *X. perforans* (2) e atividade pectinolítica negativa em *X. euvesicatoria* (3), *X. gardneri* (4) e Xcv 266 (5).

Tabela 3: Testes de hidrólise de amido e atividade pectinolítica de isolados de *Xanthomonas* spp. patogênicos ao pimentão.

Isolados	Hidrólise de Amido	Atividade Pectinolítica	Isolados	Hidrólise de Amido	Atividade Pectinolítica	Isolados	Hidrólise de Amido	Atividade Pectinolítica
Xcv 01	-	-	Xcv 209	-	-	Xcv 255	-	-
Xcv 02	-	-	Xcv 214	-	-	Xcv 256	-	-
Xcv 53	-	-	Xcv 215	-	-	Xcv 257	-	-
Xcv 54	-	-	Xcv 216	-	-	Xcv 258	-	-
Xcv 62	-	-	Xcv 218	-	-	Xcv 259	-	-
Xcv 70	-	-	Xcv 219	-	-	Xcv 261	-	-
Xcv 81	-	-	Xcv 231	-	-	Xcv 263	-	-
Xcv 93	-	-	Xcv 232	-	-	Xcv 266	-	-
Xcv 96	-	-	Xcv 233	-	-	Xcv 274	-	-
Xcv 97	-	-	Xcv 236	-	-	Xcv 287	-	-
Xcv 98	-	-	Xcv 237	-	-	Xcv 288	-	-
Xcv 154	-	-	Xcv 238	-	-	Xcv 289	-	-
Xcv 157	-	-	Xcv 239	-	-	P-1	-	-
Xcv 188	-	-	Xcv 240	-	-	P-3	-	-
Xcv 190	-	-	Xcv 242	-	-	P-7	-	-
Xcv 191	+	-	Xcv 248	-	-	P-13	-	-
Xcv 198	-	-	Xcv 249	-	-	P-14	-	-
Xcv 199	-	-	Xcv 250	-	-	IBSBF 2363	-	-
Xcv 201	+	-	Xcv 251	-	-	IBSBF 2364	+	+
Xcv 202	+	-	Xcv 252	-	-	IBSBF 2370	+	+
Xcv 207	-	-	Xcv 253	-	-	IBSBF 2373	-	-

5.1.1. Utilização de diferentes fontes de carbono

A avaliação dos resultados de utilização das 13 fontes de carbono em microplaca GN2 (Figuras 3 e 4) confirmou a prevalência da espécie *X. euvesicatoria* na cultura do pimentão no Brasil. Dentre as 13 fontes de carbono descritas por Jones et al. (2004) para diferenciar as quatro espécies de *Xanthomonas*, os isolados testados apresentaram resultado positivo para as fontes: dextrina, N-acetil-D-glucosamina, gentibiose, ácido cis-aconítico e D-alanina; e variáveis para: glicogênio, D-galactose, D-lactose, ácido acético, ácido malônico, ácido propiônico, glicil-L-ácido aspártico e L-treonina (Tabela 4 e Apêndice 1).

Bouzar et al. (1999a), ao analisaram espécies de *Xanthomonas* que causam mancha bacteriana, em tomate e pimentão no Caribe e America Central, observaram que a utilização do ácido cis aconítico e gentibiose, complementados com hidrólise de amido e atividade pectinolítica, diferenciava dois grupos de *Xanthomonas*.

Lue et al. (2010) caracterizou 53 isolados de *Xanthomonas* spp. associadas a mancha bacteriana de tomate e pimentão de diversas regiões de Taiwan e observou que isolados de *X. euvesicatoria* utilizam a maioria das treze fontes de carbono e a utilização do ácido cis-aconítico, pode ser utilizado para diferenciar *X. euvesicatoria* de *X. vesicatoria*, a utilização do ácido glicil-L-aspártico pode ser utilizado para distinguir *X. euvesicatoria* de *X. perforans*, e a utilização de ácido acético é um principal característica de *X. perforans*, para distinguir de *X. vesicatoria*, enquanto isolados de *X. gardneri* não utilizam nenhuma dessas fontes de carbono. No presente trabalho assim como o de Lue et al. (2010), resultaram em utilização variável negativa para glicogênio, variável para o ácido malônico, positivo para D-alanina e também a identificação apenas de *X. euvesicatoria* como agente causal da mancha bacteriana em pimentão.

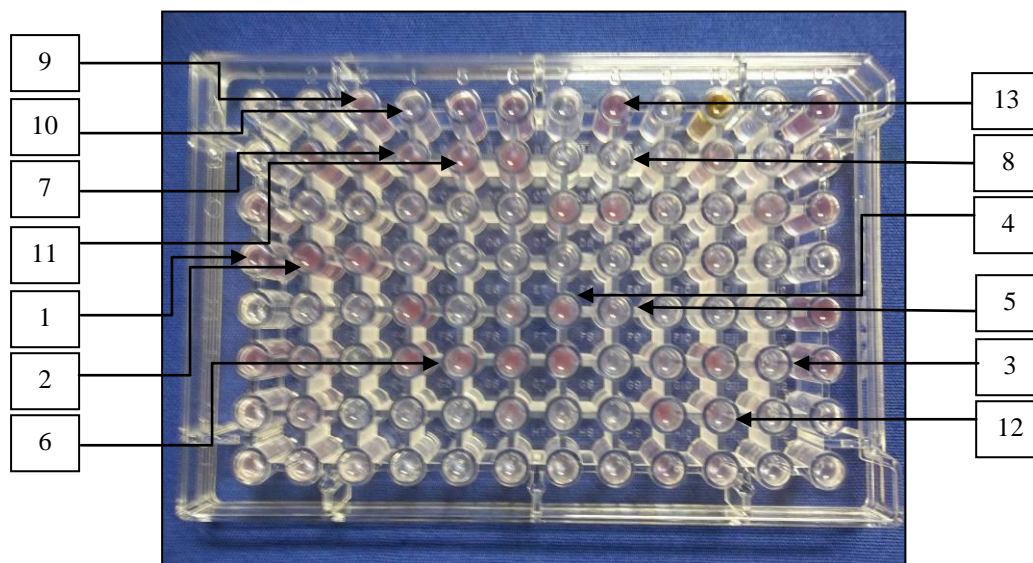


Figura 3: Microplaca GN2, contendo 95 diferentes fontes de carbono, 24 horas após a incubação do isolado Xcv 236, com indicação das 13 fontes de carbono diferenciais para as quatro espécies causadoras de mancha bacteriana: 1- ácido acético, 2- ácido cis-aconítico, 3- ácido glicil-L- aspártico, 4- ácido malônico, 5- ácido propiônico, 6- D-alanina, 7- D-galactose, 8- D-lactose, 9- dextrina, 10- glicogênio, 11- gentibiose, 12- L-treonina, 13- N-acetil-D-glucosamina.

A1 Water	A2 α -Cyclodextrin	A3 Dextrin	A4 Glycogen	A5 Tween 40	A6 Tween 80	A7 N-Acetyl-D-Galactosamine	A8 N-Acetyl-D-Glucosamine	A9 Adonitol	A10 L-Arabinose	A11 D-Arabitol	A12 D-Cellobiose
B1 l-Erythritol	B2 D-Fructose	B3 L-Fucose	B4 D-Galactose	B5 Gentiobiose	B6 α -D-Glucose	B7 m-Inositol	B8 α -D-Lactose	B9 Lactulose	B10 Maltose	B11 D-Mannitol	B12 D-Mannose
C1 D-Melibiose	C2 β -Methyl-D-Glucoside	C3 D- Psicose	C4 D-Raffinose	C5 L-Rhamnose	C6 D-Sorbitol	C7 Sucrose	C8 D-Trehalose	C9 Turanose	C10 Xylitol	C11 Pyruvic Acid Methyl Ester	C12 Succinic Acid Mono-Methyl-Ester
D1 Acetic Acid	D2 Cis-Aconitic Acid	D3 Citric Acid	D4 Formic Acid	D5 D-Galactonic Acid Lactone	D6 D-Galacturonic Acid	D7 D-Gluconic Acid	D8 D-Glucosaminic Acid	D9 D-Glucuronic Acid	D10 α -Hydroxybutyric Acid	D11 β -Hydroxybutyric Acid	D12 γ -Hydroxybutyric Acid
E1 p -Hydroxy Phenylacetic Acid	E2 Itaconic Acid	E3 α -Keto Butyric Acid	E4 α -Keto Glutaric Acid	E5 α -Keto Valeric Acid	E6 D,L-Lactic Acid	E7 Malonic Acid	E8 Propionic Acid	E9 Quinic Acid	E10 D-Saccharic Acid	E11 Sebacic Acid	E12 Succinic Acid
F1 Bromosuccinic Acid	F2 Succinamic Acid	F3 Glucuronamide	F4 L-Alaninamide	F5 D-Alanine	F6 L-Alanine	F7 L-Alanyl-glycine	F8 L-Asparagine	F9 L-Aspartic Acid	F10 L-Glutamic Acid	F11 Glycyl-L-Aspartic Acid	F12 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 L-Histidine	G2 Hydroxy-L-Proline	G3 L-Leucine	G4 L-Ornithine	G5 L-Phenylalanine	G6 L-Proline	G7 L-Pyroglutamic Acid	G8 D-Serine	G9 L-Serine	G10 L-Threonine	G11 D,L-Carnitine	G12 γ -Amino Butyric Acid
H1 Urocanic Acid	H2 Inosine	H3 Uridine	H4 Thymidine	H5 Phenethyl-amine	H6 Putrescine	H7 2-Aminoethanol	H8 2,3-Butanediol	H9 Glycerol	H10 D,L- α -Glycerol Phosphate	H11 α -D-Glucose-1-Phosphate	H12 D-Glucose-6-Phosphate

Figura 4: Identificação das fontes de carbono existentes na microplaca GN2 da Biolog®

Tabela 4: Resultado da utilização de 13 fontes de carbono para diferenciação das quatro espécies de *Xanthomonas* que causam a mancha bacteriana em pimentão e tomateiro.

Fonte de carbono	Número de isolados <i>Xanthomonas</i> spp. de pimentão com reação positiva (+) ou negativa (-) ^a		Reação geral dos isolados de pimentão	Isolados tipos das espécies fornecidos pelo Instituto Biológico				Diferenciação de isolados em padrões de utilização de fontes de carbono ^b .			
	+	-		X.	X.	X.	X.	X.	X.	X.	X.
				<i>euvesicatoria</i>	<i>vesicatoria</i>	<i>perforans</i>	<i>gardneri</i>	<i>euvesicatoria</i>	<i>vesicatoria</i>	<i>perforans</i>	<i>gardneri</i>
Dextrina	59	0	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Glicogênio	20	39	V-	-	+	+	-	+	V	V	-
N-acetil-D-glucosamine	59	0	+	+	+	+	-	+	V	+	-
D-galactose	52	7	+	+	+	+	-	+	V-	+	-
Gentibiose	59	0	+	+	+	+	-	+	V	+	-
α -D-lactose lactulose	4	55	-	-	-	-	-	V	V-	+	-
Ácido acético	32	27	+	+	-	+	-	V	-	+	-
Ácido cis-aconítico	59	0	+	+	+	+	-	+	V	V	-
Ácido malônico	38	21	V	+	-	+	-	+	V	+	-
Ácido propiónico	7	52	-	+	-	+	-	V-	V	+	-
D-alanina	59	0	+	+	+	+	-	V	V	+	-
Ácido glicil-L-aspartico	4	55	-	-	+	+	-	-	V-	+	-
L-threonine	31	28	V	-	-	+	-	V	V-	+	-

^a Cinquenta e nove isolados de *Xanthomonas* spp. avaliados

^b Reação descrita por Jones et al. (2004).

+ = Reação positiva para todos os isolados, V = 50% ou mais dos isolados utiliza a fonte de carbono; V- = <50% dos isolados utilizam a fonte de carbono.

5.2. Identificação molecular

Os resultados da reação de PCR com os iniciadores específicos para as quatro espécies de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha bacteriana em pimentão e tomate, evidenciaram, consistentemente a amplificação de uma banda de DNA de 173 pb com os iniciadores BS-XeF e BS-XeR, que é característica da espécie *Xanthomonas euvesicatoria*. Não houve a amplificação de bandas de DNA, com exceção dos isolados tipos, para os iniciadores BS-XvF e BS-XvR, BS-XpF e BS-XpR e BS-XgF e BS-XgR, que são específicos respectivamente para as espécies *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. perforans*, conforme Koenraadt et al. (2009) (Figura 5).

Semelhante aos resultados Lue et al. (2010), em Taiwan, empregando os iniciadores RST13/14 e C-2-2L/2R, somente identificaram *X. euvesicatoria* em pimentão. As espécies *X. vesicatoria* e *X. perforans* foram observadas em tomateiro (LUE et al., 2010) e além dessas espécies, *X. euvesicatoria* e *X. gardneri* foram relatadas em tomateiro no Brasil (Quezado-Durval et al. 2010; Pereira et al. 2010 e Costa et al. 2012).

Na caracterização de isolados de *Xanthomonas* spp. de tomate de mesa realizado por Pereira (2010) houve predominância as espécies *X. perforans* (49,4%) e *X. gardneri* (40,7%). Costa et al (2012) obteve resultados semelhantes na análise da ocorrência e caracterização de espécies causadoras de mancha bacteriana do tomateiro de mesa, no Alto Vale do Rio do Peixe (SC) e observaram que 80% dos isolados foram identificados como *X. gardneri*, 11% *X. perforans* e 9% *X. vesicatoria*. Pereira et al. (2011) também observou em tomateiro industrial, que 53 isolados foram caracterizados como *X. perforans*, 33 isolados como *X. gardneri*, 6 isolados como *X. vesicatoria* e dois isolados como *X. euvesicatoria* nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil.

Segundo Araújo et al. (2012), a competitividade entre as espécies de *Xanthomonas* pode auxiliar no entendimento da prevalência de uma delas sobre as outras em determinada região. Foi observado na cultura do tomateiro que *X. perforans* apresenta vantagem competitiva sobre as demais, tornando-se desta forma a espécie prevalente (ARAÚJO et al., 2012), já na cultura do pimentão no Brasil, conforme relatado na presente pesquisa, e em Taiwan (LUE et al., 2010) prevalece *X. euvesicatoria*. Segundo dados da literatura *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* são identificados, principalmente, como os agentes causais da mancha bacteriana em tomateiro

(JONES et al., 2004; JONES et al., 2005; QUEZADO-DURVAL et al., 2005; PEREIRA et al., 2011), já para o pimentão foram identificados as espécies *X. euvesicatoria* (JONES et al., 2005; LUI et al., 2010) e *X. vesicatoria* (VAUTERIN et al., 1995).

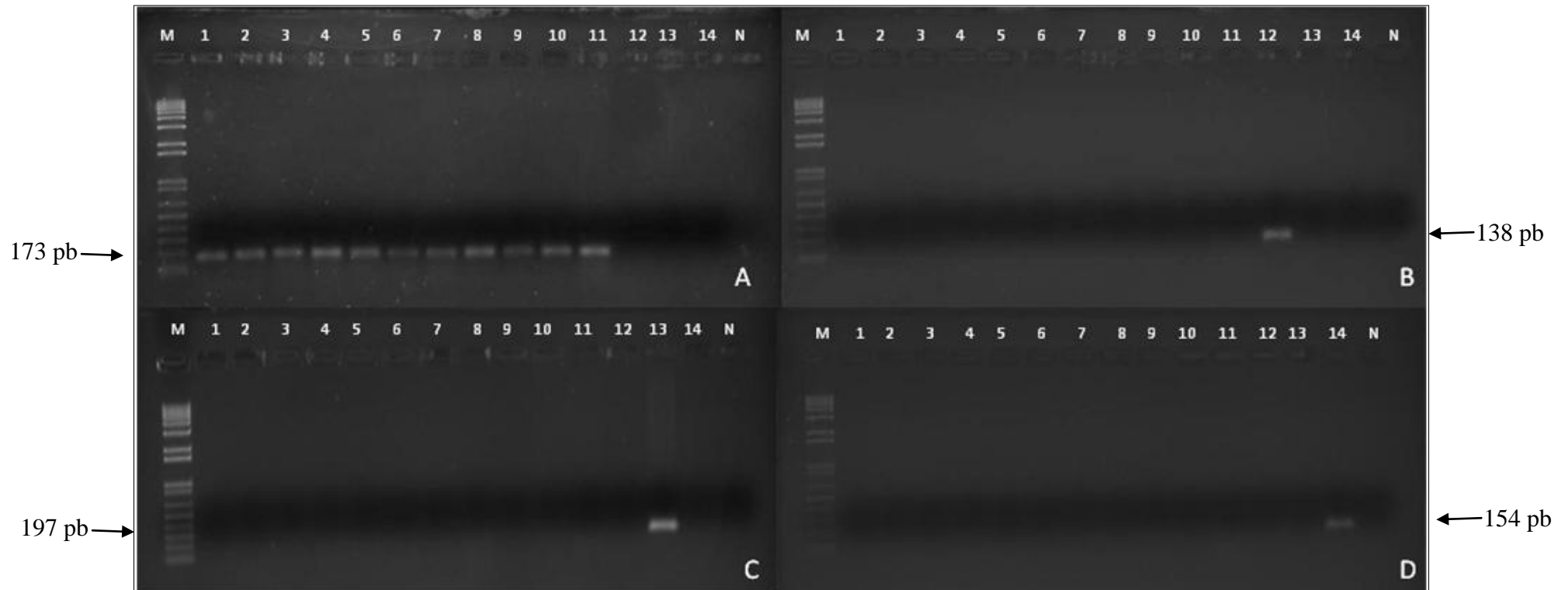


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos das ampliações de isolados de *Xanthomonas* spp. utilizando iniciadores específicos. M - Marcador Molecular; 1 - Isolado Xcv 02; 2 - Xcv 190; 3 - Xcv 191; 4 - Xcv 201; 5 - Xcv 202; 6 - Xcv 251; 7 - Xcv 258; 8 - Xcv 266; 9 - Xcv 287; 10 - P-13; 11 - IBSBF 2363 (*Xanthomonas euvesicatoria*); 12 - IBSBF 2364 (*Xanthomonas vesicatoria*); 13 - IBSBF 2370 (*Xanthomonas perforans*); 14 - IBSBF 2373 (*Xanthomonas gardneri*); N - Negativo. A - produto da PCR obtido com os iniciadores específicos para *X. euvesicatoria* (BS-XeF e BS-XeR); B - produto do PCR obtido com os iniciadores específicos para *X. vesicatoria* (BS-XvF e BS-XvR); C - produto do PCR obtido com os iniciadores específicos para *X. perforans* (BS-XpF e BS-XpR); D - produto do PCR obtido com os iniciadores específicos para *X. gardneri* (BS-XgF e BS-XgR).

5.3. Sensibilidade ao sulfato de cobre e ao sulfato de zinco

Os resultados referentes à avaliação da sensibilidade *in vitro* dos isolados de *Xanthomonas euvesicatoria*. ao sulfato de cobre, sulfato de zinco e a mistura destes compostos encontram-se na Tabela 5, Figura 6 e Apêndice 2. A Figura 6 ilustra a sensibilidade de 4 isolados às diferentes concentrações de sulfato de cobre.

Todos os isolados avaliados foram insensíveis ao sulfato de cobre e ao sulfato de zinco nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 13,6% dos isolados foram inibidos na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfato de cobre e 11,9% dos isolados foram inibidos na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de zinco. Na concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 35,6% e 42,4% dos isolados foram inibidos respectivamente para o sulfato de cobre e sulfato de zinco. Foi constatado o aumento na sensibilidade dos isolados à mistura dos produtos, sendo que a partir da concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ houve a inibição de 3,4% dos isolados, e 49,2% e 100% foram inibidos respectivamente nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Ward e O'Garro (1992), Ritchie e Dittapongpitch (1991) e Gore e O'Garro (1999) consideraram resistentes isolados de *Xanthomonas* spp. provenientes de pimentão e tomateiro aqueles que cresceram em meio de cultura contendo 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfato de cobre, enquanto Ward e O'Garro (1992) consideraram resistentes isolados que cresceram em meio de cultura contendo 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfato de zinco. Desta forma os isolados aqui avaliados foram predominantemente resistentes ao sulfato de zinco (100%) e ao sulfato de cobre (88,1%). Todos os isolados provenientes de Apodi-RN, Tinguá-CE, Nova Friburgo-RJ e Brasília-DF foram resistentes ao sulfato de cobre e ao sulfato de zinco. Acima de 80% dos isolados oriundos dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Belém foram resistentes ao sulfato de cobre (Tabela 5). Esse resultado deve-se ao uso intensivo há muitos anos de fungicidas cúpricos para o controle da mancha bacteriana o que levou a seleção de isolados resistentes a cobre, fato esse conhecido na literatura para o agente causal da mancha bacteriana do pimentão (RITCHIE e DITTAPONGPITCH, 1991; WARD e O'GARRO (1992); GORE e O'GARRO (1999); AGUIAR et al., 2000).

Vários trabalhos tem mostrado a sensibilidade e/ou resistência de *Xanthomonas* spp. de tomateiro e pimentão ao sulfato de cobre e/ou sulfato de zinco *in vitro*. Conforme Ward e O'Garro (1992) ao observarem que 61% e 64% dos isolados de *Xanthomonas* spp. de tomateiro e pimentão, por eles avaliados, foram resistentes

respectivamente ao sulfato de cobre ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e ao sulfato de zinco ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Resultados semelhantes foram obtidos por Ritchie e Dittapongpitch (1991) que observaram 63% dos isolados de *Xanthomonas* spp. de tomateiro e pimentão, resistentes a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cobre, em meio de cultura PSA, assim como o trabalho de Gore e Gorro (1999), em que 60% de isolados cresceram em meio de cultura NA suplementado com $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfato de cobre. Costa et al. (2012), também observaram resultado semelhante ao avaliarem a sensibilidade de espécies causadoras de mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC, em meio de cultura CYE, e observaram que 98% dos isolados foram sensíveis a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Já Quezado-Duval et al. (2003), Pereira (2010) e Araújo et al. (2012) não encontraram *Xanthomonas* spp de tomateiro, resistente ao sulfato de cobre na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Entretanto, os isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* aqui avaliados apresentaram aumento na sensibilidade quando os sulfatos de cobre e zinco foram misturados (Figura 7) devida à ação sinérgica. Esse fato foi semelhante ao observado por Maringoni e Kimati (1987c), com a mistura de fungicidas cúpricos e tiocarbamatos na inibição *in vitro* de isolados de *Xanthomonas* spp. de pimentão e tomateiro e também, em condições de campo, com a pulverização de óxido cuproso + mancozeb, para o controle da mancha bacteriana do pimentão. Desta maneira sugere-se o uso de formulações comerciais ou misturas de fungicidas que contenham produtos cúpricos e tiocarbamatos, em condições de campo, no manejo da mancha bacteriana do pimentão ao invés do uso apenas de produtos cúpricos.

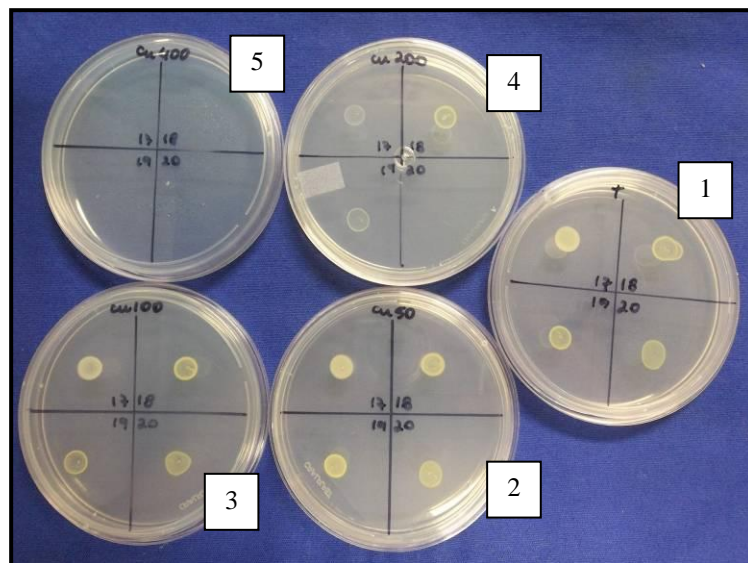


Figura 6: Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* de pimentão ao sulfato de cobre nas concentrações de 0 (1), 50 (2), 100 (3), 200 (4) e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (5).

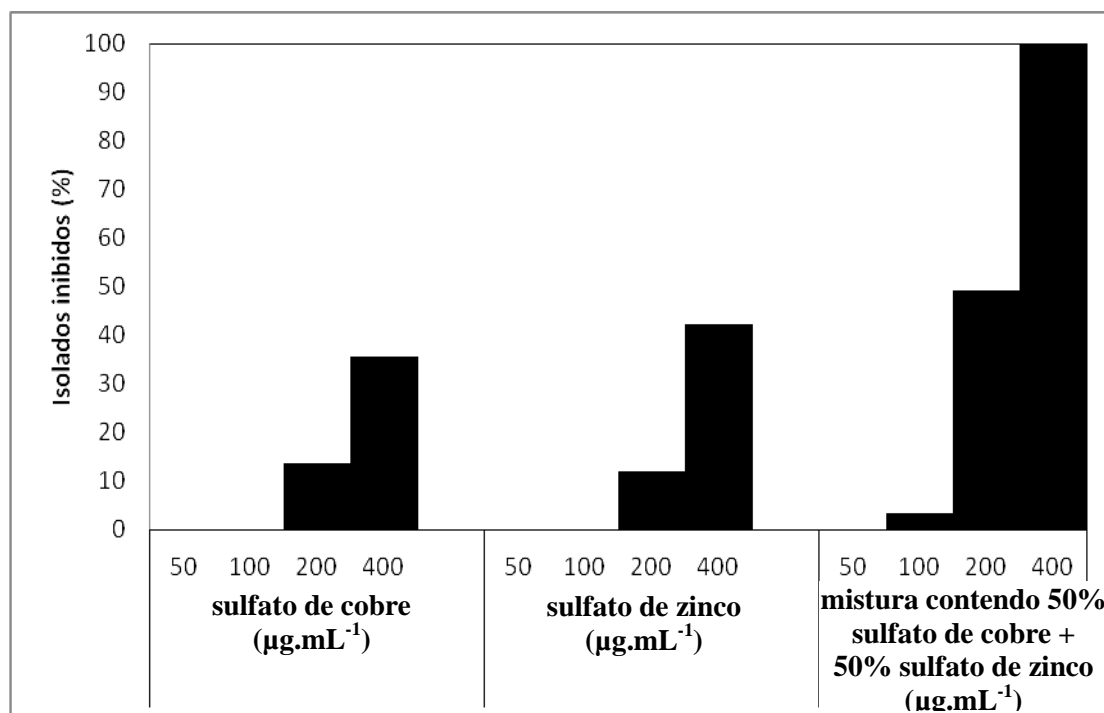


Figura 7: Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* de pimentão a diferentes concentrações de sulfato de cobre, sulfato de zinco e a mistura desses dois produtos.

Tabela 5: Porcentagem de inibição, no teste de sensibilidade *in vitro*, dos isolados de *Xanthomonas euvesicatoria*.

Produto	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Procedência dos isolados						
		Estado de SP (33) ^a	Belém – PA (8) ^a	Pouso Alegre – MG (5) ^a	Apodi – RN (5) ^a	Tinguá – CE (4) ^a	Nova Friburgo – RJ (2) ^a	Brasília – DF (1) ^a
sulfato de cobre	50	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0
	200	17,65	12,25	12,5	0	0	0	0
	400	41,18	25	40	0	50	50	0
sulfato de zinco	50	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0
	200	11,76	12,5	12,5	0	25	0	0
	400	38,24	25	80	40	75	0	0
sulfato de cobre + sulfato de zinco	50	0	0	0	0	0	0	0
	100	5,88	0	0	0	0	0	0
	200	35,29	50	60	40	50	0	0
	400	100	100	100	100	100	100	100

^a Número de isolados analisados.

6. CONCLUSÕES

Xanthomonas euvesicatoria é o principal agente causal da mancha bacteriana em pimentão nas regiões produtoras do Brasil;

Isolados de *X. euvesicatoria* aqui avaliados são predominantemente resistentes aos sulfatos de cobre e zinco *in vitro*, porém são sensíveis à mistura desses produtos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASKAVEG, JAMES E.; R. B. Hinel. Copper tolerance zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. **Plant Disease**, v. 69, n. 11, p. 993-996, 1985.

AGROFIT, Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso 24 de julho de 2013

AGUIAR, L.A.; KIMURA O.; CASTILHO, A.M.C.; CASTILHO, K.S.C.; RIBEIRO, R.L.D., AKIBA, F.; CARMO, M.G.F. Efeito de formulações cúpricas e cuprorgânicas na severidade da mancha-bacteriana e na população residente de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 1, março 2003, p. 44-50.

AGUIAR, L. A.; KIMURA, O.; CASTILHO, A. M.; CASTILHO, K. S. C.; RIBEIRO, R. L. D.; AKIBA, F.; CARMO, M. G. F. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. **Agronomia** v. 34, p. 78-82, 2000.

ARAÚJO, E.R.; PEREIRA, R.C; FERREIRA, M.A.S.V.; QUEZADO-DUVAL, A.M.; CAFÉ-FILHO, A.C. Sensitivity of xanthomonads causing tomato bacterial spot to copper and streptomycin and in vivo infra-specific competitive ability in xanthomonas perforans resistant and sensitive to copper. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 79-87, 2012.

BERAN, P.; MRÁZ, I. Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, v. 43, p. 213-215, 2013.

BOUZAR, H.; JONES, J. B.; STALL, R. E.; SOMODI, G. C., KELLY, R. O.; DAOUZLI, N. Phenotypic characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains from the Caribbean and Central America. **Phytopathology**, v. 84, p. 1069, 1994 a.

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**, v. 84, p. 39-44, 1994 b.

BOUZAR, H.; JONES, J.B; STALL, R.E.; HODGE, N.C.; MINSAVAGE, G.V.; BENEDICT, A.A.; ALVAREZ, A.M. Physiological, chemical, serological, and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. **Phytopathology**, v. 84, n. 7, p. 663-671, 1994 c.

BOUZAR, H. et al. Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper fields of Mexico. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 18, n. 1, p. 75-77, 1996.

BOUZAR, H.; JONES, J. B.; STALL, F. J.; LOUWS, R. E.; LOUWS, F. J.; SCHNEIDER, M.; RADEMAKER, J. L. W, BRUJIN, D. E.; JACKSON, L. E.; Multiphasic analysis of Xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology**, v.89, 328-335, 1999.

BRADBURY, John F. Guide to plant pathogenic bacteria. **CAB International**, 1986.

CABI; EPPO. Sheets on Quarantine Pests *Xanthomonas vesicatoria*, 1996.

CARMO, M.G.F.; MACAGNAN, D.; CARVALHO, A.D. Progresso da mancha bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inóculo e do emprego ou não do controle com oxiclóreto de cobre. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 210-215, 2001.

CASTRO, B.A; SOUZA, M.M.S.; REGUA-MANGIA, A.H.; BITTENCOURT, A.J. Caracterização genotípica de amostras de *Escherichia coli* isolados de mastite bovina. **Arquivos Brasileiros de medicina e zootecnia**. Vol. 63, nº2, pg. 515-517, 2011.

CASTRO, V. L. S. S. de. Uso de misturas de agrotóxicos na agricultura e suas implicações toxicológicas na saúde. **Jornal Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia**, v. 4, n. 1-3, 2009

CERQUEIRA-PEREIRA, E. C. et al. Efeito da aplicação de etileno na qualidade pós-colheita de frutos de pimentão vermelhos e amarelos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO/ PROHORT: Brasil, Séries históricas. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2013.

COOK, A.A.; STALL, R.E. Inheritance of resistance in pepper to bacterial spot. **Phytopathology**, v.53, p.1060–1062, 1963.

COOK, A.A.; GUEVARA, Y.G. Hypersensitivity in *Capsicum chacoense* to race 1 of the bacterial spot pathogen of pepper. **Plant Disease**, v. 68, p 329–330, 1984.

COSTA, J. R. et al. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p. 149-154, 2012.

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**, v. 90, n. 4, p. 451-458, 2006.

DELLAPORTA, S.L., WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 19-21, 1983.

FAO. FAOSTAT: Agricultural Statistics database. Rome, 2005. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 07 jun. 2013.

FILGUEIRA, F. A. R. Solanáceas. In: **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, p.242, 2008.

FINGER, F.L; SILVA, D.J.H.da. Cultura do pimentão e pimentos. In:Fontes, P.C.R. **Olericultura - teoria e pratica**. Viçosa, MG, cap. 27, p. 429, 2005.

FONTES, P. C. R.; DIAS, E. N; DERLY, J. H. S. Dinâmica do crescimento, distribuição de matéria seca e produção de pimentão em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 1, p. 94-99, jan-mar. 2005.

GARDE, S.; BENDER, CAROL L. DNA probes for detection of copper resistance genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 8, p. 2435-2439, 1991.

GORE, J. P.; O'GARRO, L. W. Reaction of *Xanthomonas campestris* from Bell Pepper and Tomato in Barbados to Chemical Control Agents. **Journal Phytopathology** 147, 397-402, 1999.

GOTO, R. e ROSSI, F. **Cultivo de Pimentão em Estufas** –Manual N°095. Viçosa, CPT, 1997. 66 p.

JONES, J. B. et al. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Plant Disease**, v. 79, n. 4, p. 395-398, 1995.

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

JONES, A. L.; BOUZAR, H.; STALL, R.E.; ALMIRA, E.C.; ROBERTS, P.D.; BOWEN, B.W.; SUDBERRY, J.; STRICKLER, P.M.; CHUN, J. Systematic analysis of *Xanthomonas* (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p.1211-1219. 2000.

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**, v. 27, 755-762, 2004.

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**, v. 695, p. 27-33, 2005.

KIM, B.S.; HARTMANN, R.W. Inheritance of a gene (Bs3) conferring hypersensitive resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Plant Disease**, v. 69, p. 233–235, 1985.

KOENRAADT, H.; VAN BETTERAY, B.; GERMAIN, R.; HIDDINK, G.; JONES, J. B.; OOSTERHOF, J.; RIJLAARSDAM, A.; ROORDA, P.; WOULDY, B. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. **Acta Horticulturae** 808, 99-102, 2009.

KORNEV, K. P.; MATVEEVA, E. V.; PEKHTEREVA, E. SH.; POLITYKO, V. A.; IGNATOV, A. N.; PUNINA, N. Y.; SCHAAD, N. W.; *Xanthomonas* species causing bacterial spot of tomato in the Russian Federation, **Acta Horticulturae**. 808, LSHS 2009.

KUROZAWA, C; PAVAN, M. A; KRAUSE-SAKATE. R. Doenças das solanáceas. In: KIMATI, H. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 591-592, 2005.

LEITE JR, R. P.; JONES, J. B.; SOMODI, G. C.; MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. **Plant Disease**, v. 79, n. 9, p. 917-922, 1995.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. Doenças do Pimentão. **Embrapa Hortaliças**. Brasília - DF, 2003.

LUE, Y. S.; DENG, W. L.; WU, Y. F.; CHENG, A. S.; HSU, S. T.; TZENG, K. C. Characterization of *Xanthomonas* associated with bacterial spot of tomato and pepper in Taiwan. **Plant Pathology Bulletin** v. 19, p. 181-190, 2010.

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**, v. 67, n. 7, p. 779-781, 1983.

MARINGONI, A. C. **Caracterização de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doigde) Dye de pimentão (*Capsicum annum* L.) e de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) através de patogenicidade, sorologia, hidrólise de amido e sensibilidade a drogas**. 1986, 80f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Piracicaba, 1986.

MARINGONI, A. C.; KUROZAWA.; BARBOSA, V.; SILVA NETO, J. M. Controle químico da mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (DOIDGE DYE) do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Summa Phytopathologica**, v. 12, n.1, p.92-101; 1986.

MARINGONI, A.C.; KIMATI, H. a Caracterização patogênica e hidrólise de amido em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, p. 325-333, 1987 a.

MARINGONI, A.C.; KIMATI, H. Diferenciação sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.322-324, 1987 b.

MARINGONI, A.C.; KIMATI, H. Sensibilidade in vitro de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye de pimentão e de tomateiro a drogas. **Summa Phytopathologica** v. 13, p. 160-171; 1987 c.

MARINGONI, A. C. Técnicas em fitobacteriologia. Botucatu: FEPAF, 2010. 70p

MIRIK, M. AYSAN, Y. CINAR O. Copper-resistant strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) dye in the eastern mediterranean region of Turkey. **Journal of Plant Pathology**, v. 89, p. 153-154; 2007.

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

MINSAVAGE, G. V.; DAHLBECK, D.; WHALEN, V.; KEARNEY, B.; BONAS, U.; STASKAWICZ, B. J.; STALL, R. E. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper interactions. **Molecular Plant Microbe Interactions**, vol. 3, n°1, p41-47, 1990.

MOREIRA, S.O., SILVA, M.G.M., RODRIGUES, R., VIANA, A.P., PEREIRA, M.G. Breeding methods and history of bean cultivars released in CBAB - Crop Breeding and Applied Biotechnology. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, n.4, p.345-350, 2010.

MOREIRA, S. O. **Caracterização morfológica e molecular de pré-cultivares de *Capsicum annuum* L. com resistência à mancha-bacteriana.** 2012, 124f. Dissertação (Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Estadual Norte Fluminense “Darcy Ribeiro”, Campos Goytacazes, 2012.

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**, v. 49, n. 4, p. 466-471, 2009.

PEREIRA, R. DA C. **Ocorrência, caracterização e identificação das espécies de *Xanthomonas* causadoras de mancha bacteriana em tomate para mesa no Brasil.**

2010, 77f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

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. In: **III International Symposium on Tomato Diseases**, 914, p. 61-64, 2011.

POHRONEZNY, K.; HEWIT, M.; INATE, J.; DATANOFF, F. Wind and Wind-generated sand injury as factors in infection of papper by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Plant Disease**, v. 76, p.1036-1039, 1992.

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**, v. 21, p. 672-677, 2003.

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.

QUEZADO-DUVAL, A.M.; LOPES, C.A.; LEITE JÚNIOR, R.P.; LIMA, M.F.; CAMARGO, L.E.A. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 695, p. 101-108, 2005.

QUEZADO-DUVAL A.M.; LOPES, C.A. Mancha bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. Embrapa Hortaliças. Brasília-DF. **Circular Técnica 84**, 2010.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. Capsicum pimentas e pimentões do Brasil. Brasília: **Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/ Embrapa Hortaliças**, P.14-46, 2000.

RITCHIE, D. F.; DITTAPONGPITCH, V. Copper-and streptomycin-resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. **Plant Disease**, v. 75, n. 7, p. 733-736, 1991.

ROBBS, C. F. Principais pragas e doenças das plantas cultivadas no Distrito Federal. **Agronomia**, v 12, 1953.

ROMEIRO, R.S. Medidas gerais de controle de fitobacterioses. In: **Bactérias Fitopatogênicas**. Viçosa MG. UFV, p. 293-323, 1995.

SAHIN F. 1997. **Detection, identification and characterization of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by traditional and molecular methods, and resistance in *Capsicum* species to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper race 6**. PhD thesis. Ohio State Univ., Columbus. 182 p, 1997.

SAHIN, F.; MILLER, S. A. A source of resistance in *Capsicum* spp. accessions to pepper race 6 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In: Abstr.) **Phytopathology**. 1997. p. 84.

SAKATA. Pimentão Dahra RX. Bragança Paulista: Sakata Seed Sudamerica. 2013. Disponível em <<http://www.sakata.com.br/produtos/hortalicas/solanaceas/pimentao>>. Acesso em: 17 dez. 2013.

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 ed. St. Paul: **APS Press** 2001.

SEMINIS. Impacto. St. Louis: Seminis Grow Forward. 2012. Disponível em , <http://www.seminis.com/global/br/products/Pages/Impacto.aspx>>. Acesso em: 17 dez. 2013.

STALL, R.E.; LOSCHKE, D.C.; JONES, J.B. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Phytopathology**, v.76, n2, p.240-242, 1986.

STALL RE, BEAULIEU C, EGEL D, HODGE NC, LEITE RP. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 44:47–53, 1994.

SYNGENTA. Pimentão Híbrido Commandant. São Paulo: Syngenta do Brasil. 2013. Disponível em: < <http://www.syngenta.com/country/br/pt/produtosemarcas/sementes/vegetais/Pages/pimentao-hibrido-commandant.aspx>>. Acesso em: 17 dez. 2013.

VAUTERIN L, HOSTE B, KERSTERS K, SWINGS J. Reclassification of *Xanthomonas*. International Union of Microbiological societies int. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.472–489, 1995.

WARD, H.P.; O' GARRO, L.W. Bacterial spot of pepper and tomato in Barbados. **Plant Disease**, v. 76, p. 1046-1048, 1992.

TETAZ, T. J.; LUKE, R. K. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 3, p. 1263-1268, 1983.

APÊNDICE 1

Reações das 13 fontes de carbono para as quatro espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana em pimentão.

Fontes de carbono (Microplaca GN2)													
Isolados	Dextrina	Glicogênio	N-acetil-D-glucosamina	D-galactose	Gentibiose	a-D-lactose lactulose	Ácido acético	Ácido cis-aconítico	Ácido malônico	Ácido propiônico	D-alanina	Glicil-L-ácido aspártico	L-treonina
Xcv 01	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Xcv 02	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Xcv 53	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Xcv 54	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Xcv 62	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Xcv 70	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
Xcv 81	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Xcv 93	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Xcv 96	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
Xcv 97	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Xcv 98	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Xcv 154	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Xcv 157	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Xcv 188	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-

continua...

continuação...

Fontes de carbono (Microplaca GN2)													
Isolados	Dextrina	Glicogênio	N-acetil-D-glucosamina	D-galactose	Gentibiose	a-D-lactose lactulose	Ácido acético	Ácido cis-aconítico	Ácido malônico	Ácido propiônico	D-alanina	Glicil-L-ácido aspártico	L-treonina
Xcv 190	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
Xcv 191	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Xcv 198	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Xcv 199	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Xcv 201	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Xcv 202	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Xcv 207	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Xcv 209	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Xcv 214	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Xcv 215	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Xcv 216	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Xcv 218	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Xcv 219	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
Xcv 231	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Xcv 232	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
Xcv 233	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Xcv 236	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+

continua...

continuação...

Fontes de carbono (Microplaca GN2)

Isolados	Dextrina	Glicogênio	N-acetil-D-glucosamina	D-galactose	Gentibiose	a-D-lactose lactulose	Ácido acético	Ácido cis- aconítico	Ácido malônico	Ácido propiônico	D-alanina	Glicil-L-ácido aspártico	L-treonina
Xcv 237	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Xcv 238	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Xcv 239	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Xcv 240	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Xcv 242	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Xcv 248	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Xcv 249	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
Xcv 250	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Xcv 251	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Xcv 252	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Xcv 253	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Xcv 255	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Xcv 256	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Xcv 257	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Xcv 258	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Xcv 259	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
Xcv 261	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+

continua...

APÊNDICE 2

Resultado do teste de sensibilidade *in vitro* dos isolados de *Xanthomonas euvesicatoria*.

Isolado	sulfato de cobre ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				sulfato de zinco ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				sulfato de cobre e sulfato de zinco ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	50	100	200	400	50	100	200	400	50	100	200	400
Xcv 01	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Xcv 02	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Xcv 53	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Xcv 54	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Xcv 62	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Xcv 70	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Xcv 81	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 93	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Xcv 96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 97	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 98	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 154	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Xcv 157	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Xcv 188	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Xcv 190	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Xcv 191	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Xcv 198	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Xcv 199	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Xcv 201	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 202	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

continua...

continuação...

Isolado	sulfato de cobre ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				sulfato de zinco ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				sulfato de cobre e sulfato de zinco ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	50	100	200	400	50	100	200	400	50	100	200	400
Xcv 207	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 214	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Xcv 215	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Xcv 216	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 218	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 219	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 231	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Xcv 232	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Xcv 233	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 236	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Xcv 237	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 238	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 239	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 240	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Xcv 242	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Xcv 248	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Xcv 249	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Xcv 250	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 251	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 252	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Xcv 253	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Xcv 255	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Xcv 256	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Xcv 257	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-

continua...

