

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio**

Caracterização de *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp., em tomate para mesa (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), no estado de São Paulo e avaliação da sensibilidade de *Xanthomonas perforans* a casugamicina

Eros Molina Occhiena

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

**São Paulo
2018**

Eros Molina Occhiena

Caracterização de *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp., em tomate para mesa (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), no estado de São Paulo e avaliação da sensibilidade de *Xanthomonas perforans* a casugamicina

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Prof.º Dr. Luís Otávio Saggion Beriam

São Paulo
2018

Eu, Eros Molina Occhiena, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico, ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB, para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela internet, desde que citada a fonte.

Assinatura: 

Data 04/10/2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Occhiena, Eros Molina.

Caracterização de *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp., em tomate para mesa (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), no Estado de São Paulo e avaliação da sensibilidade de *Xanthomonas perforans* a kasugamicina. / Eros Molina Occhiena. - São Paulo, 2018.

66 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2018D.EO020

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Luís Otávio Saggion Beriam.

Versão do título para o inglês: Characterization of *Xanthomonas* spp. and *Pseudomonas* spp., in fresh tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), in São Paulo State, and evaluation of *Xanthomonas perforans* sensitivity to kasugamicina.

1. *Xanthomonas perforans* 2. *Lycopersicon* 3. Bacterioses 4. Levantamentos
5. Controle I. Bortolossi, Bárbara Fernanda II. Beriam, Luís Otávio Saggion III.
Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2018/020

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Eros Molina Occhiena

Título: Caracterização de *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp., em tomate para mesa (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), no estado de São Paulo e avaliação da sensibilidade de *Xanthomonas perforans* a casugamicina.

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 04 / 10 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof.º Dr. Luís Otávio Saggion Beriam – Instituto Biológico

Julgamento: APROVADA

Prof.ª Dra.: Flávia Rodrigues Alves Patrício – Instituto Biológico

Julgamento: APROVADA

Prof.ª Dra. Margarida Fumiko Ito – Instituto Agronômico - IAC

Julgamento: APROVADA

A neve e as tempestades matam as flores, mas
nada podem contra as sementes.

(Khalil Gibran)

AGRADECIMENTOS

Aos professores e pesquisadores do Instituto Biológico, pelo carinho com que ministram suas aulas e nos recebem.

Ao Prof.^o Dr. Luís Otávio Saggion Beriam, pela oportunidade de desenvolvimento profissional, amizade, incansável orientação e estímulo.

À Prof.^a Suzete Aparecida Lanza Destéfano, pelas sugestões e momentos compartilhados.

À colega Mariana Ferreira Tonin, pela orientação e trabalho na identificação dos materiais coletados à campo.

À prof.^a Dra. Flávia Rodrigues Alves Patrício, pelo incentivo e sugestões para a elaboração deste trabalho.

À prof.^a Dra. Margarida Fumiko Ito pelo apoio, amizade e exemplo de dedicação ao trabalho.

Ao prof.^o Dr. Marcelo Eiras, coordenador da pós-graduação, por ser um facilitador e permitir que nossas atividades fluíssem dentro da mais perfeita normalidade.

Aos pesquisadores Eduardo Monteiro de Campos Nogueira e Josiane Takassaki Ferrari, pelos anos de amizade e trabalho de parceria.

À Arysta LifeScience do Brasil, por apoiar meu trabalho e me proporcionar tranquilidade para buscar novos desafios.

Aos colegas Alcindo Galvão, João Leite, Mauro Soares, Dorival Boer e Gustavo Gonella do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Agrícola da Arysta LifeScience, pelo suporte na condução dos trabalhos.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico, Karen, Bárbara, Mariana, Marcel, pela troca de experiência e amizade.

Aos colegas Edson Kobayashi, Luiz Martins, Marco Roberto do Amaral, Alexandre Santos e João Dias, pelo auxílio na coleta de amostras e visitas nas áreas de produtores.

À minha esposa Maria Ângela e meu filho Daniel, pela compreensão, apoio, estímulo, auxílio e paciência, alicerces e forças que impulsionam minha vida.

Aos meus pais Américo e Nair, que descansam no oriente eterno, pela minha formação, pelo carinho e cuidados que sempre me dispensam.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp., EM TOMATE PARA MESA (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), NO ESTADO DE SÃO PAULO E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Xanthomonas perforans* A CASUGAMICINA

Campinas, SP, 2018, Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, Instituto Biológico.

Existe um complexo de manchas foliares, causadas por bactérias, que ocorrem na região produtora de tomate para mesa (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), no estado de São Paulo. Este complexo de doenças é causado principalmente pelas espécies de *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp. Dependendo das condições climáticas, o nível de dano que causam é expressivo. Este trabalho teve como objetivo levantar quais espécies de *Xanthomonas* e *Pseudomonas* estão presentes, nas principais regiões produtoras de tomate para mesa, no estado de São Paulo e avaliar a sensibilidade de *Xanthomonas perforans* ao fungicida-antibiótico casugamicina, *in vitro* e *in vivo*, com aplicações preventivas e curativas em mudas com 3 a 4 folhas verdadeiras, completamente expandidas. Foram coletadas 50 amostras com sintomas de doença, em diferentes locais e 34 isolamentos foram identificados ao nível de espécie, por meio de testes bioquímicos e PCR (*Polymerase Chain Reaction*), no período de julho de 2016 a maio de 2017. Dos 34 isolados, 20 foram identificados como *X. perforans*; 7 como *P. syringae*; 4 como *Xanthomonas gardneri*; 1 como *X. vesicatoria* e 1 como *P. cichorii*. Três isolados de *Xanthomonas perforans*, escolhidos pela maior severidade de dano nos testes de patogenicidade, foram avaliados *in vitro*, quanto a sensibilidade a casugamicina, incorporada ao meio NA, nas concentrações de 60; 80; 100; e 120 ppm. As suspensões bacterianas foram ajustadas à uma concentração de 10^4 UFC/mL e 100 μ L de cada suspensão foram distribuídas nas placas, com diferentes concentrações de casugamicina e incubadas em estufa a 28 °C por 72h, para contagem do número de colônias formadas após este período. Para os três isolados, nenhum crescimento de colônias foi observado na concentração de casugamicina a 120 ppm. Dois deles apresentaram crescimento de colônias para as concentrações de casugamicina a 60; 80 e 100 ppm e um isolado não cresceu na concentração de casugamicina a 100 ppm. O número de colônias diminuiu com o aumento da concentração no meio de cultura. Para avaliação do efeito de casugamicina *in vivo*, no tratamento preventivo, foram realizadas duas pulverizações com casugamicina nas concentrações de 6; 8; 10 e 12 g i.a. 100 L^{-1} , com intervalos de 4 dias, e 24h após a segunda pulverização, foi realizada uma inoculação com *Xanthomonas perforans*, com uma suspensão ajustada para a concentração de 3×10^8 UFC/mL, borrifadas nas superfícies

abaxial e adaxial das folhas. Como controles foram usadas uma testemunha sem inoculação e uma testemunha inoculada. Após a inoculação as plantas permaneceram em câmara úmida por 72 h e após este período foram dispostas em casa de vegetação, em um delineamento experimental de blocos ao acaso. A severidade de doença nas folhas foi avaliada aos 8; 11 e 19 dias após a segunda aplicação, determinando-se a percentagem de área foliar afetada com a utilização do software Leaf Doctor. Na condição de aplicação preventiva, os tratamentos com casugamicina reduziram a severidade de doença nas folhas, de forma significativa, até os onze dias após o tratamento, com reflexos positivos no peso da matéria seca da parte aérea. Em uma condição curativa, com uma aplicação após 72 h da inoculação, não houve controle da doença.

Palavras-chave: *Xanthomonas perforans*, *Lycopersicon*, bacterioses, levantamento, caracterização, controle.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF *Xanthomonas* spp. and *Pseudomonas* spp., IN FRESH TOMATO *Lycopersicon esculentum*, Mill.), IN SÃO PAULO STATE, AND EVALUATION OF *Xanthomonas perforans* SENSITIVITY TO KASUGAMYCIN.

Campinas, SP, 2018, Master's Thesis of the Postgraduate Program in Health, Food and Environmental Security in Agribusiness, Instituto Biológico.

Several leaf spots caused by bacteria occur in fresh tomato, in the main producing area in São Paulo state, Brazil, and they are caused mainly by species of *Xanthomonas* spp. and *Pseudomonas* spp. Depending on the climatic conditions, they can affect the production significantly. The objectives of this work were to identify the species of *Xanthomonas* spp and *Pseudomonas* spp in fresh tomato in São Paulo state and check the sensitivity of *Xanthomonas perforans* to fungicide-antibiotic kasugamycin, *in vitro* and *in vivo* under preventative and curative applications. Fifty samples of the tomato plants, with bacterial symptoms were collected at different sites, and 34 isolates were selected of this material, based on morphological aspect of the colonies, and pathogenic tests. After that they were identified by biochemical tests and PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Among the 34 isolates, 20 were identified as *Xanthomonas perforans*; 7 as *Pseudomas syringae*; 4 as *Xanthomonas gardneri*, 1 as *Xanthomonas vesicatoria* and 1 as *Pseudomonas cichorrii*. Three isolates of *Xanthomonas perforans* were chosen based on damages, they have caused during pathogenic tests, to check their *in vitro* sensitivity to kasugamycin, that was added into AN medium at 60; 80; 100 and 120 ppm. The bacteria suspensions were adjusted to 10^4 CFU/mL, and 100 μ L of each suspension were plated at different kasugamycin concentrations and incubated at 28°C. After 72h the number of colonies formed were counted. For all three isolates, no colonies growth was observed at 120 ppm of kasugamycin. Two of the isolates showed growth at the 60; 80 and 100 ppm of kasugamycin, and one isolate did not growth at 100 ppm kasugamycin concentration. To evaluate the preventative effect of casugamycin *in vivo*, two sprays were performed with kasugamycin at concentrations of 6; 8; 10 and 12 g a.i. 100L⁻¹, at 4 days intervals, and 24 h after the second spray, an inoculation with *Xanthomonas perforans* was done at 3×10^8 CFU / mL . The suspension was sprayed on the abaxial and adaxial surfaces of the leaves. There were one inoculated, and uninoculated controls also, after inoculation the plants were kept in a humid chamber for 72 h and after this period were arranged in a randomized

block design in the greenhouse. Leaf disease severity was evaluated at 8; 11 and 19 days after the second application, determining the percentage of diseased area with the Leaf Doctor software. In the condition of preventative application, treatments with kasugamycin reduced the severity of the leaf disease, significantly up to eleven days after treatment, with positive reflections on shoot dry matter weight. In a curative condition, with an application after 72 h of inoculation, there was no control of the disease.

Key words: *Xanthomonas perforans*, *Lycopersicon*, bacterial, survey, characterization, control.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Principais países produtores de tomate do mundo, em área plantada (Ha) – 2014.. | 18 |
| Tabela 2- Principais países produtores de tomate no mundo, em quantidade de produção (toneladas) – 2014. | 18 |
| Tabela 3 -Área colhida em hectares e produção em toneladas de tomate nas regiões produtoras brasileiras – 2016..... | 19 |
| Tabela 4 - Área colhida de tomate (ha) e produção (t) nos estados da região Sudeste do Brasil – 2016. | 19 |
| Tabela 5 -Estimativa do número de plantas de tomate para mesa, em milhões de pés, nas principais regiões produtoras do Brasil – 2016. | 20 |
| Tabela 6. Área colhida de tomate no estado de São Paulo por município, em hectares – 2016 | 23 |
| Tabela 7 –Municípios do estado de São Paulo, cultivares declarados, data da coleta, coordenadas geográficas e altitude nos pontos amostrados - São Paulo – 2016 – 2017 | 32 |
| Tabela 8 - Linhagens de <i>Xanthomonas</i> patogênicas ao tomateiro..... | 35 |
| Tabela 9 - Tratamentos avaliados em mudas de tomate Santa Clara, em condições de casa-de-vegetação, no controle de <i>Xanthomonas perforans</i> - Pereiras-SP – 2018 | 38 |
| Tabela 10 - Parâmetros de pulverização na avaliação do efeito preventivo de casugamicina no controle de <i>Xanthomonas perforans</i> em tomate - Pereiras - SP - 2018..... | 39 |
| Tabela 11- Parâmetros de pulverização na avaliação do efeito curativo da casugamicina no controle de <i>Xanthomonas perforans</i> em tomate - Pereiras - 2018 | 42 |
| Tabela 12 - Dados de temperatura, temperatura máxima e mínima, umidade relativa e umidade relativa máxima e mínima durante o período de condução do teste <i>in vivo</i> , em condições de casa-de-vegetação - Pereiras-SP- 2018..... | 43 |
| Tabela 13 – Municípios de coleta, cultivar de tomate declarado, coordenadas geográficas e espécie de bactéria - São Paulo-SP - 2018 | 47 |

| | |
|---|----|
| Tabela 14 - Número de colônias de <i>Xanthomonas perforans</i> , procedente do município de Quadra-SP, em diferentes concentrações de casugamicina, fundida em meio NA, 72 horas após a incubação a 28°C..... | 50 |
| Tabela 15 - Número de colônias de <i>Xanthomonas perforans</i> , procedente do município de Sumaré - SP, em diferentes concentrações de casugamicina, fundida em meio NA, 72 horas após a incubação a 28°C | 51 |
| Tabela 16 - Número de colônias de <i>Xanthomonas perforans</i> , procedente do município de Mogi Guaçu - SP, em diferentes concentrações de casugamicina, fundida em meio NA, 72 horas após a incubação a 28°C..... | 51 |
| Tabela 17 - Severidade de área foliar afetada (%) por <i>Xanthomonas perforans</i> em mudas de tomate Santa Clara, em condição de casa-de-vegetação, com duas aplicações preventivas de casugamicina e inoculação após 24 h da segunda pulverização - Pereiras - SP - 2018. | 52 |
| Tabela 18 - Percentagem de eficiência no controle de <i>Xanthomonas perforans</i> em mudas de tomate Santa Clara, em condição de casa-de-vegetação, com duas aplicações preventivas de casugamicina e inoculação após 24 h da segunda pulverização - Pereiras - SP - 2018 | 53 |
| Tabela 19 - Controle preventivo de <i>Xanthomonas perforans</i> em tomate, com casugamiciana, expresso pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), percentagem de eficiência, peso seco de folhas (g), número e peso de frutos (g) - Pereiras - SP - 2018..... | 55 |
| Tabela 20 - Severidade de área foliar afetada (%) por <i>Xanthomonas perforans</i> em mudas de tomate Santa Clara, com uma pulverização curativa de casugamicina, 72 h após inoculação - Pereiras - SP - 2018 | 59 |
| Tabela 21 - Percentagem de eficiência no controle de <i>Xanthomonas perforans</i> em mudas de tomate Santa Clara, com uma pulverização curativa de casugamicina 72 h após a inoculação - Pereiras - SP - 2018 | 59 |
| Tabela 22 - Controle de <i>Xanthomonas perforans</i> em tomate, com uma pulverização curativa, 72 h após inoculação, expresso pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), eficiência (%), peso seco de folhas (PS) e peso de frutos (PF) - Pereiras - SP - 2018 | 60 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Gráfico da distribuição percentual dos produtos comerciais registrados para mancha bacteriana do tomate (<i>Xanthomonas</i> spp.) no Brasil. Outubro 2017..... | 15 |
| Figura 2 - Gráfico da evolução da área colhida em hectares e rendimento médio em kg/ha para a cultura do tomate no Brasil, no período 2007 a 2016..... | 20 |
| Figura 3 - Gráfico dos valores, em milhões de reais (R\$) das principais frutas e hortaliças comercializadas na CEAGESP, entreposto de São Paulo-SP - 2016. | 21 |
| Figura 4 - Principais municípios do estado de São Paulo, que forneceram tomate de mesa para a CEAGESP- São Paulo, de janeiro a dezembro de 2016. | 22 |
| Figura 5- Faixa de coleta das amostras, na principal região produtora de tomate para mesa do Estado de São Paulo. | 31 |
| Figura 6 - Sintomas de bacterioses em diferentes partes do tomateiro: A. Cálice; B. Folha e C. Pecíolo | 33 |
| Figura 7 - Fases do isolamento de bactéria em tomate; antes da repicagem (A) e desenvolvimento das colônias selecionadas e repicadas (B)..... | 33 |
| Figura 8 - Mudanças de tomate emergidas em espuma fenólica (A), mudas transplantadas para substrato de fibra de coco já desenvolvidas (B). | 35 |
| Figura 9 - Plantas de tomate em câmara úmida 24 horas antes e 72 horas após inoculação com <i>Xanthomonas perforans</i> . Câmara úmida fechada (A) e visão no interior da câmara com umidificação (B)..... | 39 |
| Figura 10 - Imagem original da amostra de folha com sintomas de <i>Xanthomonas</i> spp. (A) e imagem ajustada com o auxílio do software Leaf Doctor para avaliação de área lesionada (B). | 40 |
| Figura 11 - Condição da muda de tomate após capação da haste principal. | 41 |
| Figura 12 - Planta de tomate em vaso, em condições de casa-de-vegetação, com formação de frutos na primeira inflorescência. | 41 |

| | |
|---|----|
| Figura 13 - Diferenças na expressão dos sintomas da mancha bacteriana do tomateiro entre <i>Xanthomonas gardneri</i> (A) e <i>Xanthomonas perforans</i> (B) em condição de casa-de-vegetação. | 44 |
| Figura 14 - Amostra de folha de tomate coletada no campo com sintomas de bacterioses (A); isolamento com colônias típicas de <i>Pseudomonas</i> spp. (B); teste de patogenicidade positivo para <i>Pseudomonas</i> spp. (C); colônias típicas de <i>Xanthomonas</i> spp. (D) e teste de patogenicidade positivo para <i>Xanthomonas</i> spp. | 45 |
| Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 2,5% da amplificação do DNA de diferentes linhagens, IBSBF 2363 linhagem Tipo de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> , IBSBF 2370 linhagem Tipo de <i>Xanthomonas perforans</i> | 46 |
| Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 2,5% da amplificação do DNA de diferentes linhagens, IBSBF 2364 linhagem tipo de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> , IBSBF 2373 linhagem tipo de <i>Xanthomonas gardneri</i> | 46 |
| Figura 17 - Distribuição percentual de espécies bacterianas, encontradas na área de produção de tomate para mesa, no estado de São Paulo - 2016-17. | 48 |
| Figura 18 - Frequência de distribuição de cultivares de tomate para mesa encontradas na região produtora do estado de São Paulo - 2016-17. | 49 |
| Figura 19 - Curva de progresso de severidade de <i>Xanthomonas perforans</i> em pulverização preventiva de casugamicina a 6, 8, 10 e 12 g i.a. 100 L ⁻¹ , em mudas de tomate Santa Clara, em condições de casa-de-vegetação. Pereiras-SP, 2018. | 54 |
| Figura 20 - Foto comparativa da testemunha inoculada e do tratamento preventivo com casugamicina a 6 g i.a. 100 L ⁻¹ , em tomate Santa Clara, no controle de <i>Xanthomonas perforans</i> , 12 dias após a inoculação. Pereiras-SP-2018. | 56 |
| Figura 21 - Foto comparativa da testemunha inoculada e do tratamento preventivo com casugamicina a 8 g i.a. 100 L ⁻¹ , em tomate Santa Clara, no controle de <i>Xanthomonas perforans</i> , 12 dias após a inoculação - Pereiras-SP - 2018. | 56 |

- Figura 22 - Foto comparativa da testemunha inoculada e do tratamento preventivo com casugamicina a 10 g i.a.100 L⁻¹, em tomate Santa Clara, no controle de *Xanthomonas perforans*, 12 dias após a inoculação - Pereiras-SP – 2018..... 57
- Figura 23 - Foto comparativa da testemunha inoculada e do tratamento preventivo com casugamicina a 12 g i.a.100 L⁻¹ em tomate Santa Clara, no controle de *Xanthomonas perforans*, 12 dias após a inoculação - Pereiras-SP - 2018. 57
- Figura 24 - Foto comparativa da testemunha inoculada, testemunha não inoculada e do tratamento preventivo com casugamicina a 6 g i.a. 100 L⁻¹, em tomate Santa Clara, no controle de *Xanthomonas perforans*, 12 dias após a inoculação. Pereiras-SP, 2018.58
- Figura 25 - Desenvolvimento vegetativo de uma muda tratada preventivamente com casugamicina (A) e uma testemunha inoculada (B) - Pereiras-SP - 2018.....61

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| LISTA DE TABELAS..... | v |
| LISTA DE FIGURAS..... | vii |
| SUMÁRIO..... | x |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 OBJETIVOS..... | 16 |
| 2.1 Gerais | 16 |
| 2.1.1 Levantar as principais bacterioses que ocorrem em folhas, em tomate para mesa, nas principais regiões produtoras do estado de São Paulo;..... | 16 |
| 2.1.2 Caracterizar os isolados bacterianos quanto a patogenicidade;..... | 16 |
| 2.1.3 Identificar os isolados, ao nível de espécie, através de rep-PCR, testes bioquímicos e fisiológicos..... | 16 |
| 2.2 Específicos..... | 16 |
| 2.2.1 Avaliar a sensibilidade, da espécie bacteriana predominante na área, ao ingrediente ativo casugamicina, <i>in vitro</i> ;..... | 16 |
| 2.2.2 Avaliar a eficiência do ingrediente ativo casugamicina, <i>in vivo</i> , em mudas de tomate, numa condição de tratamento preventivo e curativo. | 16 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA..... | 17 |
| 3.1 A cultura do tomate no estado de São Paulo | 17 |
| 3.2 Mancha bacteriana em tomate, causada por <i>Xanthomonas</i> spp..... | 23 |
| 3.3 Pinta bacteriana, mancha bacteriana pequena, ou pústula bacteriana causada por <i>Pseudomonas syringae</i> no tomateiro | 29 |
| 3.4 Produtos fitossanitários utilizados no controle de doenças bacterianas em tomateiro | 29 |
| 3.5 Fungicida-antibiótico casugamicina registrado no Brasil | 30 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 4.1 Coleta de material e isolamento de bactérias do tomateiro | 31 |
| 4.2 Manutenção e purificação dos isolados bacterianos de tomate | 34 |
| 4.3 Patogenicidade dos isolados bacterianos de tomate | 34 |
| 4.4 Identificação das espécies de <i>Xanthomonas</i> spp. , pela caracterização molecular dos isolados coletados no campo | 35 |
| 4.4.1 Reativação e condições de cultivo das linhagens bacterianas do tomate | 36 |
| 4.4.2 Extração de DNA genômico das amostras patogênicas ao tomate..... | 36 |

| | |
|---|----|
| 4.4.3 Amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) | 36 |
| 4.5 Caracterização dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. do tomateiro | 37 |
| 4.6 Sensibilidade de isolados de bactérias do tomateiro ao antibiótico casugamicina, <i>in vitro</i> | 37 |
| 4.7 Sensibilidade de <i>Xanthomonas perforans</i> a casugamicina, <i>in vivo</i> | 37 |
| 4.7.1 Avaliação do tratamento preventivo, com casugamicina, em tomate Santa Clara, em condição de casa-de-vegetação, no controle de <i>Xanthomonas perforans</i> | 38 |
| 4.7.2 Avaliação do efeito do tratamento curativo, com casugamicina, em tomate Santa Clara, no controle de <i>Xanthomonas perforans</i> em condição de casa-de-vegetação | 42 |
| 4.7.3 Análise estatística dos testes de avaliação dos tratamentos preventivo e curativo, <i>in vivo</i> | 43 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 5.1 Coleta, manutenção e testes de patogenicidade dos isolados bacterianos de tomate | 44 |
| 5.2 Identificação das espécies de <i>Xanthomonas</i> spp. pela caracterização molecular dos isolados | 46 |
| 5.3 Caracterização dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp das amostras coletadas na área de produção de tomate para mesa no estado de São Paulo | 50 |
| 5.4 Sensibilidade de isolados de <i>Xanthomonas perforans</i> do tomateiro ao antibiótico casugamicina, <i>in vitro</i> | 50 |
| 5.5 Sensibilidade de <i>Xanthomonas perforans</i> a casugamicina, <i>in vivo</i> | 52 |
| 5.6 Avaliação do tratamento preventivo, com casugamicina, em tomate Santa Clara, em condição de casa de vegetação, no controle de <i>Xanthomonas perforans</i> | 52 |
| 5.7 Avaliação do tratamento curativo, com casugamicina, em tomate Santa Clara, em condição de casa-de-vegetação, no controle de <i>Xanthomonas perforans</i> | 58 |
| 6 CONCLUSÕES | 62 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS | 63 |

1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) é cultivado na maioria dos estados brasileiros e se destaca pelo valor da comercialização, quando comparado a outras hortaliças, quer sejam folhosas ou hortaliças de frutos, da mesma família, tais como pimentão, berinjela e jiló.

Normalmente, algumas vezes até em dados estatísticos, referem-se ao tomate de uma forma genérica, mas convém destacar que há duas categorias bem distintas de produção, ou seja, um tomate voltado para o consumo *in natura*, ou tomate para mesa, tomate salada, também conhecido como tomate envarado, e outro destinado à indústria, para elaboração de massa de tomate e derivados, com plantas e frutos apresentando características diferentes, em função da modalidade de mercado.

O estado de São Paulo é o principal produtor de tomate para mesa do País e cerca de 80% da produção está concentrada em uma faixa mais ao sul do estado e tem no Entrepasto Terminal São Paulo da CEAGESP – Companhia de Entrepastos e Armazéns Gerais de São Paulo, localizado na cidade de São Paulo, o seu principal ponto de comercialização.

Vários são os parâmetros de produção que afetam o desenvolvimento do tomateiro, entre eles os fatores relacionados às condições climáticas, como excesso ou falta de água, condição do solo, relacionadas com a sua composição físico-química e qualidade das adubações que são realizadas, práticas de manejo, controle de pragas, doenças, plantas infestantes e genética do material cultivado.

As doenças do tomateiro são causadas principalmente por fungos, bactérias, nematoides e vírus e são responsáveis por significativas perdas na produção. Seu controle é um desafio para os produtores, especialmente em períodos chuvosos, quando os preços são mais atrativos.

O controle dessas doenças, na maioria das vezes, resume-se ao uso de produtos químicos, em detrimento do uso de técnicas de Manejo Integrado das Doenças, pelas quais, a integração de todas as medidas de controle contribui para a eliminação, ou redução dos efeitos danosos das doenças, buscando a preservação dos recursos naturais, a saúde do agricultor e do consumidor (VALE, LOPES e ALVARENGA, 2013).

Dentre as manchas foliares, destacam-se as causadas por fitobactérias, que afetam a capacidade fotossintética das folhas, podem derrubar flores e frutos e ainda provocar lesões e apodrecimento de frutos, depreciando-os para comercialização. Podem também causar apodrecimento de hastes e morte de plantas.

No Brasil, as espécies *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pectobacterium chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas* spp. e *Ralstonia solanacearum*, entre outras, estão elencadas como agentes bacterianos que causam doenças na cultura do tomate (MALAVOLTA et al. (2008).

Em lavouras comerciais, no estado de São Paulo, e demais regiões produtoras do Brasil, ocorre um complexo de manchas foliares no tomateiro, muitas vezes com sintomatologia semelhante, de difícil identificação, sem a interferência de um laboratório, ou consultoria especializada.

Destacam-se em importância a mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) e a pinta bacteriana (*Pseudomonas* spp.), que ocorrem simultaneamente nas lavouras comerciais. A mancha bacteriana era descrita inicialmente como *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997).

Atualmente, sabe-se que a doença mancha bacteriana foi reclassificada em quatro espécies, *X. euvesicatoria*, *Xanthomonas perforans*, *X. vesicatoria* e *Xanthomonas gardneri* (JONES et al., 2004).

Para as espécies de *Pseudomonas*, são descritas, em tomate no Brasil, *P. briosii*, *P. cichorii*, *P. corrugata*, *P. marginalis*, *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato* (MALAVOLTA JR. et al., 2008).

As doenças causadas por bactérias podem provocar perdas superiores a 40% em condições de alta temperatura e umidade, o seu controle é difícil devido à rápida multiplicação e disseminação, falta de cultivares resistentes à maioria delas e à baixa eficácia do controle químico, devido também ao aparecimento de cepas resistentes. Portanto, o controle das doenças causadas por bactérias deve ser sempre preventivo e com a associação de uma série de medidas integradas (VALE, LOPES e ALVARENGA, 2013).

Práticas de manejo cultural e variedades resistentes recorrentemente são recomendadas ao controle de bacterioses, mas nem sempre estas ações, aliadas ao fato da indisponibilidade de materiais geneticamente resistentes, para todos esses agentes, atendem as expectativas dos produtores, que arcam com os prejuízos decorrentes da agressividade com que essas bacterioses se instalam na lavoura, e em uma situação de epidemia eminente, o método de controle químico é o tradicionalmente utilizado, em muitos casos com controle insatisfatório.

No Brasil temos poucos ingredientes ativos registrados para o controle de bacterioses em tomate.

Atualmente, segundo o MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, a espécie válida para mancha bacteriana é *Xanthomonas vesicatoria* e *Pseudomonas syringae*

pv. *tomato* para pinta bacteriana. Não são consideradas outras espécies, para as manchas foliares de *Xanthomonas* spp., como para as de *Pseudomonas* spp.

Para mancha bacteriana, existem apenas oito ingredientes ativos registrados, sendo que três deles são produtos à base de cobre. Para pinta bacteriana somente dois ativos em três marcas comerciais (AGROFIT, 2017). Dos produtos comerciais que se encontram registrados para mancha bacteriana, 68% são formulações à base de cobre, os demais ingredientes ativos são acibenzolar-S-metílico, cimoxanil+famoxadona, famoxadona+mancozeb, cloreto de benzalcônio, e extrato de folhas (*Melaleuca alternifolia*) (Figura 1).

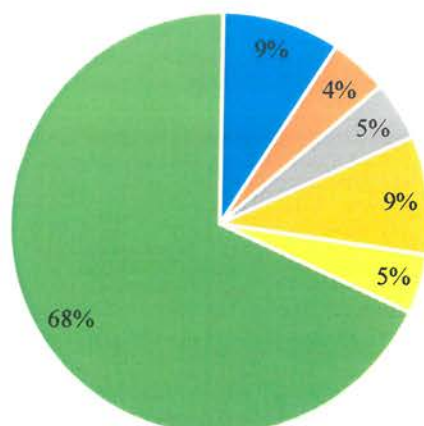
Além da pouca disponibilidade de ingredientes ativos registrados para o controle da mancha e pinta bacteriana, existe um complexo de espécies envolvidas com essas doenças que não está sendo considerado pelo agricultor. A sintomatologia, ao nível de campo, muitas vezes se confunde, e o produtor se depara com um conjunto de manchas, não existindo clareza da espécie predominante, das medidas que devem ser adotadas para manejo e como é a sensibilidade dessas espécies aos produtos que estão sendo utilizados.

A identificação das espécies de *Xanthomonas* é realizada atualmente com técnicas de biologia molecular e com *primers* específicos.

Um agravante nas áreas de produção tem sido a utilização de produtos químicos em uma situação emergencial, com a doença já instalada, condição esta que aumenta consideravelmente o número de pulverizações, a redução do intervalo entre as aplicações e o aumento da dosagem dos produtos, contribuindo para o surgimento de isolados resistentes e aumento de risco, para os consumidores finais, pela maior probabilidade de resíduos nos frutos.

Novas opções de produtos, com mecanismos de ação diferentes, ou possíveis associações, que promovam melhor eficiência dos produtos que já estão sendo utilizados na cultura, são fundamentais para proporcionar informações sobre os melhores resultados e uso mais racional das ferramentas disponíveis de controle de doenças.

Atualmente, uma série de propostas com produtos alternativos estão surgindo para o manejo de doenças foliares, incitadas por bactérias no tomateiro, como, fertilizantes foliares, indutores de resistência, fungicidas, que de forma secundária, interferem nos mecanismos de resistência das plantas e biofungicidas.



- acibenzolar-S-metílico (benzotriazol)
- cimoxanil (acetamida) + famoxadona (oxazolidinadiona)
- cloreto de benzalcônio (amônio quaternário)
- famoxadona (oxazolidinadiona) + mancozebe (alquilenobis(ditiocarbamato))
- Melaleuca altemifolia, Extrato de folhas (terpenos)
- ativos a base de cobre

Fonte: Agrofit-2017 – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Dados tabulados por Eros Molina Occhiena

Figura 1- Gráfico da distribuição percentual dos produtos comerciais registrados para mancha bacteriana do tomate (*Xanthomonas* spp.) no Brasil. Outubro 2017.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve os seguintes objetivos:

2.1 Gerais

- 2.1.1 Levantar as principais bacterioses que ocorrem em folhas, em tomate para mesa, nas principais regiões produtoras do estado de São Paulo;
- 2.1.2 Caracterizar os isolados bacterianos quanto a patogenicidade;
- 2.1.3 Identificar os isolados, ao nível de espécie, através de rep-PCR, testes bioquímicos e fisiológicos.

2.2 Específicos

- 2.2.1 Avaliar a sensibilidade, da espécie bacteriana predominante na área, ao ingrediente ativo casugamicina, *in vitro*;
- 2.2.2 Avaliar a eficiência do ingrediente ativo casugamicina, *in vivo*, em mudas de tomate, numa condição de tratamento preventivo e curativo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A cultura do tomate no estado de São Paulo

O tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) é uma das principais hortaliças produzidas no Brasil e tem sua origem nas regiões andinas do Peru, Bolívia e Equador.

Quando os espanhóis chegaram na América, o tomate já era utilizado no México e em vários outros locais da América Central e do Sul (EMBRAPA, 1993). Foram os espanhóis e portugueses que difundiram o tomate pelo mundo, e no princípio, por volta de 1531, a planta era utilizada na Espanha como ornamental, porque seus frutos eram associados à outra fruta, da mesma família, a mandrágora, extremamente venenosa, devido aos alcaloides presentes em espécies dessa família. No Brasil a introdução é atribuída a imigrantes europeus, italianos, espanhóis e portugueses, no final do século XIX, mas o incremento no consumo ocorreu após a primeira guerra mundial, por volta de 1930 (ALVARENGA, 2013).

A preferência dos consumidores pelo tomate é devido a várias razões, como facilidade de preparo, consumo *in natura*, aliado ao sabor, textura, e composição dos frutos, ricos em vitamina C e potássio, em antioxidantes, como o licopeno, que é uma substância fotoquímica que apresenta propriedades protetivas contra várias doenças cardiovasculares e algum tipo de câncer, além da presença de xantofilas, β caroteno, vitamina B1, B2 e B5 (ALVARENGA e COELHO, 2013).

O principal país produtor de tomate, em área plantada, em 2014, foi a China com uma participação de 33% do total plantado no mundo, seguida pela Índia (15%), Nigéria (9%), Turquia (5%), Egito (4%) e Estados Unidos da América (3%). O Brasil, em área plantada, ocupou a 15.^a posição (Tabela 1). Em termos de quantidade de produção, expressa em toneladas, a China apresentou 47% de participação, do total produzido no mundo, seguida por Índia (8%), Estados Unidos da América (6%), Turquia (5%) e Egito (4%) (Tabela 2) (FAO, 2017).

No Brasil, a área colhida em 2016 foi de 57.339 hectares, com uma produção de 3.667.121 toneladas, computando-se nestes valores a produção de tomate destinada à indústria, e o tomate de mesa, para consumo *in natura*. Dentre as regiões produtoras destacam-se as regiões Sudeste, Centro Oeste e Sul como maiores produtoras (Tabela 3). Na região Sudeste, o estado de São Paulo é um dos principais produtores, seguido por Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Tabela 4) (IBGE, 2017).

Tabela 1- Principais países produtores de tomate do mundo, em área plantada (Ha) – 2014

| País | Área (Ha) | Participação (%) |
|---------------------------|-----------|------------------|
| China | 1.998.175 | 33,16 |
| Índia | 882.030 | 14,64 |
| Nigéria | 541.800 | 8,99 |
| Turquia | 319.109 | 5,30 |
| Egito | 214.016 | 3,55 |
| Estados Unidos da América | 163.380 | 2,71 |
| Irã | 159.132 | 2,64 |
| Rússia | 118.421 | 1,97 |
| Itália | 103.171 | 1,71 |
| México | 95.207 | 1,58 |
| Ucrânia | 79.300 | 1,32 |
| Camarões | 71.453 | 1,19 |
| Uzbequistão | 65.052 | 1,08 |
| Brasil | 64.363 | 1,07 |
| Outros | 1.150.911 | 19,10 |
| Total | 6.025.520 | 100 |

Fonte: FAO - 2014 – Dados tabulados por Eros Molina Occhiena.

Tabela 2- Principais países produtores de tomate no mundo, em quantidade de produção (toneladas) – 2014.

| País | Toneladas | Participação (%) |
|---------------------------|-------------|------------------|
| China | 105.309.827 | 47,12 |
| Índia | 18.735.910 | 8,38 |
| Estados Unidos da América | 14.516.060 | 6,50 |
| Turquia | 11.850.000 | 5,30 |
| Egito | 8.288.043 | 3,71 |
| Irã | 5.973.275 | 2,67 |
| Itália | 5.624.245 | 2,52 |
| Espanha | 4.888.880 | 2,19 |
| Brasil | 4.302.777 | 1,93 |
| México | 3.536.305 | 1,58 |
| Outros | 40.448.414 | 18,10 |
| Total | 223.473.736 | 100 |

Fonte: FAO - 2014 – Dados tabulados por Eros Molina Occhiena

Tabela 3 - Área colhida em hectares e produção em toneladas de tomate nas regiões produtoras brasileiras – 2016

| Região Brasileira | Área (ha) | Produção (t) |
|-------------------|-----------|--------------|
| Sudeste | 26.646 | 1.799.478 |
| Centro Oeste | 12.190 | 974.953 |
| Sul | 8.908 | 501.282 |
| Nordeste | 9.076 | 378.445 |
| Norte | 524 | 12.963 |
| Total | 57.339 | 3.667.121 |

Fonte: IBGE – 2017.

Tabela 4 - Área colhida de tomate (ha) e produção (t) nos estados da região Sudeste do Brasil – 2016.

| Estado | Área Colhida (ha) | Produção (t) |
|----------------|-------------------|--------------|
| São Paulo | 11.259 | 753.283 |
| Minas Gerais | 10.303 | 702.510 |
| Rio de Janeiro | 2.573 | 189.611 |
| Espírito Santo | 2.511 | 154.074 |
| Total | 26.646 | 1.799.478 |

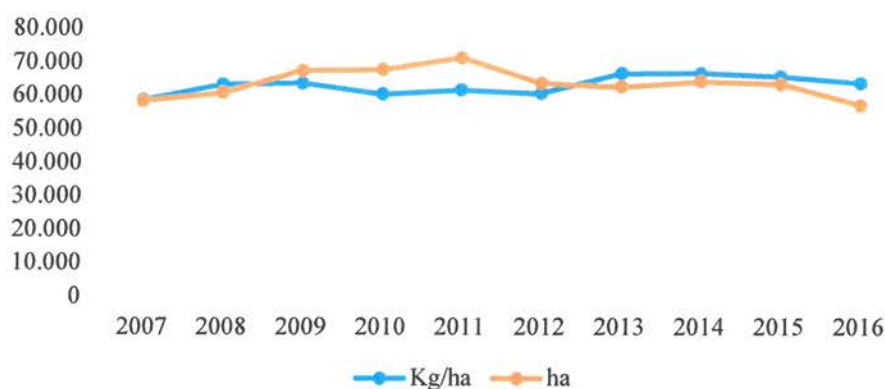
Fonte: IBGE - 2017.

Analisando-se os dados de rendimento médio, expresso em kg/ha, e a evolução da área de plantio das safras de 2007 a 2016, observa-se que o rendimento médio para a cultura de tomate no Brasil tem oscilado, ao redor da faixa de 60.000 kg por hectare (Figura 2) (SIDRA, 2017).

Pelos dados divulgados pelo Cepea – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – ESALQ/USP, que não representam a área total cultivada em cada região, mas que refletem a opinião dos principais agentes do setor, para o tomate de mesa, no ano de 2016, considerando as safras de inverno, verão e anual, nas diferentes regiões produtoras do Brasil, em milhões de pés, o estado de São Paulo foi o principal produtor, seguido por Minas Gerais, Bahia e Goiás, representando respectivamente, 17%, 16%, 11% e 10% do total plantado no Brasil naquele ano, que ficou em torno de 214 milhões de pés (Tabela 5) (SANTOS, BRITO JUNIOR e MOLENA, 2017).

A Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), empresa pública vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é um

dos principais veículos na cadeia de abastecimento de produtos hortícolas, oriundos das diversas partes do País, permite que atacadistas, varejistas, produtores rurais, cooperativas, importadores, exportadores e agroindústrias comercializem seus produtos com segurança e padrão de qualidade.



Fonte: Sidra / IBGE - 2017. Dados compilados por Eros Molina Occhiena

Figura 2 - Gráfico da evolução da área colhida em hectares e rendimento médio em kg/ha para a cultura do tomate no Brasil, no período 2007 a 2016.

Tabela 5 - Estimativa do número de plantas de tomate para mesa, em milhões de pés, nas principais regiões produtoras do Brasil – 2016.

| Estado | N.º Pés (milhões) | Participação (%) |
|--------|-------------------|------------------|
| SP | 37,05 | 17% |
| MG | 33,80 | 16% |
| BA | 24,20 | 11% |
| GO | 21,00 | 10% |
| RJ | 20,00 | 9% |
| ES | 20,00 | 9% |
| PR | 15,40 | 7% |
| SC | 14,52 | 7% |
| RS | 10,50 | 5% |
| CE | 9,60 | 5% |
| PE | 8,80 | 4% |
| Total | 214,87 | 100% |

Fonte: Revista Hortifruti Brasil – Anuário 2016-2017 – CEPEA
Dados tabulados por Eros Molina Occhiena.

O Entrepasto Terminal São Paulo (ETSP) é a maior central de abastecimento de frutas, legumes, verduras, flores, pescados da América Latina, local onde circulam diariamente cerca de 50 mil pessoas e 12 mil veículos (CEAGESP, 2017).

Em milhões de reais, considerando as principais frutas e hortaliças comercializadas no Entrepasto Terminal São Paulo, no ano de 2016, o tomate foi o principal produto, com um valor anual ao redor de R\$ 842,00 milhões (Figura 3) (PROHORT, 2017).

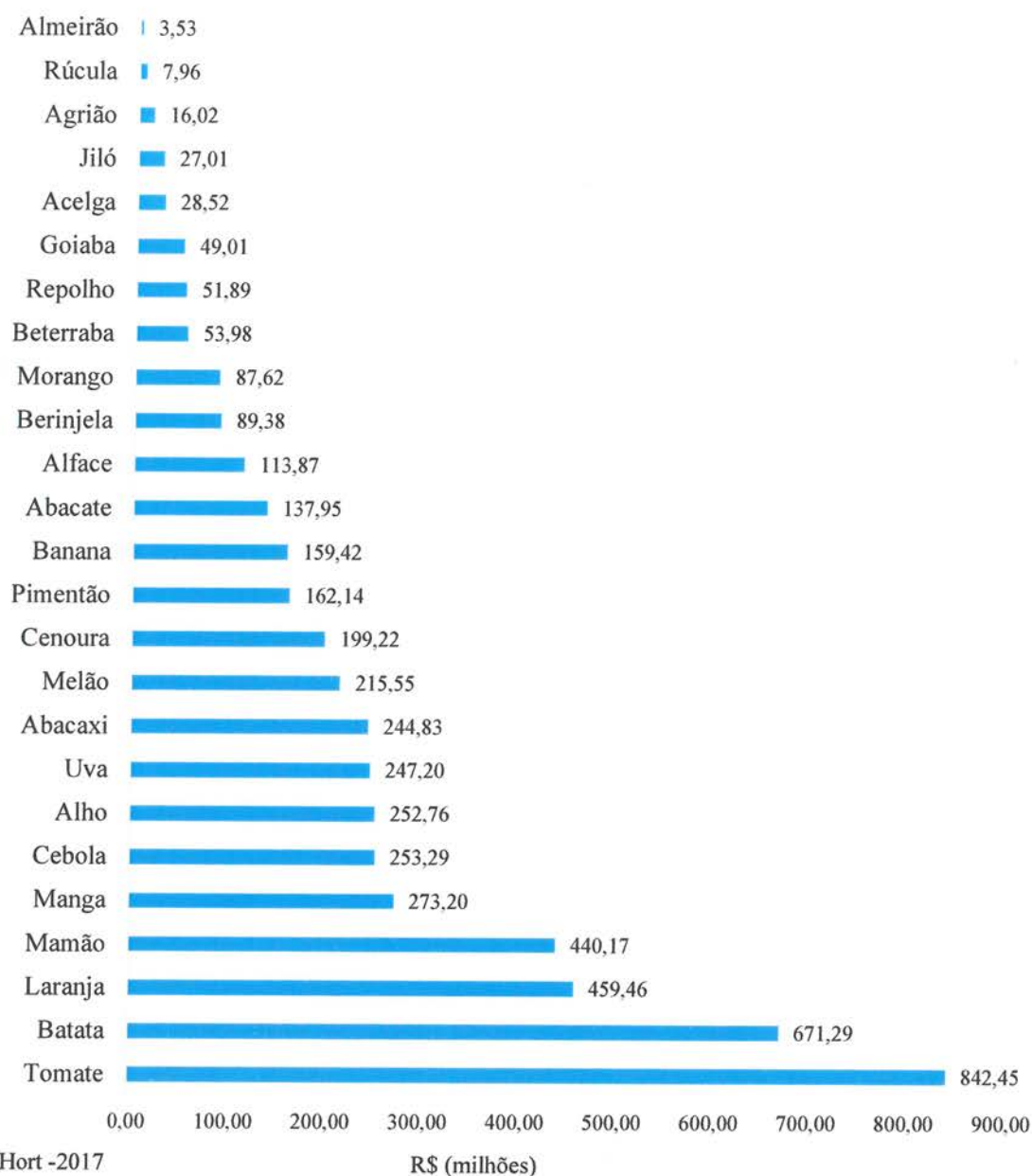
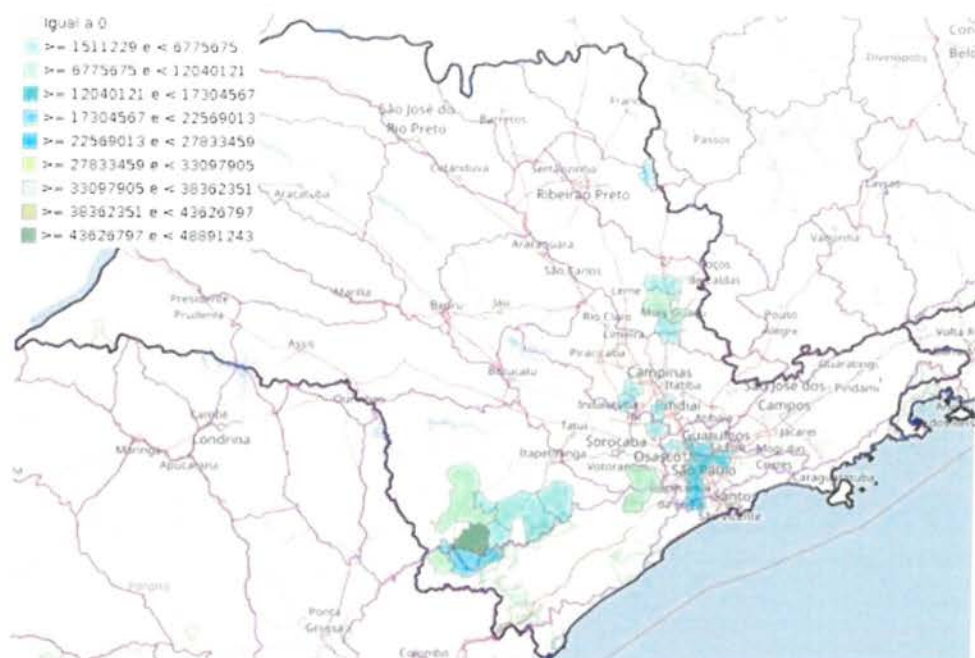


Figura 3 - Gráfico dos valores, em milhões de reais (R\$) das principais frutas e hortaliças comercializadas na CEAGESP, entreposto de São Paulo-SP - 2016.

Os principais municípios, no estado de São Paulo, que fornecem tomate para mesa na Ceagesp, da Grande São Paulo, encontram-se localizados numa faixa que vai da região

Sudoeste, divisa com o estado do Paraná, até os municípios de Mogi-Guaçu, Casa Branca, divisa com o estado de Minas Gerais (Figura 4) (CONAB, 2017).



Fonte: Conab, 2017

Figura 4 - Principais municípios do estado de São Paulo, que forneceram tomate de mesa para a CEAGESP- São Paulo, de janeiro a dezembro de 2016.

Esses municípios representam 84% da produção de tomate para mesa no estado de São Paulo, distribuída para os seguintes municípios e suas respectivas microrregiões: Itapeva (60%), Campinas (8,1%), Mogi Mirim (7,3%), Sorocaba (4,2%), São João da Boa Vista (2,8%) e Itapetininga (2,1%) (CAMARGO FILHO e CAMARGO, 2017).

Levando-se em consideração os dados de área colhida, no estado de São Paulo, em 2016, nos quais são computados os números referentes à produção de tomate para indústria e tomate para mesa, observa-se o peso dos municípios de Guapiara, Ribeirão Branco, Apiaí, Miguelópolis, Itapeva, Nova Campina e Guapiara na entrega de tomate para o mercado, municípios estes que produzem basicamente tomate para o mercado *in natura*, juntamente com os municípios de Mogi Guaçu e Sumaré (Tabela 6) (SIDRA, 2017).

Tabela 6. Área colhida de tomate no estado de São Paulo por município, em hectares – 2016

| Município | Área colhida (ha) |
|--------------------|-------------------|
| Guapiara | 2.000 |
| Ribeirão Branco | 1.100 |
| Apiáí | 1.000 |
| Miguelópolis | 1.000 |
| Itapeva | 900 |
| Nova Campina | 800 |
| Guaíra | 700 |
| Mogi Guaçu | 500 |
| Barra do Chapéu | 300 |
| Sumaré | 300 |
| Buri | 240 |
| Paulo de Faria | 222 |
| São Miguel Arcanjo | 200 |
| Outros | 5.557 |
| Total | 14.819 |

Fonte: Sidra/IBGE, 2016. Dados tabulados por Eros Molina Occhiena.

3.2 Mancha bacteriana em tomate, causada por *Xanthomonas* spp.

Uma reclassificação, baseada na hibridação de DNA, foi proposta para *Xanthomonas* causadoras de mancha bacteriana em tomate e pimentão, onde o grupo A identificado como *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, foi renomeado para *X. euvesicatoria*, o grupo C de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, foi renomeado para *Xanthomonas perforans* sp. nov., o grupo B como *X. vesicatoria* e o grupo D como *Xanthomonas gardneri* (JONES et al., 2004).

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*, o agente causador da mancha bacteriana em tomate e pimentão, sofreu a revisão taxonômica, em função da heterogeneidade dos organismos identificados como *X. campestris* pv. *vesicatoria*, e foi demonstrada inicialmente a ocorrência de dois subgrupos, denominados grupos A e B, com base em análises de perfil de proteínas totais, perfil de atividade enzimática e homologia de DNA:DNA. As linhagens do grupo A eram classificadas como *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e as do grupo B como *X. vesicatoria*, e um grupo de linhagens atípicas de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, denominado nonA/nonB. De 76 linhagens avaliadas, os resultados indicaram que as linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* puderam ser diferenciadas através de polimorfismos de região espaçadora de rDNA 16S-23S com *Alu* I, *Dde* e *Hinf* I e através de polimorfismos de uma região

do gene *groEL* com *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I e também observada uma correlação entre o hospedeiro, onde linhagens provenientes de pimentão foram predominantemente *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e as linhagens de *X. vesicatoria* predominantemente associadas a tomate. A maioria das linhagens atípicas do grupo *nonA/nonB* foram agrupadas em *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* nas análises com os dois marcadores (MARQUES, 2000).

No início da década de 1990, dois grupos, A e B, foram identificados com as respectivas espécies, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* e após esta identificação, mais dois grupos foram descritos, C e D, patogênicos para pimentão, tomate ou ambos os hospedeiros. O grupo C foi encontrado em lavouras de tomate dos Estados Unidos e México e o grupo D que foi isolado na Costa Rica, estava muito relacionado com *Xanthomonas gardneri*, isolada na Iugoslávia em 1957. Com base na similaridade de DNA, foi proposto que as cepas do grupo C fossem designadas de *X. perforator* sp. nov. e que as cepas do grupo D fossem denominadas *Xanthomonas gardneri*. Raças de tomate denominadas T1, T2 e T3 foram identificadas com base em reações diferenciais com um grupo de genótipos de tomate e mais duas raças T4 e T2 foram identificadas na Flórida, que são cepas do grupo C, com mutações no *avrXv3* e *avrXv3* e *avrXv4*, respectivamente (BOUZAR et al., 2004).

No Brasil, o primeiro relato de ocorrência das raças T3, T1P8, T2P7 e T2P8, foi reportado, mediante a avaliação de setenta e dois isolados de *Xanthomonas* spp., provenientes de campos comerciais de tomate para indústria dos estados de Goiás, Minas Gerais, Pernambuco e Bahia, que foram submetidos a genótipos diferenciais de tomateiro e pimentão, e com base na reação de hipersensibilidade, 36 horas após inoculação, em um regime de 12h/12h (luz/escuro) a 28 °C, foram identificadas as raças T1P2, T1P8 e T3 em *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*; a raça T2 em *X. vesicatoria*; e as raças T2P7 e T2P8 em *Xanthomonas gardneri*. A presença dos genes *avrRxx* e *avrXv3* nos isolados que causaram reação de hipersensibilidade em 'Hawaii 7998' (raça T1) e 'NIL 216' (raça T3), respectivamente, foi confirmada por reação em cadeia da polimerase (PCR), usando iniciadores específicos (QUEZADO-DUVAL e CAMARGO, 2004).

A mancha bacteriana, nas condições brasileiras, causa danos severos tanto em tomate industrial, como em tomate para mesa. Em levantamento de espécies e raças presentes em lavouras comerciais, de tomate para processamento industrial, na região central do Brasil, as epidemias foram causadas principalmente por *Xanthomonas gardneri*, e no Nordeste, encontrou-se basicamente *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Em relação às raças, relatou-se pela primeira vez no país, a ocorrência das raças T3 e T1P8, no Nordeste e T2P7 e T2P8 no Brasil central. Quanto à sensibilidade ao produto oxitetraciclina, não foram encontrados isolados resistentes, mas foram encontrados isolados resistentes ao cobre e à estreptomicina, em altas

frequências, principalmente entre os isolados de *Xanthomonas gardneri* (QUEZADO-DUVAL, 2003).

Em uma atualização sobre mancha bacteriana, para o sistema de produção integrada de tomate para indústria, Quezado-Duval e Lopes (2010) destacaram a importância da adoção de práticas culturais como auxiliares no manejo da mancha bacteriana do tomateiro, entre as quais, a rotação de culturas, especialmente com gramíneas, aumentando-se o intervalo de reentrada da cultura na mesma área, em locais com histórico da doença, controle de tigueras, manejo adequado de irrigação e uso de sementes saudáveis, e que a eficiência do uso de agrotóxicos no controle da mancha bacteriana tem sido errática, por uma série de fatores que vão desde a sensibilidade intrínseca das populações, aos parâmetros relacionados ao clima e tecnologia de pulverização. Ainda propõem que o complexo mancha bacteriana seja tratado como quatro doenças distintas, denominadas de mancha de vesicatoria, mancha de euvesicatoria, mancha de *gardneri* e mancha de perforans.

Esta diversidade genética e na patogenicidade das espécies de *Xanthomonas* ocorrem na maior parte do mundo, em climas tropicais, causando danos tanto em tomate como em pimentão. No sudoeste da Índia, *X. euvesicatoria*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas gardneri* e *X. vesicatoria* foram também identificadas com uma predominância da espécie *X. euvesicatoria* (HAMZA et al., 2010).

Lima (2015), avaliou o complexo mancha-bacteriana em *Capsicum* no Brasil e identificou 76 isolados de *Xanthomonas*, obtidos de folhas sintomáticas de pimentas, coletadas nos anos de 1982 a 2014, nos estados de Goiás, Ceará, Bahia, Sergipe, Pernambuco, Roraima, Pará, Amazonas, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Distrito Federal. Setenta e um isolados foram identificados como *X. euvesicatoria*, quatro isolados na região Sudeste foram de *Xanthomonas gardneri* e um isolado do Ceará foi de *Xanthomonas perforans*. Setenta e três isolados foram avaliados *in vitro*, quanto à sensibilidade ao cobre, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, e 74% e 63% dos isolados foram insensíveis, respectivamente e 10 % dos isolados foram insensíveis a 200 µg/mL.

Três espécies de *Xanthomonas* spp. eram associadas a doenças em pimentão e tomate, enquanto alguns isolados infectam somente o pimentão, outros infectam pimentão e tomate. A bactéria *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* era considerada a espécie mais comum em pimentão, anteriormente. Em pimentão, eram conhecidas onze raças, sendo que as raças 1; 2 e 3 eram as mais comuns. No estado de São Paulo, entre 41 isolados avaliados, foram detectadas as seguintes raças: raça 0 (Lins); raça 1 (Bacuriti); raça 2 (Bragança Paulista, Bacuriti, Lins, Ibiúna, Piacatu e Guaira); raça 3 (Piedade); raça 7 (Mogi das Cruzes) e raça 8 (Piedade, Bragança Paulista, Bacuriti, Lins e Mogi das Cruzes) (WIERZBICKI, 2003).

Uma das formas mais eficientes de início de uma epidemia é através do plantio de sementes infectadas. Em trabalho para evidenciar como se processa o transporte de *X. vesicatoria*, de sementes inoculadas para os diferentes órgãos das plantas, observou-se que, nas sementes, a bactéria foi facilmente reisolada do tegumento ao longo dos primeiros seis dias, e da radícula, do hipocótilo e das folhas cotiledonares, logo após a sua emissão, aos dois e três dias de semeio. A máxima população de *X. vesicatoria* foi observada 48 h após o semeio, por ocasião da emissão da radícula. A bactéria, a partir do tegumento, coloniza todos os órgãos da planta, à medida que são emitidos radícula, hipocótilo e folhas cotiledonares, e este processo também pode ser observado em condições de viveiro, com colonização das folhas definitivas tão logo estas são formadas, podendo sobreviver como residentes nestes órgãos sem causar sintomas, até 21 dias após o semeio e colonização. A bactéria pode sobreviver como residente na raiz, hipocótilo, folhas cotiledonares e definitivas, até 30 dias após o semeio, sem necessariamente causar sintomas (DA SILVA et al., 2013).

SILVA et al. (2002) avaliaram o efeito do tratamento térmico, a 70 °C por 96 h, na erradicação de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, em sementes de tomate, inoculadas pelo método a vácuo, e constataram uma alta eficiência do método de tratamento, que não afetou a qualidade fisiológica da semente, com uma eficiência de 100% e 99,96% de erradicação da bactéria.

Comparando-se o tratamento com HC a 5% por 10 minutos, calor seco, 70 °C por 96 horas e imersão em água a 50°C, durante 25 e 30 minutos, com sementes de tomate inoculadas a vácuo, com avaliações após 24 h; 15 e 30 dias de armazenamento em geladeira, verificou-se que o tratamento com HC a 5% erradicou *X. vesicatoria* das sementes e proporcionou maior velocidade de germinação, quando a semeadura foi feita logo após a aplicação do tratamento, porém prejudicou a germinação e vigor das plântulas quando as sementes foram armazenadas.

O tratamento com calor seco, reduziu a população da bactéria e a velocidade de germinação 24 horas a aplicação dos tratamentos, mas manteve a qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento. O tratamento com água aquecida não afetou a qualidade fisiológica das sementes, porém não foi eficiente na erradicação do patógeno (CARMO et al., 2004).

Em estudo da histopatologia de folhas de tomate, inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, sob microscópio ótico e eletrônico de varredura, observou-se que a bactéria penetra nas folhas, principalmente, pelos estômatos, se instalam e se multiplicam nas câmaras subestomáticas e, a partir deste ponto, colonizam os espaços intercelulares do parênquima esponjoso, mas podem também penetrar pela base dos tricomas deteriorados (ALIPPI, 1992).

Nos anos de 1977, 1978 e 2000 foram analisadas, 215 amostras de folhas com lesões características causadas por *Xanthomonas* spp. coletadas em lavouras comerciais de tomate para indústria, na região Centro-Oeste do Brasil, para determinação das espécies presentes na região, e a recuperação de linhagens de *Xanthomonas gardneri* foi extremamente significativa, indicando que para aquela região, essa espécie estava tornando-se um componente importante, do complexo de manchas bacterianas, e epidemias dessa espécie nunca haviam antes sido relatadas, com um aumento da frequência desta espécie em detrimento de outras (QUEZADO-DUVAL et al. 2004).

O efeito da temperatura foi avaliado nos componentes de patogenicidade de cada espécie e a competitividade entre *Xanthomonas perforans* e *X.gardneri* em plantas de tomate, em condição de casa de vegetação, inoculando-as separadamente e combinadas, com temperaturas variando nas faixas de 20; 25 e 30 °C. Colônias foram recuperadas das folhas e foi avaliada a frequência de cada espécie. Houve significância para o parâmetro temperatura e componentes de patogenicidade. A 20 °C, *Xanthomonas gardneri* promove maior porcentagem de área foliar lesionada, enquanto que a 30 °C, *Xanthomonas perforans* foi mais agressiva e na avaliação de competitividade, *Xanthomonas perforans* foi recuperada em metade das inoculações combinadas e a temperatura teve um papel importante na determinação de qual espécie de bactéria estava presente. A bactéria *Xanthomonas perforans* apresentou uma vantagem competitiva em relação a *Xanthomonas gardneri* (ARAÚJO, 2010).

Em outro trabalho, foi verificada a inibição no crescimento de três isolados brasileiros de *X. euvesicatoria*, por parte de um isolado nacional de *Xanthomonas perforans*, e atribuído a este fato uma possível produção de bacteriocina. Isolados de *Xanthomonas perforans* sensíveis ao cobre apresentaram maior severidade de doença, quando comparado aos isolados resistentes (ARAÚJO, 2010).

Oitenta e um isolados oriundos de campos comerciais de tomate para mesa, coletados em 23 localidades nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil entre os anos 2005 e 2009, foram identificados para determinar a ocorrência das espécies envolvidas. Desta relação somente um isolado, identificado como CNPH2008-35, era do estado de São Paulo. Foi observada a alta frequência de *Xanthomonas perforans* (49,4%) e *Xanthomonas gardneri* (40,7%) e somente dois isolados corresponderam a *X. euvesicatoria* e seis a *X. vesicatoria*, todos causaram sintomas em tomate e somente isolados de *X. euvesicatoria* e 30 isolados de *Xanthomonas gardneri* causaram sintomas em pimentão e nestes 81 isolados foram encontradas as raças T1, T2 e T3, não sendo encontradas as raças T4 e T5. Os isolados das quatro espécies apresentaram resistência ao cobre e a estreptomicina (PEREIRA, 2011).

Comparando-se a sensibilidade de 94 isolados de *Xanthomonas* spp. aos produtos sulfato de cobre e estreptomicina, nenhum isolado foi reportado como altamente resistente ao sulfato de cobre, mas 100% de *Xanthomonas gardneri* e 84,9 % de *Xanthomonas perforans* foram resistentes. Isolados sensíveis ao sulfato de cobre foram encontrados somente para as espécies *Xanthomonas perforans* e *X. euvesicatoria*. Isolados de *Xanthomonas perforans* sensíveis ou moderadamente sensíveis foram mais severos para causar lesões que os isolados resistentes (ARAÚJO et al.,2012).

Costa et al. (2012) avaliaram isolados de *Xanthomonas* causadores da mancha bacteriana em tomate para mesa, na região do Alto Vale do Rio do Peixe, em SC, Brasil, caracterizando-as quanto à sensibilidade ao sulfato de cobre e quanto à espécie. Dos 44 isolados avaliados, 80% foram de *Xanthomonas gardneri*, 11% de *Xanthomonas perforans* e 9% de *X. vesicatoria* e 98% dos isolados foram sensíveis ao sulfato de cobre a 200 µg /mL.

Araújo (2014) fez um levantamento da frequência de ocorrência de espécies e raças de bactérias, causadoras da mancha bacteriana, em tomate para indústria e tomate *in natura*, nas principais regiões produtoras do Brasil, no período de 2009-2012 e verificou que do total de 188 isolados, 92% foram identificados como *Xanthomonas perforans*, sendo a espécie predominante no País. Quinze isolados foram identificados como *Xanthomonas gardneri* e um isolado como *X.euvesicatoria*. Do estado de São Paulo, foram avaliados 14 isolados provenientes de tomate para mesa, sendo que, todos foram classificados como *Xanthomonas perforans*, exceto um da região de Capão Bonito-SP, que foi identificado como *Xanthomonas gardneri*. Dentre os 188 isolados, 183 foram identificados como raça T3 e cinco foram identificados como raça T4, e este foi o primeiro relato da raça T4 ocorrendo no Brasil, todos originados de tomateiro para mesa no estado de São Paulo e da região de Sumaré-SP.

O método multiplex PCR foi utilizado para detecção e identificação simultânea de espécies de *Xanthomonas*, causadoras de mancha bacteriana em tomate e também com a avaliação direta dos agentes em folhas doentes. A técnica foi adequada para a detecção das quatro espécies causadoras da mancha bacteriana, com sensibilidade similar a PCR convencional, quando testada em DNA purificado. Ao usar suspensões bacterianas, sua sensibilidade foi semelhante à PCR convencional, somente quando se incluía um passo de amplificação biológica (Bio-PCR), ambos detectaram os agentes bacterianos, em folhas sintomática, e esta técnica pode ser usada como rotina na identificação destes agentes em amostras de folhas (COSTA et al., 2012).

3.3 Pinta bacteriana, mancha bacteriana pequena, ou pústula bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* no tomateiro

No Brasil, esta doença já foi relatada no Distrito Federal e nos estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e Roraima (MALAVOLTA JR., BERIAM, *et al.*, 2008). Foi constatada pela primeira vez no estado do Paraná, em 1983, e tem ocorrido em regiões onde a temperatura é amena, com predominância de alta umidade relativa. Em condição de alta severidade, causa seca das folhas e pode provocar queda de flores e frutos. *Pseudomonas* spp. é uma bactéria aeróbica, gram negativa, com reação de oxidase negativa e é fluorescente no meio de cultura King's B, característica que a diferencia de *Xanthomonas* spp., causadora de mancha bacteriana (VALE, LOPES e ALVARENGA, 2013).

Espécies do gênero *Pseudomonas* podem ser identificadas através de testes bioquímicos e fisiológicos denominados de LOPAT (LELLIOT *et al.*, 1966). Dentro do grupo *Pseudomonas*, são descritas quatro bactérias patogênicas ao tomateiro, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. cichorii* e *P. viridiflava*.

A caracterização de *P. syringae* pv. *syringae* no Brasil aconteceu em 1993, em material colhido no município de Patos de Minas, MG e identificado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Biológico (MALAVOLTA JR. *et al.*, 2002).

Pseudomonas cichorii foi descrita no estado São Paulo, em material oriundo dos municípios de Bragança Paulista e Mogi Guaçu, com queima generalizada nas folhas e enquadradas no grupo III de LOPAT (- + - - +). Esta espécie ainda não havia sido descrita no País em tomateiro (SILVA JR, 2007).

3.4 Produtos fitossanitários utilizados no controle de doenças bacterianas em tomateiro

Em 22 de agosto de 2009, de acordo com a decisão da ANVISA, foi suspensa a importação e a produção dos produtos Mycoshield, Agrimaicin e Agrimicina, produtos estes à base de estreptomicina e oxitetraciclina, determinando-se o cancelamento do registro, após data estipulada para cada produto, prazo este, considerado para que houvesse o esgotamento dos estoques do mercado (D.O.U, 2009). O controle de bacterioses nas áreas de produção até então vinha sendo mantido com produtos à base de estreptomicina, oxitetraciclina e fungicidas à base de cobre.

Atualmente, há oito ingredientes ativos registrados para o controle de mancha bacteriana, sendo que dos 22 produtos comerciais disponíveis no mercado, 15 são produtos à

base de cobre e já existem vários relatos de insensibilidade ao cobre para mancha bacteriana (QUEZADO-DUVAL, 2003; QUEZADO-DUVAL et. al., 2003; SOUZA et.al.2008).

Para mancha bacteriana pequena, encontram-se somente três produtos comerciais registrados, sendo dois à base de cobre e um indutor de resistência e poucos trabalhos de manejo e controle desta doença, associado à ocorrência de diferentes espécies, que muitas vezes, estão fazendo parte do complexo de doenças bacterianas, que ocorrem no campo. Embora para mancha bacteriana pequena existam algumas opções de variedades resistentes, a bactéria *Pseudomonas* tem aparecido na área produtora de tomate para mesa no estado de São Paulo, com frequência (AGROFIT, 2017).

3.5 Fungicida-antibiótico casugamicina registrado no Brasil

A casugamicina foi descoberta em 1965, isolada de colônias filtradas de *Streptomyces kasugaensis*. Entre as suas principais características, destacam-se a sua baixa toxicidade para mamíferos e peixes, a sua alta sistemicidade, quando aplicado em raízes de pepino, foi prontamente absorvida, controlando doença nas folhas, sua ação preventiva e curativa e ação sob espécies resistentes a outros antibióticos (HIRAMATSU et al., 1989).

A casugamicina é o único aminoglicosídeo, antibiótico que tem sido utilizado exclusivamente para uso agrícola e quando comparado com aminoglicosídeos antibióticos de uso clínico, casugamicina apresentou fraca ou nenhuma ação antibacteriana para bactérias patogênicas para humanos e animais (TAMAMURA; SATO, 1999).

No Brasil o ingrediente ativo casugamicina está registrado para a cultura do tomateiro para o controle do cancro bacteriano, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, para pústula bacteriana em pimentão (*Xanthomonas vesicatoria* pv. *vesicatoria*), para *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *lachrymans* e *X. campestris* pv. *cucurbitae*, respectivamente em café, pepino, melão/melancia, entre outras espécies (AGROFIT, 2017).

Esse produto esta sendo comercializado no Brasil há mais de 40 anos, tem registro em mais de 40 países e nos Estados Unidos é recomendado no controle de *Erwinia amylovora*, importante doença de maçã e pera (EPA, 2016) .

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de material e isolamento de bactérias do tomateiro

A coleta de amostras foi realizada em lavouras comerciais de tomate para mesa, distribuídas ao longo de uma faixa que foi de Guapiara, Ribeirão Branco, na região sudoeste do estado de São Paulo, até a região de Mogi Guaçu, São João da Boa Vista, já quase divisa com o estado de Minas Gerais.

Nesta faixa, estão mais de 80% da produção de tomate, para consumo *in natura*, no estado de São Paulo (Figura 5). A coleta iniciou-se no ano de 2016 até início do ano de 2017, em função da condição de safra e disponibilidade de plantas no campo. As visitas foram realizadas de forma aleatória na região, sendo as amostras identificadas com o nome do material plantado, idade aproximada e levantamento das coordenadas geográficas no ponto de coleta.

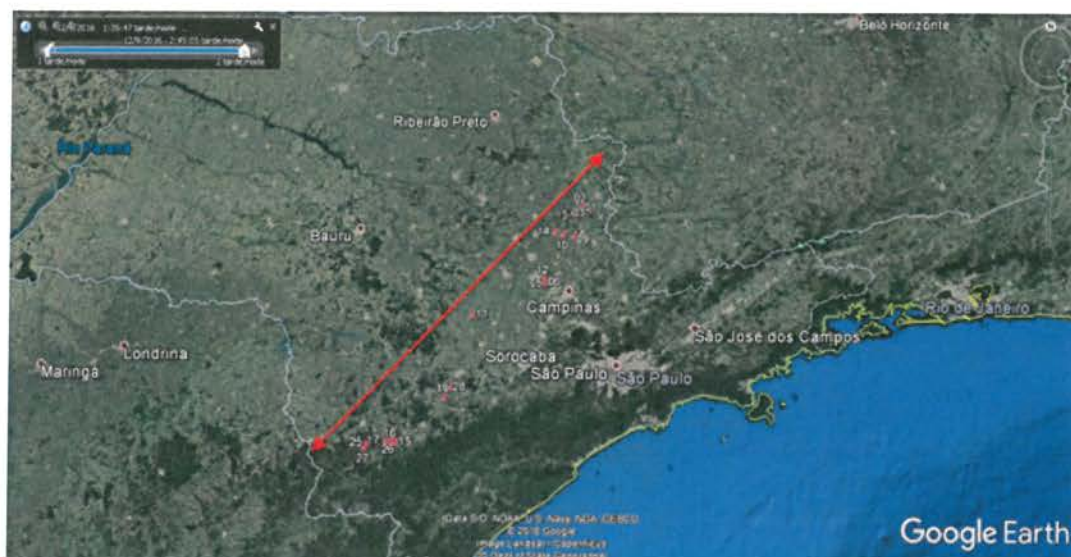


Figura 5- Faixa de coleta das amostras, na principal região produtora de tomate para mesa do Estado de São Paulo.

O nome do cultivar apresentado foi informado pelo produtor ou meeiro, e a condição para coleta foi a expressão de sintomas característicos das manchas foliares incitadas por bactérias (Tabela 7).

Tabela 7 –Municípios do estado de São Paulo, cultivares declarados, data da coleta, coordenadas geográficas e altitude nos pontos amostrados - São Paulo – 2016 – 2017

| Nº | Município | Cultivar | Data Coleta | Coordenadas Geográficas | | Altitude (m) |
|----|-----------------|---------------|-------------|-------------------------|-------------|--------------|
| 1 | Mogi-Guaçu | Aquamiel | 04/07/2016 | 22°10'16" S | 46°57'15" O | 650 |
| 2 | Mogi-Guaçu | Aquamiel | 04/07/2016 | 22°10'16" S | 46°57'15" O | 650 |
| 3 | Mogi-Guaçu | Ozônio | 04/07/2016 | 22°09'12" S | 46°57'35" O | 690 |
| 4 | Mogi-Guaçu | Ozônio | 04/07/2016 | 22°09'12" S | 46°57'35" O | 690 |
| 5 | Sumaré | Não informada | 20/07/2016 | 22°51'50" S | 47°17'00" O | 598 |
| 6 | Hortolândia | Não informada | 20/07/2016 | 22°52'13" S | 47°17'49" O | 616 |
| 7 | Estiva Gerbi | Débora | 22/07/2016 | 22°15'12" S | 46°58'32" O | 680 |
| 8 | Estiva Gerbi | Débora | 22/07/2016 | 22°15'12" S | 46°58'32" O | 680 |
| 9 | Mogi-Guaçu | Aquamiel | 22/07/2016 | 22°13'54" S | 46°58'45" O | 700 |
| 10 | Conchal | Valerin | 29/07/2016 | 22°25'35" S | 47°07'57" O | 609 |
| 11 | Sumaré | Compact | 27/09/2016 | 22°49'59" S | 47°18'49" O | 590 |
| 12 | Sumaré | Compact | 27/09/2016 | 22°49'59" S | 47°18'49" O | 590 |
| 13 | Sumaré | Compact | 27/09/2016 | 22°49'59" S | 47°18'49" O | 590 |
| 14 | Mogi-Guaçu | Valerin | 27/09/2016 | 22°12'44" S | 47°02'22" O | 650 |
| 15 | Mogi-Guaçu | Sartin | 27/09/2016 | 22°24'11" S | 47°12'48" O | 670 |
| 16 | Guapiara | Ravena | 20/12/2016 | 24°11'19" S | 48°37'56" O | 894 |
| 17 | Guapiara | Ravena | 20/12/2016 | 24°11'19" S | 48°37'56" O | 894 |
| 18 | Guapiara | Ravena | 20/12/2016 | 24°11'19" S | 48°37'56" O | 894 |
| 19 | Guapiara | Ravena | 20/12/2016 | 24°11'07" S | 48°40'48" O | 888 |
| 20 | Quadra | Italiano | 20/12/2016 | 23°15'09" S | 48°00'04" O | 583 |
| 21 | Quadra | Italiano | 20/12/2016 | 23°15'09" S | 48°00'04" O | 583 |
| 22 | Guapiara | Pizzadoro | 10/01/2017 | 24°08'39" S | 48°36'16" O | 854 |
| 23 | Ribeirão Branco | Campestre | 10/01/2017 | 24°07'14" S | 48°39'05" O | 895 |
| 24 | Ribeirão Branco | Campestre | 10/01/2017 | 24°11'41" S | 48°49'34" O | 895 |
| 25 | Ribeirão Branco | Campestre | 10/01/2017 | 24°10'38" S | 48°51'24" O | 794 |
| 26 | Ribeirão Branco | Campestre | 10/01/2017 | 24°11'17" S | 48°49'55" O | 794 |
| 27 | Ribeirão Branco | Campestre | 10/01/2017 | 24°11'43" S | 48°50'06" O | 827 |
| 28 | Capão Bonito | Pizzadoro | 10/01/2017 | 24°09'25" S | 48°38'56" O | 860 |
| 29 | Capão Bonito | Pizzadoro | 10/01/2017 | 24°09'25" S | 48°38'56" O | 860 |
| 30 | Sumaré | Compact | 27/04/2017 | 22°53'54" S | 47°16'12" O | 620 |
| 31 | Sumaré | Compact | 27/04/2017 | 22°50'29" S | 47°18'41" O | 580 |
| 32 | Monte Mor | Compact | 27/04/2017 | 22°55'60" S | 47°17'56" O | 580 |
| 33 | Elias Fausto | Compact | 27/04/2017 | 23°03'05" S | 47°20'04" O | 580 |
| 34 | Vargem Grande. | Tipo Cereja | 13/05/2017 | 23°32'18" S | 46°44'23" O | 720 |

Fonte: Eros Molina Occhiena - 2018

A coleta foi realizada não somente de folhas, mas também pecíolos e cálices dos frutos, que expressavam sintomas de doenças (Figura 6).

Em nenhuma das coletas, mesmo com alta incidência e severidade de doenças nas folhas, foram observados sintomas em frutos.

As amostras foram guardadas em sacos plásticos, devidamente etiquetados, com um número de ordem, coincidente com o número do GPS, nome do cultivar, idade aproximada, local, data da coleta, parte da planta coletada e armazenadas em isopor, para posterior observação no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Biológico, em Campinas-SP.

No laboratório, o material foi observado ao microscópio ótico para verificar a ocorrência de fluxo bacteriano e transferido para placas de Petri, contendo meio de cultura NA (extrato de carne 3,0 g; Peptona 5,0 g; NaCl 5,0 g e Agar 15 g por litro) e colocado em estufa incubadora por 72 h a 28°C. Nesta primeira etapa, uma série de organismos secundários se desenvolveram

e o processo foi repetido pinçando-se, com uma alça de platina, as colônias com características morfológicas semelhantes à *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, incubando-as novamente em meio NA por mais 72 h a 28.°C.

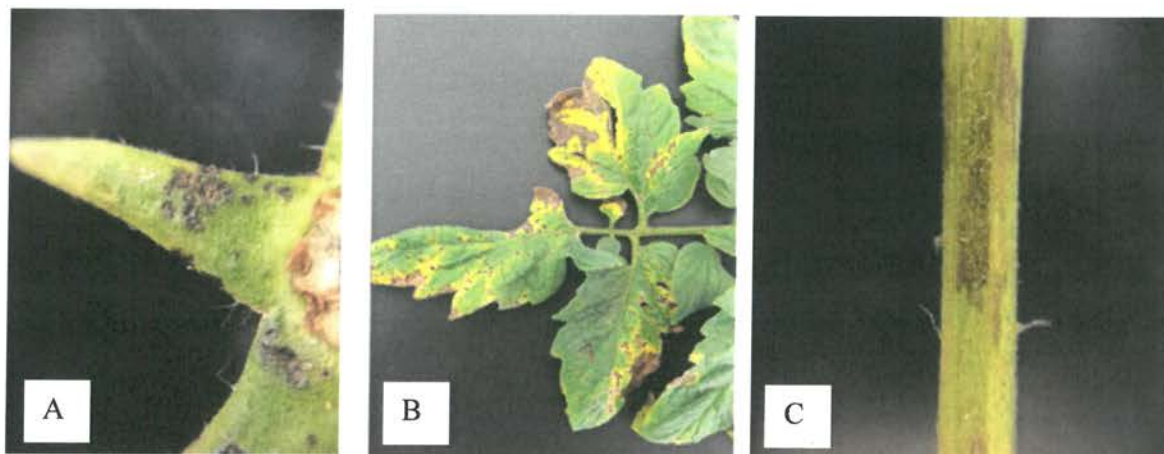


Figura 6 - Sintomas de bacterioses em diferentes partes do tomateiro: A. Cálice; B. Folha e C. Pecíolo

Após este período, as colônias apresentavam-se bem uniformes para a realização do teste de patogenicidade (Figura 7).

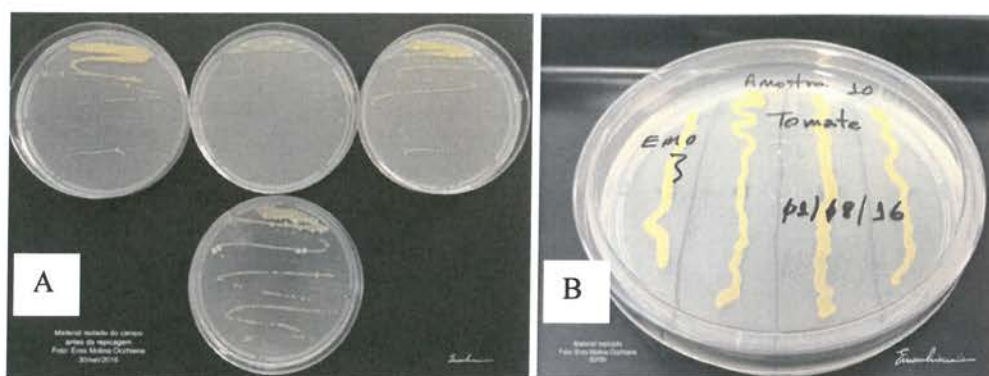


Figura 7 - Fases do isolamento de bactéria em tomate; antes da repicagem (A) e desenvolvimento das colônias selecionadas e repicadas (B).

Em função das características morfológicas, as colônias foram agrupadas segundo a possibilidade de pertencerem ao gênero *Xanthomonas* ou *Pseudomonas*, para os testes de patogenicidade.

4.2 Manutenção e purificação dos isolados bacterianos de tomate

O material purificado foi armazenado em tubo de ensaio contendo 5 mL de água destilada e esterilizada, duplamente autoclavada, em um intervalo de 24 h entre as autoclavagens, e mantidas em condição ambiente no laboratório.

Para algumas amostras, estas suspensões ainda foram purificadas, pelo método de estrias, em placas de Petri com meio de cultura NA, e incubadas a 28°C por 72 h. Após este período, uma colônia típica e individualizada foi transferida, com uma alça de platina em aro, previamente flambada para um tubo de ensaio contendo 5 mL de água destilada e esterilizada, que após devidamente homogeneizado, foi riscado novamente em meio de cultura NA. Este procedimento foi repetido por três vezes, até obter colônias completamente puras (MARINGONI, 2010).

Cada amostra de campo, isolada e purificada, foi conservada em uma suspensão com água destilada e esterilizada. Algumas vezes, de uma única amostra, foi isolado mais de um agente bacteriano, separados em função das características morfológicas e conservados em diferentes suspensões, utilizadas posteriormente nos testes de patogenicidade.

4.3 Patogenicidade dos isolados bacterianos de tomate

A patogenicidade dos isolados bacterianos foi avaliada em mudas de tomate, variedade Santa Clara, mantidas em estufa, com 3 folhas verdadeiras, completamente expandidas. As mudas foram obtidas através da semeadura em espuma fenólica (Figura 8), e posteriormente transplantadas para vasos maiores, com 7,5 cm de altura e 10,5 cm de diâmetro e capacidade para 415 mL, preenchidos com substrato de fibra de coco, tipo 80, pH-6,0, CE-0,4 ms/cm e fertilizados via água de irrigação com uma formulação que tinha como base em p/p (%) respectivamente, N-5,80, P₂O₅-1,70, K₂O-5,60, Ca-3,70, Mg-0,80, B-0,01, Cu-0,01, Fe-0,04, Mn-0,127, Zn-0,01, Mo-0,002 e Ni-0,002.

Para as inoculações foram preparadas suspensões com água destilada esterilizada, correspondentes aos isolamentos realizados dos materiais que vieram do campo, na concentração de 3×10^8 UFC.mL⁻¹, determinada por Escala de McFarland.

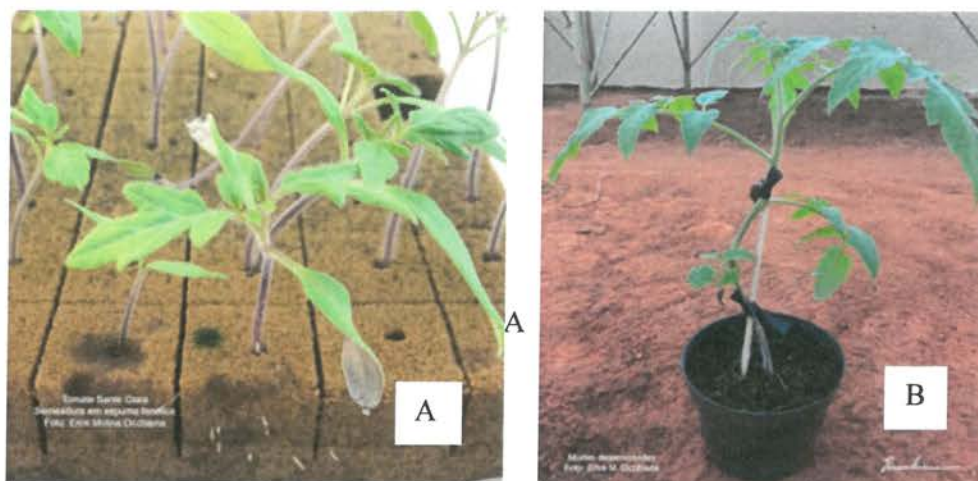


Figura 8 - Mudanças de tomate emergidas em espuma fenólica (A), mudas transplantadas para substrato de fibra de coco já desenvolvidas (B).

As mudas foram mantidas em câmara úmida, 24 h antes da inoculação. As inoculações foram realizadas por meio de um borrifador manual, pulverizando-se as superfícies abaxial e adaxial das folhas, antes do ponto de escorrimento, e as mudas mantidas em câmara úmida por 72 horas após a inoculação. A temperatura na casa-de-vegetação variou de 26 a 28.°C.

4.4 Identificação das espécies de *Xanthomonas* spp. , pela caracterização molecular dos isolados coletados no campo

As linhagens Tipo de *Xanthomonas*, patogênicas ao tomateiro, utilizadas como controles, foram cedidas da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Centro Experimental do Instituto Biológico, Campinas, SP, e estão listadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Linhagens de *Xanthomonas* patogênicas ao tomateiro

| Linhagens | BSBF | Outras Coleções | Hospedeiro | Procedência |
|------------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------|
| <i>X. euvesicatoria</i> | 2363 ^T | ICMP 4799 ^T | <i>Capsicum anuum</i> | EUA |
| <i>Xanthomonas gardneri</i> | 2373 ^T | NCPPB 881 ^T | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Iugoslávia |
| <i>Xanthomonas perforans</i> | 2370 ^T | ICMP 16690 ^T | <i>Lycopersicon esculentum</i> | EUA |
| <i>X. vesicatoria</i> | 2364 ^T | ICMP 63 ^T | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Nova Zelândia |

^T = linhagem tipo; IBSBF (Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Centro Experimental do Instituto Biológico Campinas - SP); ICMP (International Collection of Micro-organisms from Plants); NCPPB (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, United Kingdom).

4.4.1 Reativação e condições de cultivo das linhagens bacterianas do tomate

As ampolas das espécies Tipo de *Xanthomonas* preservadas por liofilização foram desinfestadas externamente com algodão umedecido em álcool etílico a 70%. As culturas liofilizadas foram reativadas, adicionando-se cerca de 200 µL de água destilada esterilizada. Após incubação por 30 minutos, a suspensão bacteriana foi coletada com micropipeta e semeada em placas de Petri contendo meio NA. Durante o experimento as linhagens foram cultivadas em meio NA e incubadas a 28°C por 48 horas.

4.4.2 Extração de DNA genômico das amostras patogênicas ao tomate

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pitcher; Saunders; Owen, (1989). A quantificação do DNA das amostras foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,6%. Os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL), visualizados e fotografados em sistema digital de fotodocumentação.

Para a extração de DNA genômico, as culturas foram desenvolvidas em 5 mL de meio líquido (NA sem adição de Agar) à 28°C por 12 a 16 horas, sob agitação constante de 150 rpm.

4.4.3 Amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction)

Na amplificação por PCR, foram utilizados os *primers* específicos de cada espécie de *Xanthomonas* patogênica ao tomateiro. Os isolados originários de lesões sintomáticas da mancha bacteriana do tomateiro foram submetidas à amplificação com os pares de *primers* Bs-XeF/Bs-XeR, específicos para *X. euvesicatoria*, Bs-XvF/Bs-XvR, específicos para *X. vesicatoria*, Bs-XgF/Bs-XgR, específicos para *Xanthomonas gardneri* e Bs-XpF/Bs-XpR, específicos para *Xanthomonas perforans* (Koenraad et al., 2009).

Para a amplificação foram preparadas reações de 25 µL, contendo 200 ng de DNA genômico, 1X tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 1X BSA (*Bovine Serum Albumine*) (10 mg/mL), 2 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), tampão da enzima *Taq* 1X; 1,5mM de MgCl₂; 0,2 µM de uma mistura de dNTPs; e 0,4 µM de cada *primer*.

O programa de amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 2 min.; seguido de 30 ciclos a 94°C/1 min.; 65°C/1 min (*primers* Bs-XeF/Bs-XeR e Bs-XpF/Bs-XpR) e 56°C/1 min (*primers* Bs-XvF/Bs-XvR e Bs-XgF/Bs-XgR), e 72°C/3 min; um ciclo a 72°C de 3 min. de extensão final, realizados em um termociclador MyCycler, Bio-Rad.

Os produtos da amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 2,5%. Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados e fotografados em sistema digital Alpha Innotech 2200.

4.5 Caracterização dos isolados de *Pseudomonas* spp. do tomateiro

A caracterização dos isolados de *Pseudomonas* spp, foi feita através de testes bioquímicos e fisiológicos , LOPAT teste com a produção de levan, o teste de oxidase, a podridão em discos de batata, a utilização de arginina-diidrolase e a hipersensibilidade em folhas de fumo (LELLIOTT et al., 1966)..

Pseudomonas syringae apresenta as reações para o LOPAT teste (+ - - - +) e a *Pseudomonas cichorii* (- + - - +).

4.6 Sensibilidade de isolados de bactérias do tomateiro ao antibiótico casugamicina, *in vitro*

Foram selecionados três isolados, em função da severidade dos sintomas nos testes de patogenicidade, para a determinação da sensibilidade a diferentes concentrações de casugamicina. Esses isolados foram multiplicados em meio de cultura NA e mantidos em estufa incubadora a 28°C por 72 h. Após este período, as colônias foram diluídas em água destilada esterilizada, ajustando-se a concentração, em espectrofotômetro para 1×10^4 UFC/mL. De cada suspensão, uma alíquota de 100 µL foi espalhada, com uma alça de Drigalski, nas placas contendo meio de cultura NA e o pH ajustado para 7, nas quais o antibiótico casugamicina foi diluído em quatro concentrações, 0 (testemunha), 60; 80; 100 e 120 ppm, com três repetições por concentração. As placas assim preparadas foram mantidas em estufa a 28°C por 72 h e após este período, contou-se o número de colônias formadas por placa, com o auxílio de um contador de colônias CP600 Plus – Phoenix.

4.7 Sensibilidade de *Xanthomonas perforans* a casugamicina, *in vivo*

O teste *in vivo* foi conduzido com mudas de tomate Santa Clara, em condições de casa-de-vegetação e inoculadas com uma suspensão bacteriana de *Xanthomonas perforans* ajustada para 3×10^8 UFC/ mL.

Foi avaliada a eficiência do fungicida-antibiótico Kasumin (casugamicina 20 g i.a./L) de forma preventiva e curativa. Os tratamentos avaliados estão discriminados na Tabela 9.

Tabela 9 - Tratamentos avaliados em mudas de tomate Santa Clara, em condições de casa-de-vegetação, no controle de *Xanthomonas perforans* - Pereiras-SP – 2018

| Tratamentos | (**)g i.a 100 L ⁻¹ |
|------------------------------|-------------------------------|
| 1. Testemunha sem inoculação | - |
| 2. Testemunha inoculada | - |
| 3. Casugamicina (*) | 6,00 |
| 4. Casugamicina | 8,00 |
| 5. Casugamicina | 10,00 |
| 6. Casugamicina | 12,00 |

(*) Lote: 009-16-9662 Fabricação: Março / 2016 Vencimento: Março / 2021

(**) g i.a. – gramas de ingrediente ativo

4.7.1 Avaliação do tratamento preventivo, com casugamicina, em tomate Santa Clara, em condição de casa-de-vegetação, no controle de *Xanthomonas perforans*

O experimento foi instalado em condições de casa-de-vegetação, no período de abril a junho de 2018, no município de Pereiras-SP, coordenadas geográficas 23°09'12"S (Lat.), 47°57'29"O (Long.), 562 m de altitude, num delineamento experimental de blocos ao acaso, com 5 repetições, sendo que cada vaso, com uma planta, correspondeu a uma repetição.

As mudas de tomate, foram transplantadas em vasos plásticos, com substrato de fibra de coco e irrigadas diariamente com uma solução nutritiva, que tinha como base em p/p (%): N-5,80, P₂O₅-1,70, K₂O-5,60, Ca-3,70, Mg-0,80, B-0,01, Cu-0,01, Fe-0,04, Mn-0,127, Zn-0,01, Mo-0,002 e Ni-0,002.

Para avaliação da ação preventiva dos tratamentos, as mudas com 3 a 4 folhas completamente expandidas receberam duas pulverizações, com intervalos de 4 dias e foram inoculadas, 24h após a última pulverização, com uma suspensão de *Xanthomonas perforans* ajustada para a concentração de 3 x 10⁸ UFC/mL.

Os parâmetros referentes às pulverizações estão descritos na Tabela 10.

Após a segunda pulverização, tão logo secas, as mudas de tomate foram para a câmara úmida, mantida com um umidificador durante 24 horas (Figura 10), antes da inoculação da suspensão bacteriana.

Depois da inoculação com a suspensão de *Xanthomonas perforans*, as plantas foram mantidas em câmara úmida por mais 72 horas, sendo que nos horários de pico de temperatura, a câmara foi aberta para regular a temperatura interior, que ultrapassava 30°C em alguns períodos do dia.

O inóculo de *X. perforans* foi isolado da região de Sumaré-SP, em área de produção comercial de tomate para mesa, coletado em 20/07/2016. Placas de Petri, com meio de cultura

NA, foram semeadas com a suspensão de *X.perforans* 72 h antes do preparo da suspensão bacteriana para inoculação.

Tabela 10 - Parâmetros de pulverização na avaliação do efeito preventivo de casugamicina no controle de *Xanthomonas perforans* em tomate - Pereiras - SP - 2018

| Dados Gerais da Pulverização | 1ª Pulverização | 2ª Pulverização |
|----------------------------------|---------------------------|-----------------|
| Data | 18/04/2018 | 22/04/2018 |
| Horário de início | 16h30min | 15h45min |
| Horário final | 17h45min | 16h20min |
| T(°C) | 26,4 | 32,8 |
| UR (%) | 46 | 41 |
| Estádio fenológico – BBCH* | 14 | 14-15 |
| Volume de calda por planta | 20 mL | 22 mL |
| pH água pulverização (destilada) | 6,50 | 6,50 |
| pH da calda de pulverização | 5,4-5,6 | 5,4-5,6 |
| Equipamento | Borrifador manual Guarany | |

(*) Escala BBCH - MEIER et al. (2009)

A suspensão bacteriana foi preparada com água destilada, pH 7,0, com a adição de espalhante adesivo Haiten, na concentração de 0,1 mL/L de suspensão. Tão logo ajustada a concentração bacteriana, para 3×10^8 UFC/mL a suspensão foi aplicada nas plantas.

As inoculações foram feitas aspergindo-se a suspensão bacteriana nas superfícies abaxial e adaxial das folhas, por meio de um aplicador manual, padronizando-se o número de acionamentos do gatilho por planta, para uma distribuição uniforme do inóculo em todos os vasos. Na média foram gastos 4,2 mL de suspensão bacteriana por planta.

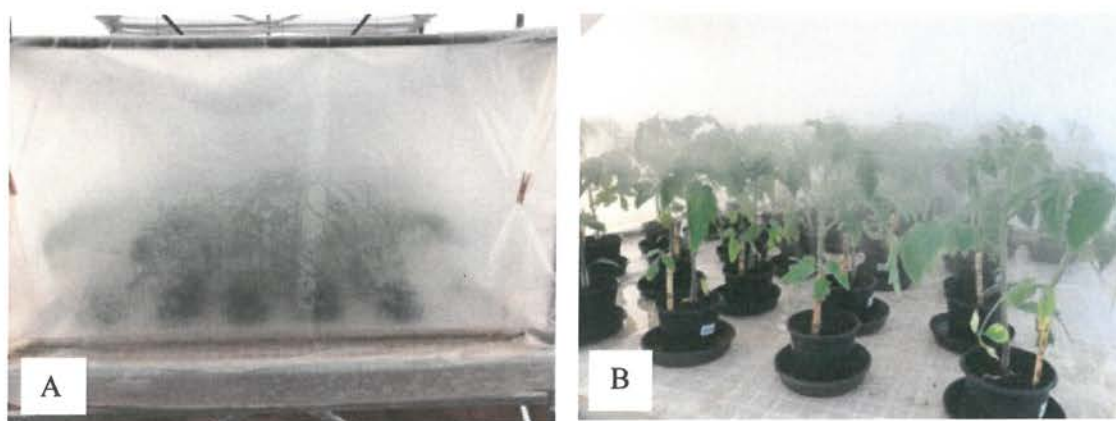


Figura 9 - Plantas de tomate em câmara úmida 24 horas antes e 72 horas após inoculação com *Xanthomonas perforans*. Câmara úmida fechada (A) e visão no interior da câmara com umidificação (B).

Os seguintes parâmetros foram considerados para as avaliações dos danos causados por *Xanthomonas perforans* nas folhas:

1. Severidade de doença, expressa em percentagem de área foliar lesionada, com o uso do software Leaf Doctor (PETHYBRIDGE; NELSON, 2015), amostrando-se 3 folhas completamente expandidas por vaso/planta aos 8; 11 e 19 dias após a segunda aplicação (DA2A). As folhas foram fotografadas nos diferentes períodos de avaliação e ajustadas, através do programa Leaf Doctor, para determinação da percentagem de área foliar lesionada (Figura 10);

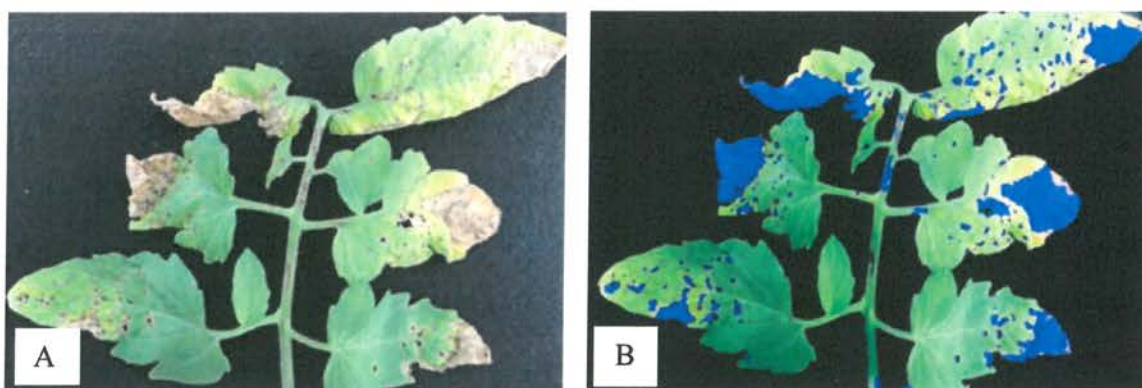


Figura 10 - Imagem original da amostra de folha com sintomas de *Xanthomonas* spp. (A) e imagem ajustada com o auxílio do software Leaf Doctor para avaliação de área lesionada (B).

2. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), (SHANER; FINNEY (1977), de acordo com a equação;

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i)$$

Onde:

AACPD: Área sob a curva de progresso da doença;

Y_i = Proporção da doença na i -ésima repetição;

T_i = Tempo em dias na i -ésima observação;

n = Número total de observações.

3. Peso da matéria seca das folhas até a inserção da primeira inflorescência;

4. Peso e número de frutos formados, independentemente do tamanho e estágio de maturação, na última avaliação de severidade de doença nas folhas.

Os tratamentos com casugamicina foram os únicos produtos fitossanitários utilizados nas plantas. As plantas foram fertilizadas via água de irrigação, diariamente e manualmente, e tão logo retiradas da câmara úmida foram dispostas em blocos ao acaso dentro da casa-de-vegetação, cada bloco contendo uma sequência de 6 tratamentos dispostos ao acaso.

Durante o desenvolvimento vegetativo das plantas, foram feitas as desbrotas, comuns à cultura do tomate, e acima da inserção da primeira inflorescência foi realizada uma capação (Figura 11).



Figura 11 - Condição da muda de tomate após capação da haste principal.

As avaliações de doença foram realizadas sempre nas mesmas três folhas de cada planta, até quando a maioria destas folhas se apresentavam coalescidas. Por ocasião da última avaliação de doenças nas folhas, foi feita a colheita e pesagem dos frutos formados na primeira penca, independentemente do tamanho e condição de maturação (Figura 12).



Figura 12 - Planta de tomate em vaso, em condições de casa-de-vegetação, com formação de frutos na primeira inflorescência.

Para avaliação do peso da matéria seca das folhas foram colhidas, todas as folhas, até a inserção da primeira inflorescência, armazenadas em sacos de papel e mantidas na estufa até completa secagem das folhas, determinada pela estabilidade de variação do peso do material.

4.7.2 Avaliação do efeito do tratamento curativo, com casugamicina, em tomate Santa Clara, no controle de *Xanthomonas perforans* em condição de casa-de-vegetação

Na avaliação do efeito curativo dos tratamentos, as plantas foram inoculadas em 23/04/2018, segundo metodologia descrita anteriormente e uma única pulverização foi realizada 72 h após a inoculação, nesta fase ainda com ausência de sintomas nas folhas.

A condução das plantas foi a mesma adotada para a avaliação do efeito preventivo dos tratamentos.

Os parâmetros de pulverização, para a avaliação do efeito curativo dos tratamentos, estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11- Parâmetros de pulverização na avaliação do efeito curativo da casugamicina no controle de *Xanthomonas perforans* em tomate - Pereiras - 2018

| Dados Gerais da Pulverização | 1ª Pulverização |
|----------------------------------|---------------------------|
| Data | 26/04/2018 |
| Horário de início | 15h |
| Horário final | 16h |
| T(°C) | 35,0 |
| UR (%) | 54 |
| Estádio fenológico – BBCH* | 14-15 |
| Volume de calda por planta | 20 mL |
| pH água pulverização (destilada) | 6,50 |
| pH da calda de pulverização | 5,4-5,6 |
| Equipamento | Borrifador Manual Guarany |

(*) Escala BBCH - MEIER et al. (2009)

Os parâmetros de avaliação no tratamento curativo foram os mesmos da avaliação preventiva., sendo realizadas 3 avaliações de doença em folhas aos 9; 15 e 26, dias após a primeira aplicação (DA1A)

4.7.3 Análise estatística dos testes de avaliação dos tratamentos preventivo e curativo, in vivo

Os dados originais foram submetidos à análise de variância, transformados pela $\sqrt{X+0,5}$, quando necessário, e a diferença entre as médias comparadas pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico SASM-Agri® - Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas (CANTERI et al. 2001).

A fórmula de ABBOTT (1925) foi usada como referência para cálculo das percentagens de controle para os parâmetros avaliados.

Os dados de temperatura e umidade relativa durante a condução na casa-de-vegetação estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Dados de temperatura, temperatura máxima e mínima, umidade relativa e umidade relativa máxima e mínima durante o período de condução do teste *in vivo*, em condições de casa-de-vegetação - Pereiras-SP- 2018

| Dia | T °C ⁽¹⁾ | T _{max} °C ⁽²⁾ | T _{min} °C ⁽³⁾ | UR % ⁽⁴⁾ | UR _{max} (%) ⁽⁵⁾ | UR _{min} (%) ⁽⁶⁾ |
|------------|---------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 18/04/2018 | 26,4 | 42,5 | 13,5 | 46,0 | 79,0 | 24,0 |
| 22/04/2018 | 32,8 | 43,3 | 11,6 | 41 | 75 | 19 |
| 23/04/2018 | 34,2 | 35,6 | 18,0 | 53 | 78 | 51 |
| 25/04/2018 | 33,6 | 39,3 | 15,6 | 45 | 78 | 38 |
| 26/04/2018 | 30,2 | 35,6 | 29,8 | 61 | 61 | 41 |
| 28/04/2018 | 32,2 | 37,2 | 17,4 | 46 | 83 | 43 |
| 30/04/2018 | 33,2 | 36,4 | 31,2 | 39 | 74 | 37 |
| 02/05/2018 | 28,7 | 35,8 | 16,3 | 52 | 95 | 38 |
| 05/05/2018 | 29,4 | 29,5 | 17,3 | 61 | 76 | 53 |
| 07/05/2018 | 29,2 | 32,8 | 29,1 | 45 | 59 | 33 |
| 08/05/2018 | 33,3 | 36,5 | 16,4 | 30 | 74 | 30 |
| 09/05/2018 | 29,7 | 33,8 | 29,6 | 35 | 42 | 30 |
| 10/05/2018 | 32,7 | 39,9 | 17,0 | 40 | 72 | 28 |
| 11/05/2018 | 31,7 | 38,2 | 31,6 | 41 | 42 | 30 |
| 12/05/2018 | 25,1 | 40,5 | 14,0 | 48 | 76 | 27 |
| 16/05/2018 | 24,5 | 24,9 | 16,5 | 68 | 73 | 48 |
| 18/05/2018 | 22,9 | 34,3 | 22,8 | 62 | 68 | 36 |
| 22/05/2018 | 33,9 | 40,5 | 6,3 | 28 | 88 | 22 |
| 23/05/2018 | 30,2 | 34,2 | 30,2 | 30 | 30 | 26 |
| 25/05/2018 | 37,0 | 40,0 | 9,2 | 34,0 | 86,0 | 29,0 |
| 27/05/2018 | 33,2 | 36,4 | 32,8 | 38,0 | 39,0 | 34,0 |
| 03/06/2018 | 24,6 | 40,5 | 9,8 | 59,0 | 86,0 | 25,0 |
| 08/06/2018 | 24,9 | 32,4 | 12,7 | 66,0 | 87,0 | 44,0 |
| 15/06/2018 | 29,4 | 34,5 | 10,9 | 53,0 | 90,0 | 34,0 |

⁽¹⁾ T°C – temperatura em graus Celsius.

⁽²⁾ T_{max}°C – temperatura máxima em graus Celsius.

⁽³⁾ T_{min}°C – temperatura mínima em graus Celsius.

⁽⁴⁾ UR(%) – umidade relativa.

⁽⁵⁾ UR_{max}(%) – umidade relativa máxima.

⁽⁶⁾ UR_{min}(%) – umidade relativa mínima.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta, manutenção e testes de patogenicidade dos isolados bacterianos de tomate

Grande parte dos testes de patogenicidade foram realizados a partir de setembro de 2016, em condições de casa-de-vegetação, com sistema de ventilação programado para acionamento quando a temperatura atingisse 26°C, mas esta condição não garantia uma estabilidade da temperatura nesta faixa. Seguramente, parte dos testes foram efetivados em condição de temperatura acima de 30°C, especialmente quando se mantinha as mudas em câmara úmida.

A diferença de temperatura dentro da cobertura plástica, no qual as mudas ficaram envolvidas, variava de 4 a 5°C para mais, comparada com a parte externa. Das folhas inoculadas e que manifestaram lesões características da doença, as bactérias foram reisoladas, fechando-se assim, os postulados de Koch. Foi observada uma variação muito grande na expressão e severidade dos sintomas de um isolado para outro.

Os isolados de *X. perforans*, foram muito agressivos com uma alta capacidade de causar danos, enquanto que os isolados de *X. gardneri*, apresentaram severidade e lesões menores, nas condições do teste de patogenicidade (Figura 13).



Figura 13 - Diferenças na expressão dos sintomas da mancha bacteriana do tomateiro entre *Xanthomonas gardneri* (A) e *Xanthomonas perforans* (B) em condição de casa-de-vegetação.

Estes dados concordam com o relatado por Araújo et al. (2010), que em temperaturas mais altas, *X. perforans* mostra-se mais agressiva, enquanto que *X. gardneri*, causa maiores danos em condição de temperaturas mais amenas, 20°C.

Uma condição interessante e que evidencia o complexo de doenças bacterianas, que

ocorrem na cultura do tomate, é que em uma mesma amostra, duas espécies, *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas perforans* foram encontradas (Figura 14). Esta diferenciação, pela diagnose visual no campo, não é possível.

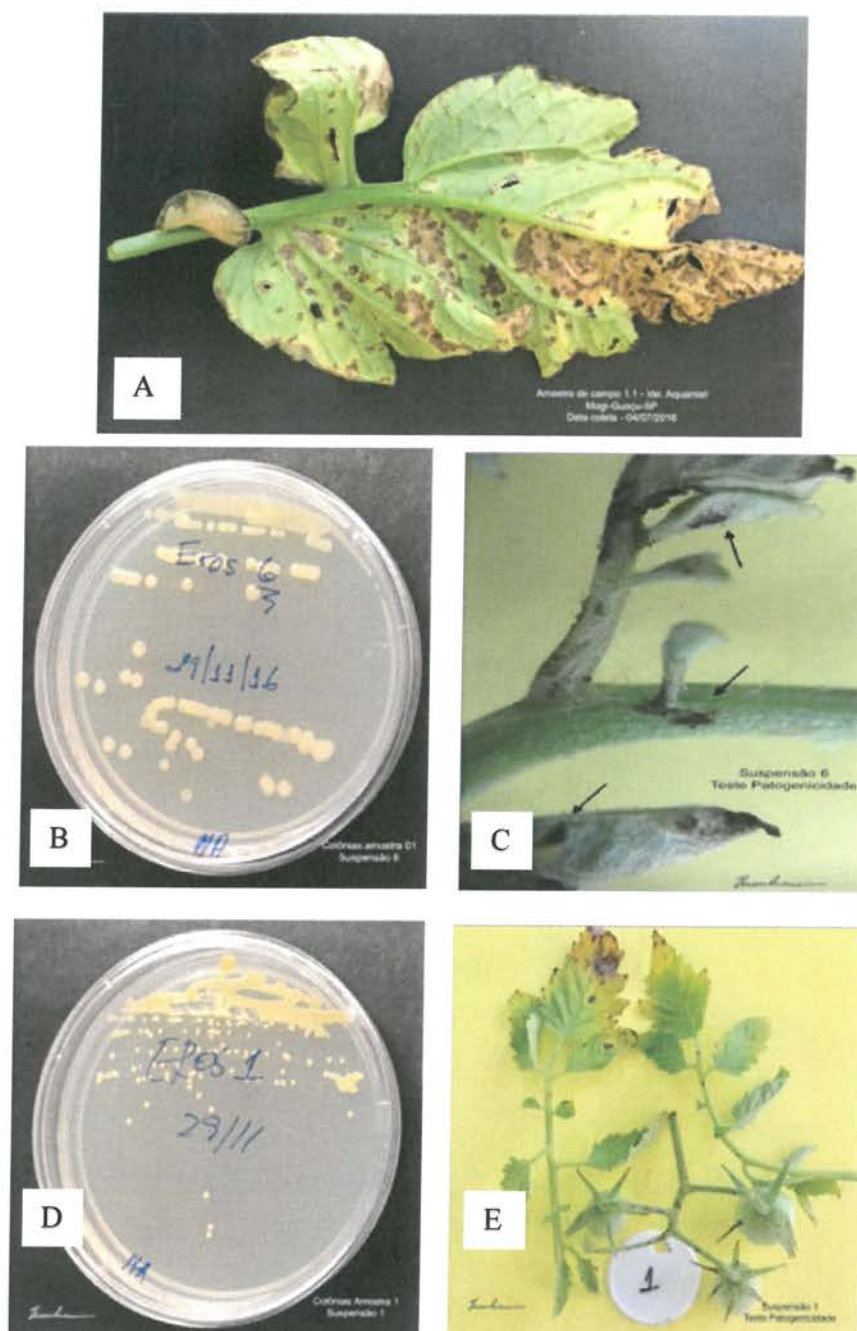


Figura 14 - Amostra de folha de tomate coletada no campo com sintomas de bacterioses (A); isolamento com colônias típicas de *Pseudomonas* spp. (B); teste de patogenicidade positivo para *Pseudomonas* spp. (C); colônias típicas de *Xanthomonas* spp. (D) e teste de patogenicidade positivo para *Xanthomonas* spp.

5.2 Identificação das espécies de *Xanthomonas* spp. pela caracterização molecular dos isolados

As espécies de *Xanthomonas* spp, coletadas na região produtora de tomate para mesa no estado de São Paulo, foram identificadas através da comparação dos perfis genômicos por PCR com as linhagens Tipo, de referência IBSBF 2363 (*X. euvesicatoria*), IBSBF 2373 (*Xanthomonas gardneri*), IBSBF 2370 (*Xanthomonas perforans*) e, IBSBF 2364 (*X. vesicatoria*).

As ampliações para *Xanthomonas perforans* foram predominantes e em uma amostra da região de Sumaré-SP foi identificada a espécie *Xanthomonas vesicatoria* (Figuras 15 e 16).

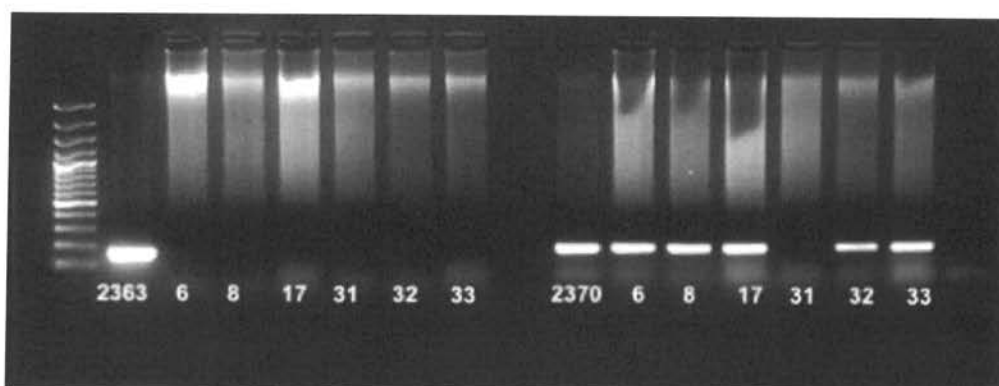


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 2,5% da amplificação do DNA de diferentes linhagens, IBSBF 2363 linhagem Tipo de *Xanthomonas euvesicatoria*, IBSBF 2370 linhagem Tipo de *Xanthomonas perforans*.

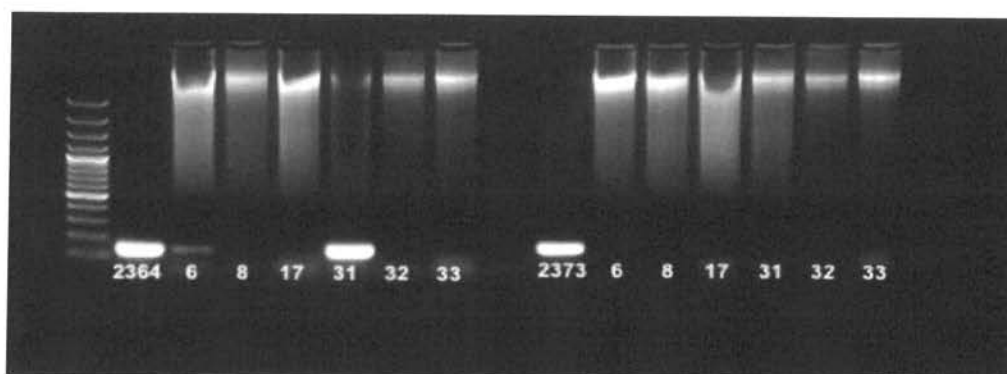


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 2,5% da amplificação do DNA de diferentes linhagens, IBSBF 2364 linhagem tipo de *Xanthomonas vesicatoria*, IBSBF 2373 linhagem Tipo de *Xanthomonas gardneri*.

A relação dos pontos de amostragem, em lavouras de tomate para mesa, no estado de São Paulo e respectivas espécies identificadas encontram-se na (Tabela 13).

Tabela 13 – Municípios de coleta, cultivar de tomate declarado, coordenadas geográficas e espécie de bactéria - São Paulo-SP - 2018

| N.º | Municípios | Cultivares | Coordenadas Geográficas | | Espécie |
|-----|-----------------|---------------|-------------------------|-------------|-------------------------------|
| 1 | Mogi-Guaçu | Aquamiel | 22°10'16" S | 46°57'15" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 2 | Mogi-Guaçu | Aquamiel | 22°10'16" S | 46°57'15" O | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 3 | Mogi-Guaçu | Ozônio | 22°09'12" S | 46°57'35" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 4 | Mogi-Guaçu | Ozônio | 22°09'12" S | 46°57'35" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 5 | Sumaré | Não informada | 22°51'50" S | 47°17'00" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 6 | Hortolândia | Não informada | 22°52'13" S | 47°17'49" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 7 | Estiva Gerbi | Débora | 22°15'12" S | 46°58'32" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 8 | Estiva Gerbi | Débora | 22°15'12" S | 46°58'32" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 9 | Mogi-Guaçu | Aquamiel | 22°13'54" S | 46°58'45" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 10 | Conchal | Valerin | 22°25'35" S | 47°07'57" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 11 | Sumaré | Compaq | 22°49'59" S | 47°18'49" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 12 | Sumaré | Compaq | 22°49'59" S | 47°18'49" O | <i>C. m. pv. michiganense</i> |
| 13 | Sumaré | Compaq | 22°49'59" S | 47°18'49" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 14 | Mogi-Guaçu | Valerin | 22°12'44" S | 47°02'22" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 15 | Mogi-Guaçu | Sartin | 22°24'11" S | 47°12'48" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 16 | Guapiara | Ravena | 24°11'19" S | 48°37'56" O | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 17 | Guapiara | Ravena | 24°11'19" S | 48°37'56" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 18 | Guapiara | Ravena | 24°11'19" S | 48°37'56" O | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 19 | Guapiara | Ravena | 24°11'07" S | 48°40'48" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 20 | Quadra | Italiano | 23°15'09" S | 48°00'04" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 21 | Quadra | Italiano | 23°15'09" S | 48°00'04" O | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 22 | Guapiara | Pizzadoro | 24°08'39" S | 48°36'16" O | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 23 | Ribeirão Branco | Campestre | 24°07'14" S | 48°39'05" O | <i>Xanthomonas gardneri</i> |
| 24 | Ribeirão Branco | Campestre | 24°11'41" S | 48°49'34" O | <i>Xanthomonas gardneri</i> |
| 25 | Ribeirão Branco | Campestre | 24°10'38" S | 48°51'24" O | <i>Xanthomonas gardneri</i> |
| 26 | Ribeirão Branco | Campestre | 24°11'17" S | 48°49'55" O | <i>Xanthomonas gardneri</i> |
| 27 | Ribeirão Branco | Campestre | 24°11'43" S | 48°50'06" O | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 28 | Capão Bonito | Pizzadoro | 24°09'25" S | 48°38'56" O | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 29 | Capão Bonito | Pizzadoro | 24°09'25" S | 48°38'56" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 30 | Sumaré | Compaq | 22°53'54" S | 47°16'12" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 31 | Sumaré | Compaq | 22°50'29" S | 47°18'41" O | <i>X. vesicatoria</i> |
| 32 | Monte Mor | Compaq | 22°55'60" S | 47°17'56" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 33 | Elias Fausto | Compaq | 23°03'05" S | 47°20'04" O | <i>Xanthomonas perforans</i> |
| 34 | Vargem Grande | Tipo Cereja | 23°32'18" S | 46°44'23" O | <i>Pseudomonas cichorii</i> |

Uma distribuição percentual das espécies de bacterioses que foram identificadas na faixa de maior produção de tomate para mesa, no estado de São Paulo, é apresentada na Figura 17.

Percentualmente, *X. perforans* predomina na área de produção, que vai da região sudoeste do estado de São Paulo, até a divisa com o estado de Minas Gerais, e se destaca pela sua agressividade, severidade com que ocorre nas folhas e está distribuída em toda a faixa de produção de tomate para mesa no estado de São Paulo.

A espécie *X. gardneri* foi encontrada em Ribeirão Branco, município limítrofe com Guapiara e Capão Bonito, na região sudoeste do estado de São Paulo, muito provavelmente pela condição de clima mais ameno e temperaturas mais baixas que ocorrem naquela região. Estes dados confirmam os resultados apresentados por ARAÚJO, et al. (2017) em levantamento de espécies e raças de *Xanthomonas* spp. que ocorrem em tomate de mesa e tomate para indústria nos principais estados brasileiros.

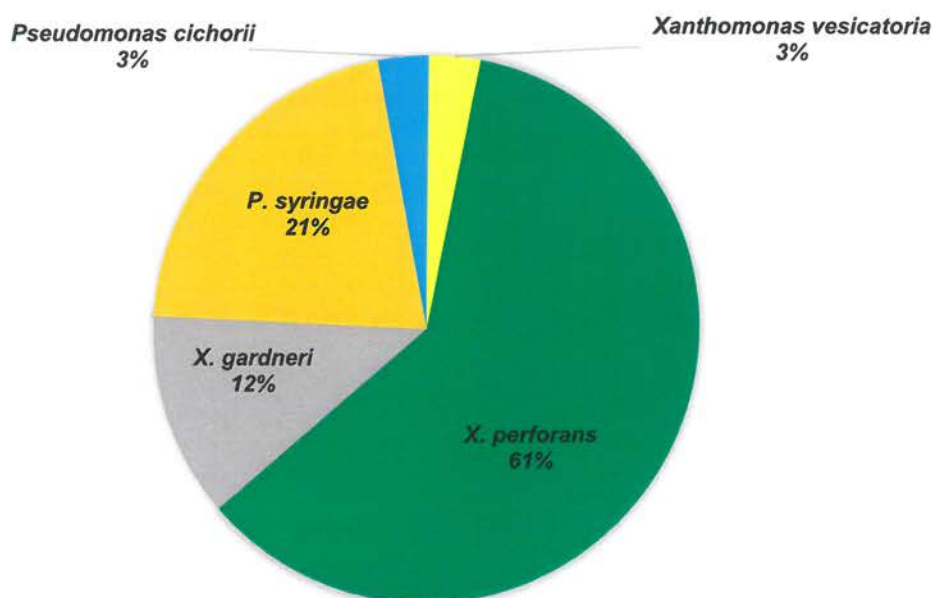


Figura 17 - Distribuição percentual de espécies bacterianas, encontradas na área de produção de tomate para mesa, no estado de São Paulo - 2016-17.

Uma única identificação de *X. vesicatoria* ocorreu na região de Sumaré-SP. Destacou-se também a presença de *P. syringae*, que não foi identificada ao nível de patovar, e que ocorreu simultaneamente com *Xanthomonas perforans* em amostras dos municípios de Mogi Guaçu-SP e Guapiara-SP.

Embora não tão agressiva como a *X. perforans*, causa danos e está presente ao longo da faixa de produção, de tomate para mesa, no estado de São Paulo. Das sete amostras nas quais foi identificada, seis eram da região sudoeste do estado, dos municípios de Ribeirão Branco-SP e Guapiara-SP.

Em todas as lavouras visitadas, foram mais de 40 áreas de produtores, o cancro bacteriano, *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis*, foi encontrado em apenas uma área de Sumaré-SP. O cancro bacteriano ocorre de forma mais localizada dentro das áreas dos produtores, mas não é observado de forma generalizada na área de produção, como acontece com *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp.

Vale destacar que, em nenhuma das lavouras visitadas, foram encontradas lesões em frutos no tomate para mesa, diferente do que ocorre para *Xanthomonas* spp. em tomate para indústria, que é comum a ocorrência de sintomas nos frutos em materiais suscetíveis.

A distribuição das variedades na área amostrada esta muito relacionada com a força dos canais de distribuição nas respectivas regiões e um balanço numérico de como estavam distribuídas é apresentado na Figura 18. A informação da variedade utilizada foi apresentada pelo produtor por ocasião da visita.

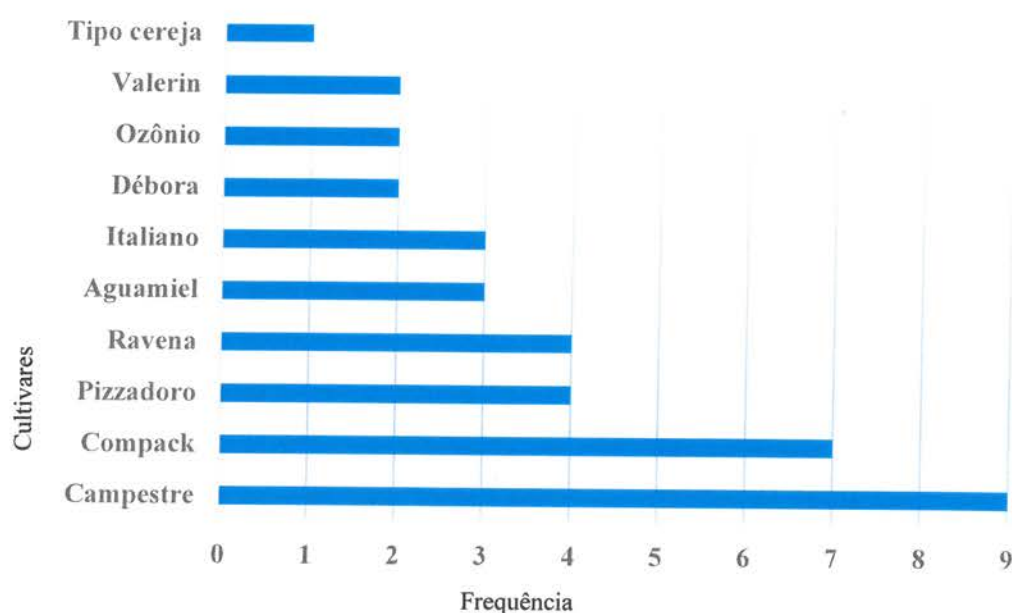


Figura 18 - Frequência de distribuição de cultivares de tomate para mesa encontradas na região produtora do estado de São Paulo - 2016-17.

5.3 Caracterização dos isolados de *Pseudomonas* spp das amostras coletadas na área de produção de tomate para mesa no estado de São Paulo

| Nº | Local | Cultivar | Teste LOPAT | | | | | Espécie |
|----|--------------------|-------------|-------------|---|---|---|---|-----------------------------|
| | | | *L | O | P | A | T | |
| 2 | Mogi-Guaçu | Aquamiel | + | - | - | - | + | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 16 | Guapiara | Ravena | + | - | - | - | + | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 18 | Guapiara | Ravena | + | - | - | - | + | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 21 | Quadra | Italiano | + | - | - | - | + | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 22 | Guapiara | Pizzadoro | + | - | - | - | + | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 27 | Ribeirão Branco | Campestre | + | - | - | - | + | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 28 | Capão Bonito | Pizzadoro | + | - | - | - | + | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| 34 | Vargem G. Paulista | Tipo Cereja | - | + | - | - | + | <i>Pseudomonas cichorii</i> |

(*) L= Levan, O= oxidase, P= protopectinase em batata, A = Arginina Diidrolase e T = hipersensibilidade em fumo
Fonte: Lelliot, Billing e Hayward (1966).

5.4 Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas perforans* do tomateiro ao antibiótico casugamicina, *in vitro*

A avaliação da sensibilidade ao antibiótico casugamicina foi realizada com três isolados de *Xanthomonas perforans* respectivamente das regiões de Quadra-SP, Sumaré-SP e Mogi Guaçu-SP. Estes isolados foram selecionados pela severidade de doença que manifestaram nos testes de patogenicidade e o isolado de Mogi Guaçu-SP foi escolhido também para os testes *in vivo*, com inoculações em condições de casa-de-vegetação. Os dados de contagem de colônias de *Xanthomonans perforans* são apresentados nas tabelas 14, 15 e 16.

Tabela 14 - Número de colônias de *Xanthomonas perforans*, procedente do município de Quadra-SP, em diferentes concentrações de casugamicina, fundida em meio NA, 72 horas após a incubação a 28°C

| Tratamentos | Repetições | | | Média | % Eficiência |
|-------------------------|------------|-----|-----|--------|--------------|
| | I | II | III | | |
| NA – casugamicina 0 ppm | 356 | 318 | 340 | 338,66 | - |
| Casugamicina 60 ppm | 119 | 46 | 152 | 105,66 | 69 |
| Casugamicina 80 ppm | 112 | 148 | 93 | 117,66 | 65 |
| Casugamicina 100 ppm | 63 | 85 | 67 | 71,66 | 79 |
| Casugamicina 120 ppm | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |

Obs.: 100 µL da suspensão, espalhado nas placas com alça de Drigalski, na concentração de 1×10^4 UFC/ml.

%EF : ABBOTT (1925)

Tabela 15 - Número de colônias de *Xanthomonas perforans*, procedente do município de Sumaré - SP, em diferentes concentrações de casugamicina, fundida em meio NA, 72 horas após a incubação a 28°C

| Tratamentos | Repetições | | | Média | % Eficiência |
|-------------------------|------------|-----|-----|-------|--------------|
| | I | II | III | | |
| NA – casugamicina 0 ppm | 231 | 363 | 369 | 321 | - |
| Casugamicina 60 ppm | 114 | 72 | 78 | 88 | 73 |
| Casugamicina 80 ppm | 51 | 48 | 93 | 64 | 80 |
| Casugamicina 100 ppm | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| Casugamicina 120 ppm | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |

Obs.: 100 µL da suspensão bacteriana, espalhado nas placas com alça de Drigalski na concentração de 1×10^4 UFC/ml.

%EF : ABBOTT (1925)

Tabela 16 - Número de colônias de *Xanthomonas perforans*, procedente do município de Mogi Guaçu - SP, em diferentes concentrações de casugamicina, fundida em meio NA, 72 horas após a incubação a 28°C

| Tratamentos | Repetições | | | Média | % Eficiência |
|-------------------------|------------|-----|-----|-------|--------------|
| | I | II | III | | |
| NA – casugamicina 0 ppm | 522 | 346 | 486 | 451 | - |
| Casugamicina 60 ppm | 228 | 150 | 162 | 180 | 60 |
| Casugamicina 80 ppm | 54 | 28 | 70 | 50 | 89 |
| Casugamicina 100 ppm | 6 | 6 | 8 | 6,6 | 98 |
| Casugamicina 120 ppm | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |

Obs.: 100 µL da suspensão bacteriana, espalhado nas placas com alça de Drigalski, na concentração de 1×10^4 UFC/ml.

%EF : ABBOTT (1925)

Ocorreu uma variação no número de colônias para os isolados avaliados, mas que permitiu discriminar numericamente a ação *in vitro* da casugamicina nas quatro concentrações testadas.

O isolado do município de Quadra-SP apresentou crescimento de colônias bacterianas nas concentrações de casugamicina de 60, 80 e 100 ppm. O número de colônias nas concentrações de casugamicina a 60 e 80 ppm praticamente se igualaram, não foi observado efeito do aumento da concentração da casugamicina na diminuição do número de colônias e a 120 ppm não ocorreu crescimento bacteriano.

Para os isolados do município de Sumaré-SP e Mogi-Guaçu-SP, foi observada uma melhor resposta ao aumento da concentração de casugamicina e diminuição do número de colônias bacterianas. Para os isolados destes dois municípios, também não ocorreu crescimento bacteriano na concentração de casugamicina a 120 ppm.

Diferentemente dos isolados de Quadra-SP e Mogi-Guaçu-SP, para o isolado de Sumaré-SP, não foi observado crescimento bacteriano a partir da concentração de casugamicina a 100 ppm até 72 h após a incubação a 28°C.

Pela magnitude do teste *in vitro*, não se pode inferir sobre a sensibilidade de *Xanthomonas perforans* na área produtora de tomate para mesa do estado de São Paulo, mas para os isolados selecionados, observou-se uma resposta ao ingrediente ativo casugamicina, especialmente nas maiores concentrações.

5.5 Sensibilidade de *Xanthomonas perforans* a casugamicina, *in vivo*

A avaliação dos efeitos dos tratamentos com casugamicina *in vivo*, foi realizada com mudas de tomate Santa Clara, em condição de casa-de-vegetação, considerando-se um programa de tratamento preventivo e outro curativo, ambos com inoculações artificiais.

5.6 Avaliação do tratamento preventivo, com casugamicina, em tomate Santa Clara, em condição de casa de vegetação, no controle de *Xanthomonas perforans*

As avaliações de severidade de doença aos 8; 11; e 19 DA2A (dias após a segunda aplicação) estão descritas na (Tabela 17).

Tabela 17 - Severidade de área foliar afetada (%) por *Xanthomonas perforans* em mudas de tomate Santa Clara, em condição de casa-de-vegetação, com duas aplicações preventivas de casugamicina e inoculação após 24 h da segunda pulverização - Pereiras - SP - 2018.

| Tratamentos | g i.a. 100 L ⁻¹ | 30-abr | | 3-mai | | 11-mai | |
|------------------------|----------------------------|--------|---|--------|----|--------|----|
| | | 8DA2A* | | 11DA2A | | 19DA2A | |
| 1. Test. não inoculada | - | 0,00 | a | 0,00 | b | 0,00 | c |
| 2. Test. inoculada | - | 0,93 | a | 3,96 | a | 13,45 | a |
| 3. Casugamicina | 6,00 | 0,10 | a | 0,32 | ab | 2,31 | bc |
| 4. Casugamicina | 8,00 | 0,00 | a | 0,59 | ab | 6,81 | ab |
| 5. Casugamicina | 10,00 | 0,68 | a | 0,73 | ab | 5,82 | ab |
| 6. Casugamicina | 12,00 | 0,14 | a | 0,98 | ab | 7,52 | ab |
| CV (%) | | 34,4 | | 47,01 | | 36,88 | |

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

*8DA2A- oito dias após a segunda pulverização.

** Coeficiente de variação dos dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

Sete dias após a inoculação, ocorreram os primeiros sintomas da mancha bacteriana nas mudas. A primeira avaliação de severidade de doença nas folhas foi realizada aos 8 dias após a segunda pulverização.

Aos 8DA2A, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Aos 11 DA2A, os níveis de severidade nas mudas tratadas com casugamicina, em todos os tratamentos, foram menores que os da testemunha inoculada, as dosagens de casugamicina não diferiram entre si, e nessa avaliação se definiu os maiores níveis de eficiência dos tratamentos, variando de 75 a 92% de controle (Tabela 18). A partir dos 19 DA2A, excetuando-se o tratamento a 6,00 g i.a.100 L⁻¹, que não diferiu do controle não inoculado, os tratamentos com casugamicina de 8,00 a 12,00 g i.a.100L⁻¹ não diferiram da testemunha inoculada e os níveis de controle reduziram-se muito.

Em todas as avaliações, o tratamento com casugamicina a 6,00 g i.a.100 L⁻¹, apresentou os menores níveis de severidade e não ficou claro uma curva de dose-resposta para a casugamicina nas condições em que o experimento foi conduzido.

Pelos resultados obtidos em casa de vegetação, em uma condição de aplicação preventiva, até os 11 DA2A os níveis de controle foram bons, possivelmente após este período, os resultados seriam melhores se uma terceira pulverização tivesse sido realizada após o início do aparecimento da doença.

De uma maneira geral, pela condição da casa-de-vegetação, a doença ficou limitada as folhas que receberam a inoculação, não atingindo as folhas do topo na medida que a planta ia crescendo.

Tabela 18 - Percentagem de eficiência no controle de *Xanthomonas perforans* em mudas de tomate Santa Clara, em condição de casa-de-vegetação, com duas aplicações preventivas de casugamicina e inoculação após 24 h da segunda pulverização - Pereiras - SP - 2018

| Tratamentos | g i.a. 100 L ⁻¹ | 30-abr | 3-mai | 11-mai |
|--------------------|----------------------------|--------|--------|--------|
| | | 8DA2A* | 11DA2A | 19DA2A |
| 1. Test. inoculada | - | - | - | - |
| 2. Casugamicina | 6,00 | 90 | 92 | 83 |
| 3. Casugamicina | 8,00 | 100 | 85 | 49 |
| 4. Casugamicina | 10,00 | 27 | 82 | 57 |
| 5. Casugamicina | 12,00 | 85 | 75 | 44 |

*Porcentagem de eficiência calculada pela fórmula de Abbott (1925).

Observou-se pela curva de progresso de doença, nos diferentes tratamentos com casugamicina, na condição preventiva, que os níveis de severidade de mancha bacteriana ficaram até os 19 DA2A muito abaixo da testemunha inoculada (Figura 19).

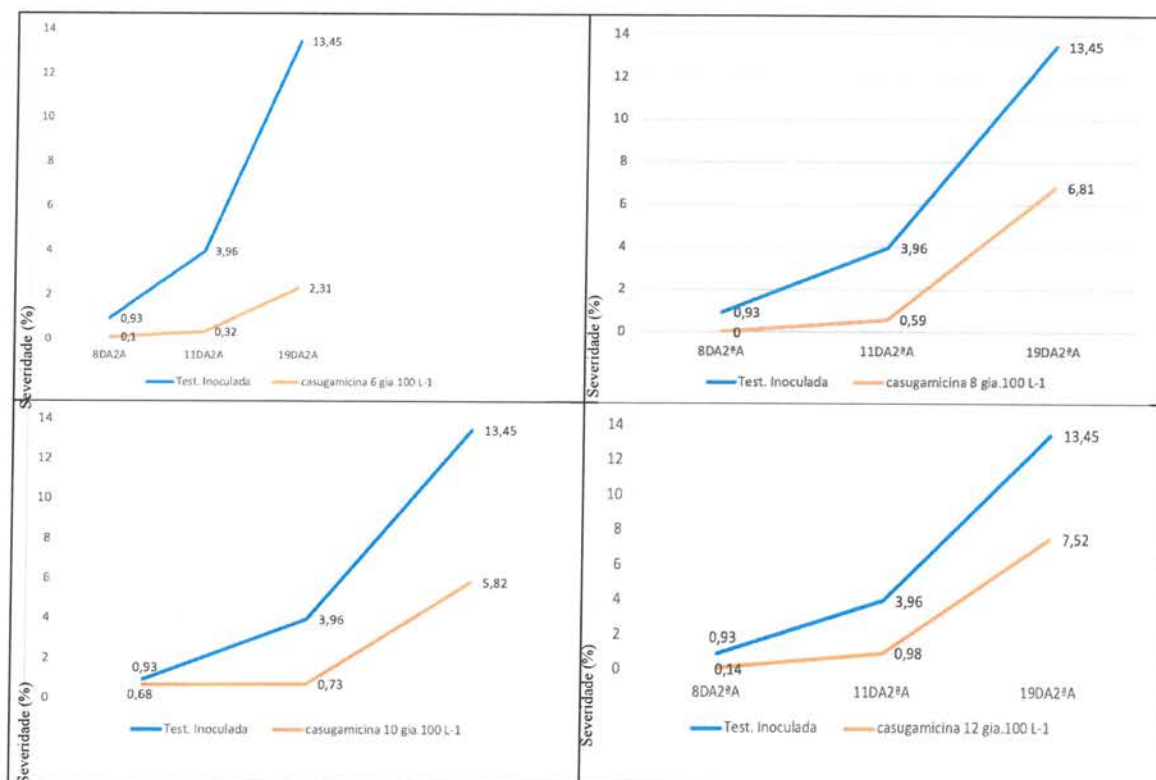


Figura 19 - Curva de progresso de severidade de *Xanthomonas perforans* em pulverização preventiva de casugamicina a 6, 8, 10 e 12 g i.a. 100 L⁻¹, em mudas de tomate Santa Clara, em condições de casa-de-vegetação. Pereiras-SP, 2018.

Pela análise da AACPD, o tratamento preventivo com casugamicina a 6 g i.a. 100 L⁻¹ foi o mais eficiente, diferindo dos demais tratamentos com casugamicina. Não ocorreu, nas condições do experimento, uma diminuição da severidade da mancha bacteriana com o aumento das doses da casugamicina (Tabela 19). As dosagens de casugamicina a 8; 10; e 12 g i.a. 100 L⁻¹ não diferiram entre si e tenderam a igualar-se a testemunha inoculada, mas apresentaram eficiência de controle que variou de 50 a 60% de controle.

Para peso da matéria seca, todos os tratamentos com casugamicina foram superiores a testemunha inoculada, sendo que a dosagem de 12 g i.a. 100 L⁻¹, isoladamente diferiu estatisticamente das demais e igualou-se a testemunha não inoculada (Tabela 19). Esta condição permitiu inferir que, embora não tenha sido observada uma diminuição significativa, pelos parâmetros de avaliação adotados para severidade de doença, existiu o peso do processo infeccioso que afetou significativamente o desenvolvimento vegetativo na

testemunha inoculada em comparação com os demais tratamentos, com reflexo muito claro no desenvolvimento vegetativo das mudas (Figuras 20; 21; 22; 23 e 24).

Não houve diferença entre os tratamentos para número de frutos na primeira penca.

Para peso de frutos embora o teste estatístico não tenha detectado diferenças, a testemunha não inoculada apresentou o maior peso de frutos e todos os tratamentos com casugamicina apresentaram peso de fruto superiores a testemunha inoculada (Tabela 19).

Tabela 19 - Controle preventivo de *Xanthomonas perforans* em tomate, com casugamicina, expresso pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), percentagem de eficiência, peso seco de folhas (g), número e peso de frutos (g) - Pereiras - SP - 2018

| Tratamentos | g i.a. 100L ⁻¹ | AACPD | % Eficiência | PS (g) ¹ | NF ² | PF(g) ³ |
|------------------------|------------------------------|----------|--------------|---------------------|-----------------|--------------------|
| 1. Test. não inoculada | - | 0,00 c | - | 17,56 a | 4,80 a | 102,19 a |
| 2. Test. inoculada | - | 117,36 a | - | 9,98 b | 4,80 a | 70,79 a |
| 3. Casugamicina | 6,00 | 18,08 bc | 84,59 | 12,52 ab | 4,00 a | 97,16 a |
| 4. Casugamicina | 8,00 | 50,92 ab | 56,61 | 12,39 ab | 4,00 a | 97,12 a |
| 5. Casugamicina | 10,00 | 45,80 ab | 60,97 | 16,81 ab | 4,00 a | 102,88 a |
| 6. Casugamicina | 12,00 | 58,26 ab | 50,36 | 18,27 a | 3,40 a | 100,28 a |
| CV (%) | | 38,6 | | 25,38 | 19,45 | 26,04 |

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

*Porcentagem de eficiência calculada pela fórmula de Abbott (1925).

¹PS – peso seco das folhas (g).

²NF-número de frutos.

³PF- peso de frutos (g).

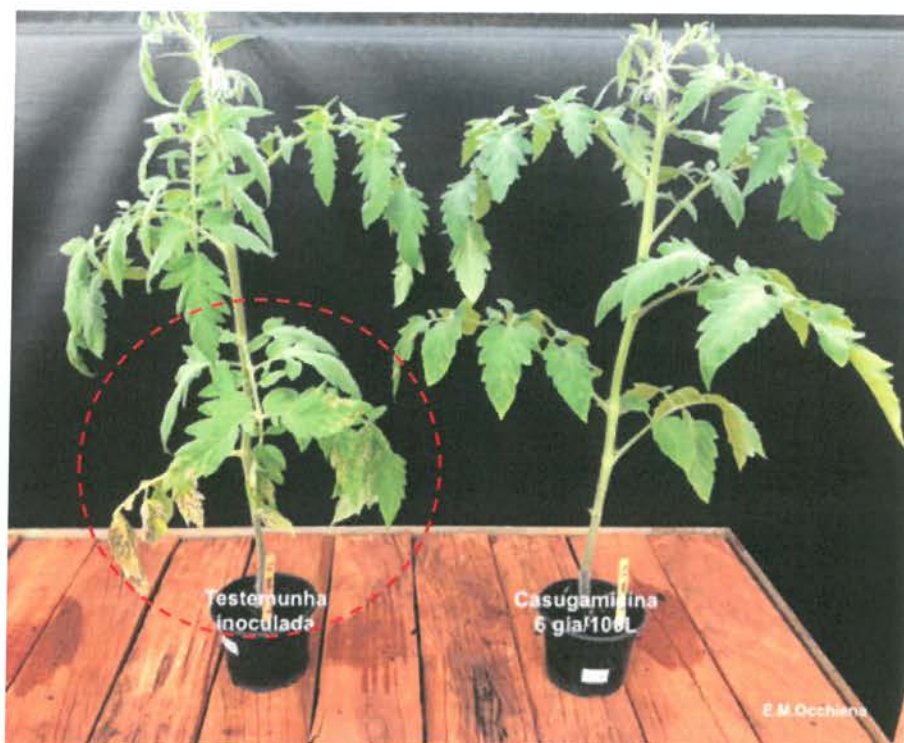


Figura 20 - Foto comparativa da testemunha inoculada e do tratamento preventivo com casugamicina a 6 g i.a. 100 L⁻¹, em tomate Santa Clara, no controle de *Xanthomonas perforans*, 12 dias após a inoculação. Pereiras-SP-2018.

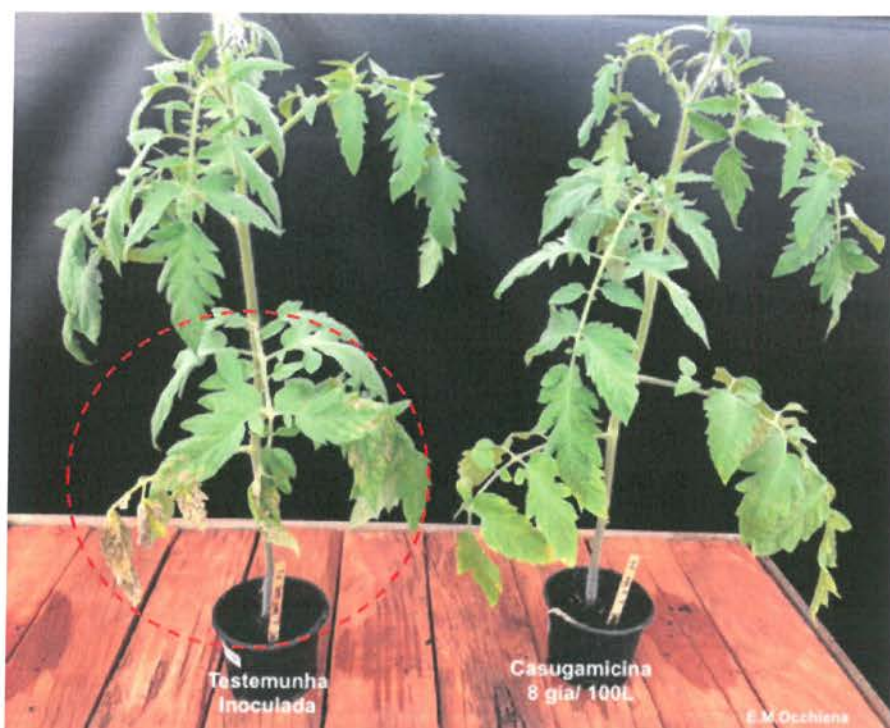


Figura 21 - Foto comparativa da testemunha inoculada e do tratamento preventivo com casugamicina a 8 g i.a. 100 L⁻¹, em tomate Santa Clara, no controle de *Xanthomonas perforans*, 12 dias após a inoculação - Pereiras-SP - 2018.



Figura 22 - Foto comparativa da testemunha inoculada e do tratamento preventivo com casugamicina a 10 g i.a.100 L⁻¹, em tomate Santa Clara, no controle de *Xanthomonas perforans*, 12 dias após a inoculação - Pereiras-SP – 2018.



Figura 23 - Foto comparativa da testemunha inoculada e do tratamento preventivo com casugamicina a 12 g i.a.100 L⁻¹ em tomate Santa Clara, no controle de *Xanthomonas perforans*, 12 dias após a inoculação - Pereiras-SP - 2018.

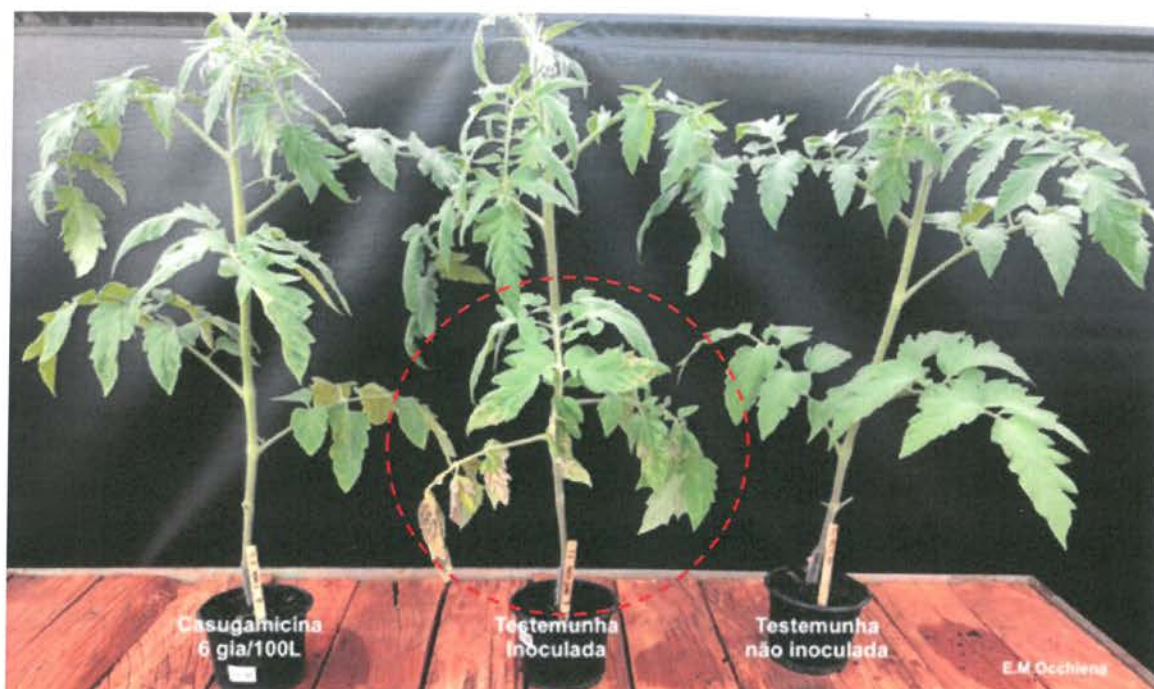


Figura 24 - Foto comparativa da testemunha inoculada, testemunha não inoculada e do tratamento preventivo com casugamicina a 6 g i.a. 100 L⁻¹, em tomate Santa Clara, no controle de *Xanthomonas perforans*, 12 dias após a inoculação. Pereiras-SP, 2018.

5.7 Avaliação do tratamento curativo, com casugamicina, em tomate Santa Clara, em condição de casa-de-vegetação, no controle de *Xanthomonas perforans*

Considerando-se a severidade de doença, expressa pela percentagem de área foliar afetada, aos 9 DA1A; 15 DA1A e 26 DA1A (dias após a primeira aplicação) (Tabela 20), os tratamentos com casugamicina não diferiram entre si e igualaram-se a testemunha inoculada e as eficiências de controle foram baixas.

A avaliação aos 9DA1A é a que melhor discrimina o percentual de controle que variou de 22% a 53% (Tabela 21) e as avaliações subsequentes apresentaram controles negativos com reflexos na AACPD (área abaixo da curva de progresso) (Tabela 22).

Para a avaliação de peso da matéria seca, os tratamentos não diferiram das testemunhas inoculada e não inoculada, embora numericamente a testemunha não inoculada apresentou o maior peso de matéria seca (Tabela 22).

Considerando-se peso de frutos, os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si, mas todos os tratamentos com casugamicina apresentaram peso de frutos superiores a testemunha inoculada (Tabela 22).

Tabela 20 - Severidade de área foliar afetada (%) por *Xanthomonas perforans* em mudas de tomate Santa Clara, com uma pulverização curativa de casugamicina, 72 h após inoculação - Pereiras - SP - 2018

| Tratamentos | g i.a.100L ⁻¹ | 5-mai | | 11-mai | | 22-mai | |
|-------------------------|--------------------------|---------|----|---------|----|---------|---|
| | | 9 DA1A* | | 15 DA1A | | 26 DA1A | |
| 1. Test. não inoculada | - | 0,00 | b | 0,00 | b | 0,00 | b |
| 2. Testemunha inoculada | - | 3,59 | a | 5,42 | a | 28,49 | a |
| 3. Casugamicina | 6,00 | 1,98 | a | 4,36 | a | 36,41 | a |
| 4. Casugamicina | 8,00 | 2,46 | a | 7,07 | a | 30,81 | a |
| 5. Casugamicina | 10,00 | 2,79 | a | 6,07 | a | 36,09 | a |
| 6. Casugamicina | 12,00 | 1,68 | ab | 3,41 | ab | 33,75 | a |
| CV (%) | | 24,5 | | 35,12 | | 45,31 | |

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

*9DA1A- nove dias após a primeira pulverização.

** Coeficiente de variação dos dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

Tabela 21 - Percentagem de eficiência no controle de *Xanthomonas perforans* em mudas de tomate Santa Clara, com uma pulverização curativa de casugamicina 72 h após a inoculação - Pereiras - SP - 2018

| Tratamentos | g i.a.100 L ⁻¹ | 5-mai | 11-mai | 22-mai |
|--------------------|---------------------------|-------|--------|--------|
| | | 9DA1 | 15DA1 | 26DA1 |
| 1. Test. inoculada | - | - | - | - |
| 2. Casugamicina | 6,00 | 44,66 | 19,66 | -27,78 |
| 3. Casugamicina | 8,00 | 31,39 | -30,40 | -8,13 |
| 4. Casugamicina | 10,00 | 22,15 | -11,97 | -26,66 |
| 5. Casugamicina | 12,00 | 53,14 | 37,04 | -18,47 |

*Porcentagem de eficiência calculada pela fórmula de Abbott (1925).

Tabela 22 - Controle de *Xanthomonas perforans* em tomate, com uma pulverização curativa, 72 h após inoculação, expresso pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), eficiência (%), peso seco de folhas (PS) e peso de frutos (PF) - Pereiras - SP - 2018

| Tratamentos | g i.a.100L ⁻¹ | AACPD | % Eficiência | PS (g) ¹ | PF(g) ³ |
|------------------------|--------------------------|----------|--------------|---------------------|--------------------|
| 1. Test. não inoculada | - | 0,00 b | - | 16,89 a | 119,23 a |
| 2. Test. inoculada | - | 213,56 a | - | 12,34 a | 86,56 a |
| 3. Casugamicina | 6,00 | 243,22 a | -13,89 | 11,85 a | 97,18 a |
| 4. Casugamicina | 8,00 | 236,92 a | -10,94 | 12,18 a | 90,57 a |
| 5. Casugamicina | 10,00 | 258,48 a | -21,03 | 13,44 a | 96,13 a |
| 6. Casugamicina | 12,00 | 219,70 a | -2,88 | 13,02 a | 107,08 a |
| CV (%) | | | | 8,56 | 11,66 |

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação dos dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

*Porcentagem de eficiência calculada pela fórmula de Abbott (1925).

Comparando-se os níveis de controle aos 11 e 9 dias, após a última pulverização de casugamicina, para as avaliações dos tratamentos preventivos e curativos respectivamente, nos quais os níveis de severidade de mancha bacteriana nas testemunhas inoculadas estavam próximos a 4% , nota-se uma diferença significativa em termos de controle do tratamento preventivo, que variou de 75% a 92%, para o tratamento curativo, que ficou na faixa de 22% a 53% de controle.

Estes menores índices de controle para o tratamento curativo, que foi feito 5 dias antes do aparecimento dos sintomas, com uma condição de infecção latente já estabelecida, ficou comprometido.

Talvez esta condição de controle da avaliação curativa, pudesse ser melhorada com uma segunda pulverização dos tratamentos, ou diminuindo o intervalo entre a inoculação e a primeira pulverização.

Estes resultados indicaram que em uma condição de casa-de-vegetação, a aplicação curativa da casugamicina deve ser feita antes de 72h após a inoculação. Este intervalo entre o início da infecção e a pulverização curativa de casugamicina deve ser melhor estudado.

Após a retirada das plantas da câmara úmida, a condição de umidade relativa na casa-de-vegetação foi baixa e a temperatura atingiu várias marcas acima dos 30°C, mas mesmo com essa condição ocorreu o progresso de severidade da mancha bacteriana, com o isolado de *X. perforans*, mas a doença ficou restrita às folhas inoculadas, causando desfolha na parte baixa das plantas com reflexos no desenvolvimento vegetativo (Figura 25).

Os resultados dos tratamentos preventivos foram mais consistentes, retardando a severidade de progresso da doença em uma condição de casa-de-vegetação, com temperaturas altas, umidade relativa baixa e sem molhamento foliar, uma vez que as plantas eram irrigadas com uma solução nutritiva direcionada ao vaso plástico.

Esta condição não é encontrada em áreas de produção, em períodos chuvosos, muito favoráveis a ocorrência de bacterioses, daí a importância de se construir um programa de tratamento preventivo, associado a práticas culturais que minimizem os danos na cultura com um correto balanço nutricional nas plantas.

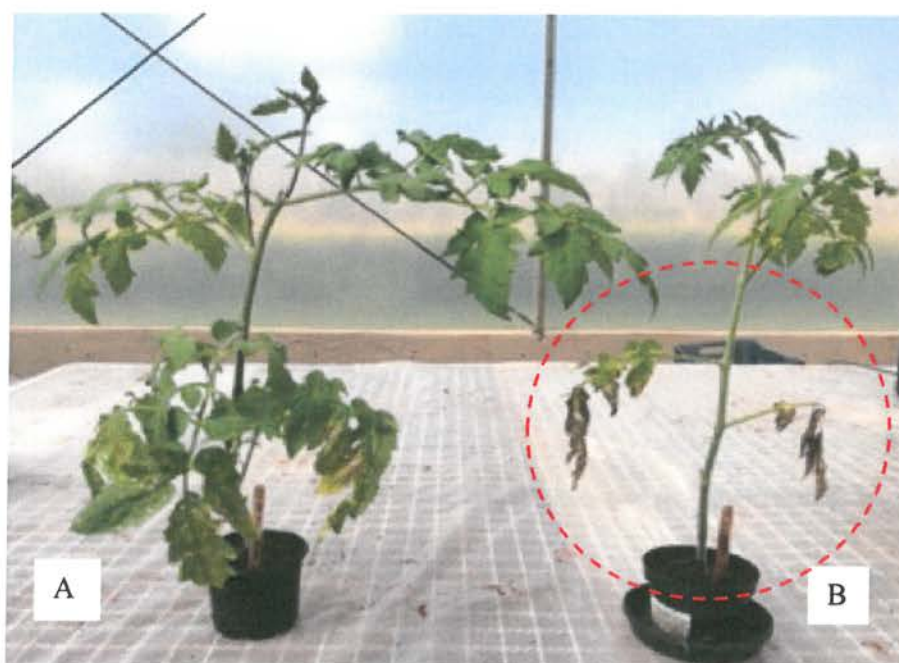


Figura 25 - Desenvolvimento vegetativo de uma muda tratada preventivamente com casugamicina (A) e uma testemunha inoculada (B) - Pereiras-SP – 2018.

6 CONCLUSÕES

O levantamento de bacterioses foliares que ocorrem na região produtora de tomate para mesa no estado de São Paulo confirmou que a espécie predominante é a *X. perforans*, detectada em 61% das amostras, seguida por *P. syringae* (21%), *X. gardneri* (12%); *P. cichorii* (3%) e *X. vesicatoria* (3%).

O complexo *Xanthomonas* spp representou 76 % do total amostrado.

A espécie *X. gardneri* foi encontrada somente na região sudoeste do estado de São Paulo, região com temperaturas mais amenas, e nos testes de patogenicidade, realizados em casa-de-vegetação, apresentou uma severidade de doença menor que *X. perforans*.

A espécie *P. syringae* tem um peso significativo em termos de frequência de ocorrência e nos testes de patogenicidade os danos na parte aérea foram menores que os causados por *X. perforans*.

Em uma mesma amostra de campo foram encontradas as espécies *P. syringae* e *X. perforans*.

Isolados da espécie *X. perforans* de três localidades do estado de São Paulo, mostraram-se sensíveis a casugamicina *in vitro*, mas a ausência de crescimento de colônias ocorreu somente na concentração de 120 ppm.

Em condição de casa-de-vegetação, *in vivo*, com pulverizações preventivas e inoculação de *X. perforans* 24h após a segunda pulverização, a casugamicina em todas as dosagens testadas, reduziu a severidade de doença e retardou o desenvolvimento da doença nas folhas, permitindo um melhor desenvolvimento vegetativo das plantas de tomate.

Em condição de casa-de-vegetação, *in vivo*, com uma pulverização curativa, 72h após a inoculação de *X. perforans*, a casugamicina em todas as dosagens avaliadas apresentou baixo controle, sugerindo que após a infecção a aplicação curativa de casugamicina deva ser feita antes desse período.

Este trabalho utilizou um isolado de *X. perforans* da região de Sumaré-SP, escolhido pela sua agressividade nos testes de patogenicidade, mas seria interessante avaliar a sensibilidade de *X. perforans* de outras localidades e para as demais espécies identificadas neste levantamento.

Ao nível de campo, não se pode pensar em manejo de bacterioses de forma isolada e apesar da importância e agressividade da espécie *X. perforans*, a espécie *P. syringae* pode estar presente na mesma área e dependendo da condição local, aumentar os danos foliares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. **A method of computing the effectiveness of an insecticide.** J. econ. Entomol, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário.** 2017. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 19/10.
- ALIPPI, A. **Histopatología de hojas de tomate inoculadas con *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria.** Agronomie, v. 12, n. 1, p. 115-122, 1992.
- ALVARENGA, M. A. R. **Produção em campo, casa de vegetação e hidroponia.** 2.^a Ed. revisada e ampliada. ed. Lavras: Marco Antônio Rezende Alvarenga, 2013. 11-21 p.
- ALVARENGA, M. A. R.; COELHO, F. S. **Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia.** 2.^a Edição. ed. Lavras: Editora Universitária de Lavras - Lavras - MG, 2013. 25-28 p.
- ARAÚJO, E. et al. **Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *Xanthomonas gardneri* in Brazil.** Plant Pathology, v. 66, n. 1, p. 159-168, 2017.
- ARAÚJO, E. et al. **Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *Xanthomonas gardneri*.** III International Symposium on Tomato Diseases 914, 2010. p.39-42.
- ARAÚJO, E. et al. **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, n. 1, p. 79-87, 2012.
- ARAÚJO, E. R. **Competitividade entre espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro.** Brasília, Universidade de Brasília, Dissertação de Mestrado, 2010. 82p.
- BOUZAR, H. et al. **Bacterial spot-worldwide distribution, importance and review.** I International Symposium on Tomato Diseases 695, 2004. p.27-34.
- CANTERI, M. G. et al. **SASM-AGRI-Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan.** Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2001.
- CAMARGO FILHO, W. P. D.; CAMARGO, F. P. D. **Evolução das cadeias produtivas de tomate industrial e para mesa no Brasil, 1990-2016.** Informações Economicas, São Paulo, 47, n. 1, Julho 2017. 50-59.
- CARMO, M. G. F. D. et al. **Eradication treatments of *Xanthomonas vesicatoria* and its effect on the quality of tomato seeds.** Horticultura Brasileira. 22: 579-584 p. 2004. CEAGESP, 2017. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br>>. Acesso em: Outubro 2017.

- CONAB. Boletim Hortigranjeiro - Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília, 3, n. 1, Janeiro 2017. 159. Disponível em: <www.ceasa.gov.br>.
- COSTA, J. R. et al. **Occurrence and characterization of the species complex causing tomato bacterial spot in "Alto Vale do Rio do Peixe", SC, Brazil.** Tropical Plant Pathology, v. 37, n. 2, p. 149-154, 2012.
- D.O.U. Diário Oficial da União Suplemento p. 31, 28/09/ 2009.
- DA SILVA, D. A. G. et al. **Transporte de *Xanthomonas vesicatoria* de sementes para plântulas e mudas de tomate.** Hort. bras, v. 31, n. 1, 2013.
- EPA. Kasumin label in the United States of America.
https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/066330-00404-20160608.pdf: U.S. Environmental Protection Agency 2016.
- EMBRAPA. **A cultura do tomateiro (para mesa).** Coleção Plantar; 5. ed. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1993. 92 p.
- FAO. Food and Agricultural Organization of the United Nations. www. fao.org, 03 Outubro 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>.
- HORTICERES. Hortices sementes. Disponível em: <hortices.com.br>. Acesso em: 09 outubro 2017.
- IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Rio de Janeiro, 30, n. 8, Agosto 2017. 1-86.
- HAMZA, A. A. et al. **Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region.** Plant Disease, v. 94, n. 8, p. 993-999, 2010.
- HIRAMATSU, M. et al. **Effect of kasugamycin on the control of bacterial diseases.** Plant pathogenic bacteria: Proceedings of the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 1989. p.219-224.
- JONES, J. B. et al. **Reclassification of the *Xanthomonads* Associated with Bacterial Spot Disease of Tomato and Pepper.** System, v. 27, p. 755-762, 2004.
- LELLIOTT, R.; BILLING, E.; HAYWARD, A. **A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *pseudomonads*.** Journal of applied bacteriology, v. 29, n. 3, p. 470-489, 1966.
- LIMA, R. S. **O complexo da mancha-bacteriana em *Capsicum* no Brasil: espécies de *Xanthomonas* e sua sensibilidade ao cobre.** 2015. 87p. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças.** Brasília: EMBRAPA, CNPH, 1997.
- MALAVOLTA JR., V. A. et al. **Caracterização de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em tomateiro no Brasil e reação de cultivares/genótipos de tomateiro a esse patovar e ao**

patovar tomate. Arquivos do Instituto Biológico, v. 69, n. 1, p. 63-66, 2002.

MALAVOLTA JR., V. A. et al. **Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização.** Summa Phytopathologica : The Official Journal of São Paulo State Plant Pathology Association / Grupo Paulista de Fitopatologia, 34, n. Special Supplement, Fevereiro 2008.

MALAVOLTA Jr., V. A. et al. **Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização.** Summa phytopatológica, v. 34, n. FEV, p. 9-87, 2008.

MARINGONI, C. **Técnicas em fitobacteriologia.** Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2010. 70 p.

MARQUES, L. L. R. **Avaliação de marcadores moleculares para o estudo da diversidade de bacterias *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão.** 2000. 157 f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2000.

MEIER, U. et al. **The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants—history and publications.** Journal für Kulturpflanzen, v. 61, n. 2, p. 41-52, 2009.

MONOGRAPH, B. **Growth stages of mono-and dicotyledonous plants.** Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, 2001.

PEREIRA, R. D. C. **Ocorrência, identificação e caracterização das espécies de *Xanthomonas*, causadoras de mancha bacteriana em tomate para mesa no Brasil.** 2011. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2011.

PETHYBRIDGE, S. J.; NELSON, S. C. **Leaf Doctor: A new portable application for quantifying plant disease severity.** Plant Disease, v. 99, n. 10, p. 1310-1316, 2015.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. **Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate.** Letters in applied microbiology, v. 8, n. 4, p. 151-156, 1989.

PROHORT. Programa Brasileiro de Modernização do Mercado Hortigranjeiro. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017. Disponível em: <<http://www.dw.prohort.conab.gov.br>>. Acesso em: Outubro 2017.

SIDRA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - LSPA. IBGE, Outubro 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br>>.

DUVAL, A. M. Q. **Diversidade de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil.** 2003. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

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, v. 22, n. 1, p. 80-86, 2004.

QUEZADO-DUVAL, A. M. et al. **Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central-west Brazil.** Plant disease, v. 88, n. 2, p. 157-161, 2004.

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

SANTOS, M. C.; BRITO JUNIOR, J. D. S.; MOLENA, L. A. Hortifruti Brasil Edição Especial - Anuário 2016- 2017, Piracicaba, v. Ano 15, p. 14-17, Janeiro 2017.

SHANER, G.; FINNEY, R. **The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat**. Phytopathology, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

SILVA JR, T. A. F.da. ***Pseudomonas cichorii* em tomateiro: ocorrência no Estado de São Paulo, gama de hospedeiras e reação de genótipos**. 2007. 60 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias, Botucatu, 2007.

SOUZA, M. F. M. D. et al. **Resistance to *Xanthomonas* spp. in tomato: diallel analysis and gene effects estimative in a breeding programme carried out in Brazil**. Journal of phytopathology, v. 156, n. 11-12, p. 660-667, 2008.

TAMAMURA, T.; SATO, K. **Comparative studies on in vitro activities of kasugamycin and clinically-used aminoglycoside antibiotics**. The Japanese journal of antibiotics, v. 52, n. 1, p. 57-67, 1999.

VALE, F. X. R. D.; LOPES, C. A.; ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia**. 2.^a Edição. ed. Lavras: Editora Universitária de Lavras, 2013. 275-325 p.

WIERZBICKI, Robert. **Identificação de raças de *Xanthomonas* spp. patogênicas a pimentão no estado de São Paulo**. 2003. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.