



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

DETECÇÃO DE *Xanthomonas* spp. ASSOCIADAS A PLANTAS DANINHAS EM CAMPOS DE PRODUÇÃO DE HORTALIÇAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Leandro Victor Silva dos Santos

Recife-PE

2017

LEANDRO VICTOR SILVA DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE *Xanthomonas* spp. ASSOCIADAS A PLANTAS DANINHAS EM
CAMPOS DE PRODUÇÃO DE HORTALIÇAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dra. Elineide Barbosa de Souza

Coorientadora: Prof. Dra. Kátia Cilene da Silva Felix

Coorientadora: Prof. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano

RECIFE-PE

2017

**DETECÇÃO DE *Xanthomonas* spp. ASSOCIADAS A PLANTAS DANINHAS EM
CAMPOS DE PRODUÇÃO DE HORTALIÇAS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO**

LEANDRO VICTOR SILVA DOS SANTOS

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 23/02/2016.

ORIENTADORA:

Prof. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr. Júlio Carlos Polimeni de Mesquita (IPA)

Profa. Dra. Sônia Maria Alves de Oliveira (UFRPE)

**RECIFE - PE
FEVEREIRO - 2017**

*A Deus, por todas as oportunidades até aqui concedidas,
A minha mãe, Lourdes Maria, pelo amor, apoio e incentivo, por toda
dedicação em todos esses anos e por sempre fazer de mim uma
pessoa melhor.*

DEDICO

*A minha querida avó, por todo amor e incentivo durante todos esses anos,
A minha mãe e irmã de criação, por todo amor, apoio e incentivo*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em sua infinita bondade sempre me deu forças para nunca desistir e ficar desamparado.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio institucional, e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

A minha orientadora, Prof^ª. Dra. Elineide Barbosa de Souza, pelo incentivo, orientação e por todo ensinamento e confiança no desenvolver desse trabalho.

As minhas coorientadoras, Prof^ª. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano e Prof^ª. Kátia Cilene da Silva Felix, por todas as contribuições e sugestões e por serem fonte de inspiração.

A Dra. Edilaine Alves de Melo por toda ajuda incondicional, pela preciosa amizade e pelo seu brilhantismo como pessoa e profissional.

Ao Dr. Adriano Marcio Freire Silva, pelas valiosas contribuições e ensinamentos.

A minha mãe, Lourdes Maria, por todo o amor incondicional, dedicação e pelo incentivo nos momentos em que não me sentia capaz.

Ao meu pai e todos os familiares que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica.

A Adelson Joaquim, pelo companheirismo, por todo carinho e por proporcionar momentos felizes e fazer de mim uma pessoa melhor.

A todos os amigos do Laboratório de Fitobacteriologia: Claudeana, Joelma, Jéssica, Pedro, Dulce, Alessandra, Walkíria, Greecy, Elias, Carla e Leandro Velez por tornarem os dias de trabalho muito agradáveis.

A Iwanne Coelho, Kledson, Moara, Josi, Érica, Rodrigo e Exray, amigos valiosos da vida acadêmica.

As grandes amigas/irmãs da vida: Jéssika Amorim, Natasha Marques, Paloma Alencar e Evellyn Almeida, por sempre estarem comigo nos momentos mais importantes da minha vida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia que contribuíram para minha formação.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	1
SUMÁRIO	2
RESUMO GERAL	4
GENERAL ABSTRACT.....	5
Capítulo I.....	6
DETECÇÃO DE <i>Xanthomonas</i> spp. ASSOCIADAS A PLANTAS DANINHAS EM CAMPOS DE PRODUÇÃO DE HORTALIÇAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO	7
INTRODUÇÃO GERAL	7
Mancha bacteriana em tomateiro e pimentão e características de <i>Xanthomonas</i> spp.	7
Podridão negra em brássicas e características de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	11
Sobrevivência de bactérias fitopatogênicas do gênero <i>Xanthomonas</i> associadas ao filoplano de plantas daninhas	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
Capítulo II.....	28
Espécies de <i>Xanthomonas</i> do complexo causador da mancha bacteriana em solanáceas e <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> detectadas em plantas daninhas em cultivos de hortaliças no estado de Pernambuco, Brasil	28
Resumo	30
Abstract	30
Introdução	31
Material e Métodos	33
Coleta das plantas daninhas e isolamento de <i>Xanthomonas</i> spp.	33
Identificação bioquímica dos isolados ao nível de gênero.....	33
Extração do DNA.....	33
Identificação molecular dos isolados ao nível de gênero através do gene <i>gumD</i>	34
Sequenciamento dos genes <i>gyrB</i> e <i>rpoD</i> e análise filogenética.....	34
Identificação de espécies de <i>Xanthomonas</i> do complexo causador da mancha bacteriana em solanáceas por PCR.....	35
Identificação de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> com <i>primers</i> específicos .	36
Caracterização quanto à patogenicidade a diferentes hospedeiros	36
Hidrólise do amido e utilização de pectato	38

Resultados	38
Coleta da plantas daninhas e isolamento de <i>Xanthomonas</i> spp.	38
Identificação bioquímica e molecular (gene <i>gumD</i>) dos isolados ao nível de gênero	39
Sequenciamento dos genes <i>gyrB</i> e <i>rpoD</i> e análise filogenética.....	39
Identificação de espécies de <i>Xanthomonas</i> do complexo causador de mancha bacteriana e <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> por PCR	39
Caracterização quanto à patogenicidade a diferentes hospedeiros	39
Hidrólise do amido e utilização de pectato	40
Discussão	40
Agradecimentos	43
Referências	43
Conclusões gerais	57

RESUMO GERAL

O gênero *Xanthomonas* de bactérias fitopatogênicas inclui diversas espécies que colonizam uma ampla gama de hospedeiros, sendo responsáveis por perdas significativas em culturas de interesse comercial. Entre estas espécies encontram-se as bactérias do complexo causador da mancha bacteriana das solanáceas (*Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*) e a espécie *X. campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das brássicas. Devido infectarem uma vasta gama de hospedeiros, essas bactérias podem sobreviver nas plantas daninhas que crescem entre as linhas de cultivo. Portanto, este trabalho teve como objetivo detectar espécies de *Xanthomonas* em plantas daninhas em campos de hortaliças no estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil. Colônias bacterianas típicas do gênero *Xanthomonas* foram isoladas das plantas daninhas *Aeollanthus suaveolens* (CRM3), *Amaranthus lividus* (CRM11 e CRM16), *Althernanthera philoxeroides* (CRM42), *Sida glomerata* (CRM53) e *Emilia fosbergii* (CRM60), encontradas entre linhas de plantios de solanáceas e brássicas. A análise filogenética do gene *gyrB* juntamente com a utilização da PCR com *primers* específicos, possibilitou a identificação dos isolados como *Xanthomonas euvesicatoria* (CRM11, CRM16, CRM42, CRM53 e CRM 60) e *X. campestris* pv. *campestris* (CRM3). Os isolados de *X. euvesicatoria* mostraram-se patogênicos a plantas e frutos de tomateiro e pimentão, sendo CRM42 e CRM53 capazes de induzir podridão mole nos frutos. Os isolados CRM42, CRM53 e CRM60 degradaram pectato em menos de dois dias, o que caracteriza uma forte atividade pectinolítica. Além disso, os cinco isolados de *X. euvesicatoria* também apresentaram forte atividade amilolítica. O isolado CRM3 de *X. campestris* pv. *campestris* foi patogênico a todas as espécies de brássicas testadas (repolho, couve-comum, couve-flor e brócolis). Esse estudo demonstra a importância de plantas daninhas como hospedeiros alternativos e fontes de inóculo das bactérias *X. euvesicatoria* e *X. campestris* pv. *campestris*, sendo o primeiro relato destas plantas como hospedeiros dessas espécies de *Xanthomonas*.

Palavras-chave: mancha bacteriana, podridão negra, hospedeiros alternativos, identificação.

GENERAL ABSTRACT

Species of plant pathogenic bacteria in *Xanthomonas* genus can infect a large host range and cause significant losses in commercial crops. Among these species are the bacterial complex which causes bacterial leaf spot in solanaceous (*Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* and *X. gardneri*) and *X. campestris* pv. *campestris*, causal agent of brassica black rot. Due to its vast host range these bacteria can survive in weeds which grow between rows of alternative crops in the absence of the main crop. Therefore, this work had as objective to detect *Xanthomonas* species in weeds found in fields of vegetables in the state of Pernambuco, Northeastern region of Brazil. Bacterial colonies typical of the genus *Xanthomonas* were isolated from the weeds *Aeollanthus suaveolens* (CRM3), *Amaranthus lividus* (CRM11), *A. lividus* (CRM16), *Althernanthera philoxeroides* (CRM42), *Sida glomerata* (CRM53) and *Emilia fosbergii* (CRM60), growing naturally in solanaceous and brassica plantations. The phylogenetic analysis of the *gyrB* gene together with the PCR using specific primers allowed the identification of isolates as *Xanthomonas euvesicatoria* (CRM11, CRM16, CRM42, CRM53 and CRM 60) and *X. campestris* pv. *campestris* (CRM3). The isolates of *X. euvesicatoria* showed to be pathogenic to plants and fruits of tomato and pepper, being CRM42 and CRM53 able to induce soft rot in the fruits. The isolates CRM42, CRM53 and CRM60 degraded pectate in less than two days, which characterizes a strong pectinolytic activity. In addition, the five isolates of *X. euvesicatoria* also showed strong amyolytic activity. The isolate CRM3 of *X. campestris* pv. *campestris* was pathogenic for all species of brassica vegetables tested (cabbage, cauliflower, kale and broccoli). This study demonstrates the importance of weeds as alternative hosts and inoculum sources for *X. euvesicatoria* and *X. campestris* pv. *campestris* and is also the first report of these weeds as hosts of these *Xanthomonas* species.

Key-words: bacterial leaf spot, black rot, alternative hosts, identification.

Capítulo I
Introdução Geral

DETECÇÃO DE *Xanthomonas* spp. ASSOCIADAS A PLANTAS DANINHAS EM CAMPOS DE PRODUÇÃO DE HORTALIÇAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

INTRODUÇÃO GERAL

1. Mancha bacteriana em tomateiro e pimentão e características de *Xanthomonas* spp.

A mancha bacteriana foi primeiramente observada em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) na África do Sul em 1914 e posteriormente descrita como “tomato canker” (cancro bacteriano) em 1920 por Ethel Doidge, que observou uma fraca atividade amilolítica dos organismos patogênicos associados à doença e nomeou a bactéria como *Bacterium vesicatoria* Doidge (JONES; STALL, 1998; BOUZAR et al., 1994). Ao mesmo tempo foi descrita uma doença similar nos Estados Unidos, que foi denominada como “bacterial spot” ou mancha bacteriana e seu agente causal apresentava forte atividade amilolítica, sendo nomeado como *Bacterium exitiosum* Gardner & Kendrick (GARDNER; KENDRICK, 1921). Na mesma época, Sherbakoff descreveu esta doença em pimentão (SHERBAKOFF, 1918). Posteriormente, as duas bactérias, *B. vesicatoria* e *B. exitiosum*, foram classificadas como *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson e depois como *X. campestris* pv. *vesicatoria* Dye (YOUNG et al., 1978). Baseado na homologia de DNA Vauterin et al. (1995) separou *X. campestris* pv. *vesicatoria* em duas espécies: *X. vesicatoria* (Doidge) Vauterin et al. e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* Vauterin et al.

Pseudomonas gardneri Sutic foi primeiramente descrita na Iugoslávia, como um patógeno causando mancha bacteriana em tomateiro (SUTIC, 1957), mas foi posteriormente reclassificada como *X. gardneri* Sutic (DE LEY, 1978). Em 2004, Jones et al. propuseram a reclassificação de todas essas bactérias causadoras de mancha em quatro espécies, baseando-se em testes com 13 fontes de carbono e hibridização DNA-DNA (JONES et al., 2004). Essa reclassificação também foi sustentada por Potnis et al. (2011), após comparação do genoma completo das espécies e validação pelo Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (BULL et al., 2010). Assim, as quatro espécies são conhecidas como *X. euvesicatoria* Jones et al., *X. vesicatoria* (Doidge) Vauterin, *X. perforans* Jones et al. E *X. gardneri* (Sutic) Jones et al., constituindo o

complexo causador da mancha bacteriana do tomateiro e do pimentão. Dentre todas, *X. euvesicatoria* e *X. vesicatoria* causam doença em pimentão e tomateiro, enquanto *X. perforans* e *X. gardneri* são conhecidas por infectarem apenas tomateiro. No entanto, recentemente, *X. perforans* foi isolada de plantas de pimentão (POTNIS et al., 2015).

Xanthomonas vesicatoria e *X. perforans* são caracterizadas por apresentarem forte atividade pectinolítica e amilolítica, já *X. euvesicatoria* e *X. gardneri* não possuem tal atividade, com alguns isolados de *X. euvesicatoria* podendo induzir fraca atividade pectinolítica (BOUZAR et al., 1994; EPPO, 2013; JONES, et al., 2000, 2004). Outro aspecto diferenciador é que *X. euvesicatoria* possui uma única proteína de 32 kDa, enquanto que as outras bactérias do complexo possuem uma proteína de 27 kDa (BOUZAR et al., 1994; JONES et al., 2004). Além disso, há diferenças na utilização da fonte de carbono entre as espécies do complexo da mancha bacteriana (JONES et al., 2004; STOYANOVA et al., 2014; VAUTERIN et al., 1995).

No Brasil, a mancha bacteriana é uma das doenças mais importantes do tomateiro para processamento industrial, independente do estágio da cultura, com ocorrência frequente em áreas irrigadas (BARBOSA, 1997). As perdas provocadas pela doença são resultantes da redução da produção e do custo dos produtos químicos utilizados no seu controle (GOODE; SASSER, 1980; MARINGONI; KIMATI, 1987; QUEZADO-SOARES; LOPES, 1999). Reduções da produção de até 52% foram obtidas em condições experimentais de campo (QUEZADO-SOARES et al., 1998). De acordo com Costa et al. (2012), Pereira et al. (2011), Quezado-Duval et al. (2005) e Quezado-Duval e Lopes (2010), no Brasil há relatos da ocorrência das quatro espécies de *Xanthomonas* em tomateiro, porém em pimentão ainda não está muito esclarecido.

As bactérias desse complexo são descritas como baciliformes (0,7-1,0 x 2,0-2,4 µm), Gram negativas, aeróbias e móveis através de um flagelo polar (Jones, 1997). Possuem ainda as características marcantes de formar colônias amarelas em meio nutriente ágar e de produzir o pigmento xantomonadina (BRADBURY, 1993; STALL, 1993).

Para detecção molecular de *Xanthomonas* spp. em sementes de tomateiro e pimentão, são utilizados os iniciadores RST2/RST3 com amplificação de uma banda de DNA de 840 pb e os iniciadores RST9/RST10 com amplificação de uma banda de DNA de 355 pb (LEITE Jr. et al., 1995). Posteriormente, foram desenvolvidos os iniciadores BSX1 e BSX2, eficazes em detectar *X. gardneri* patogênica ao tomateiro, com

amplificação de uma banda de DNA de 579 pb (CUPPELS; LOUWS; AINSWORTH, 2006). Entretanto, os iniciadores foram ineficazes na detecção de *X. perforans*. Os iniciadores Xeu 2.4 e Xeu 2.5 foram utilizados para detectar *X. euvesicatoria* em plantas de tomateiro e pimentão, com amplificação de fragmento de DNA contendo 208 pb (MORETTI; AMATULLI; BUONAURO, 2009). A análise do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) baseada na sequência gênica do gene *RpoB* (subunidade β da RNA polimerase) (FERREIRA-TONIN et al., 2012), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) (HAMZA et al., 2012) e análise de sequência multilocus (ALMEIDA et al., 2010, KEBEDE et al., 2014, TIMILSINA et al., 2015) foram utilizados para diferenciar as quatro espécies do complexo. Além disso, isolados de cada espécie podem ser caracterizados quanto a raças, de acordo com a capacidade de causar ou não reação de hipersensibilidade em variedades diferenciais de tomateiro e pimentão (STALL; JONES; MINSAVAGE, 2009). Quanto às raças, as espécies são classificadas como: grupo A, raça T1 (*X. euvesicatoria*); grupo B, raça T2 (*X. vesicatoria*); grupo C, raças T3, T4 e T5 (*X. perforans*); e grupo D, raça T2 (*X. gardneri*).

Em trabalho desenvolvido por Koenraadt et al. (2009), quatro iniciadores moleculares foram criados para a diferenciação e detecção das quatro espécies de *Xanthomonas* patogênicas a tomateiro e pimentão. Para *X. euvesicatoria* os iniciadores específicos BS-XeF e BS-XeR, com amplificação esperada de um fragmento de DNA de 173 pb; para *X. vesicatoria*, os iniciadores BS-XvF e BS-XvR com fragmentos de 138 pb; para *X. gardneri*, os iniciadores BS-XgF e BS-XgR com fragmentos de 154 pb; e para *X. perforans*, os iniciadores BS-XpF e BS-XpR com fragmento de 197 pb. Esses primers podem ser utilizados em uma reação de PCR convencional ou PCR-multiplex.

Quanto aos sintomas, a mancha bacteriana atinge toda a parte aérea da planta, comprometendo a produtividade da cultura devido à redução da área foliar fotossintetizante, queda de flores em formação e perda do valor comercial dos frutos (JONES et al. 1991; QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010). Nas folhas, os primeiros sintomas aparecem como pequenas áreas encharcadas com formato irregular. Posteriormente, formam-se lesões necróticas maiores com aspecto seco, podendo apresentar halos amarelados. Em ataques severos, as lesões podem coalescer e provocar amarelecimento e morte das folhas. Normalmente, esses sintomas são primeiramente observados nas folhas baixas. A queda das folhas expõe os frutos à radiação solar,

ocasionando escaldadura dos mesmos. Nas peças florais, usualmente o ataque resulta em sérios declínios de frutificação. Em frutos, aparecem manchas levemente elevadas, primeiramente esbranquiçadas e posteriormente de coloração marrom escura, que evoluem entre 2 a 10 mm de diâmetro, com centro deprimido (KUROZAWA; PAVAN, 2005; QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

A doença é caracterizada como de grande importância em plantações de tomateiro com temperaturas entre 20°C e 30°C (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2005). Essa amplitude térmica à doença, aparentemente, deve-se à adaptabilidade dos seus diferentes agentes causais a temperaturas divergentes (ARAÚJO; FERREIRA; QUEZADO-DUVAL, 2013).

Para o manejo da doença é recomendado o uso de sementes saudáveis, rotação de culturas com outras espécies por um período de dois a três anos, instalação da cultura apenas em locais não propensos a cerração ou orvalho em épocas com temperaturas de 25°C a 28°C, plantio em ambiente protegido durante as épocas mais quentes e chuvosas do ano, controle químico baseado na pulverização periódica com fungicidas a base de cobre, uso de cultivares de pimentão resistentes (KUROZAWA; PAVAN, 2005). No mercado brasileiro existem pimentões híbridos com genes específicos de resistência a algumas raças do agente causal da mancha bacteriana, como por exemplo: Impacto, Commandant e Dahra RX (SAKATA, 2016; SEMINIS, 2016; SYNGENTA, 2016). Atualmente, no Brasil, para o controle químico da mancha bacteriana em tomateiro e pimentão há registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento apenas dos princípios ativos hidróxido de cobre e sulfato de cobre (AGROFIT, 2016).

As bactérias sobrevivem em sementes, consideradas importante fonte de disseminação da bactéria a longas distâncias (GOODE; SASSER, 1980), em plantas voluntárias de tomateiro (tigueras) e hospedeiros alternativos, que parecem exercer papel importante na epidemiologia da doença, servindo como fonte de inóculo para possíveis epidemias em lavouras brasileiras (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

Alguns estudos evidenciam a sobrevivência dos agentes causais da mancha bacteriana em plantas daninhas, inclusive no Brasil (ARAÚJO et al., 2015; JONES et al., 1986; KARAVINA et al., 2011; PEREIRA; COSTA; QUEZADO-DUVAL, 2009), porém nenhum deles foi realizado em áreas produtoras de tomateiro e pimentão no estado de Pernambuco.

2. Podridão negra em brássicas e características de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

A podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson, foi descrita pela primeira vez por Garman em 1890, como uma doença de repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) em Lexington, Kentucky-USA (ALVAREZ, 2000). Russel, ainda nessa mesma década, chegou à conclusão de que essa bactéria era a responsável por destruir campos de repolho ao sudeste de Wiscosin, USA (WILLIAMS, 1980). Em 1895, Pammel comprovou a natureza parasitária da doença, chamando a bactéria de *Bacillus campestris* Pammel, que estava causando doença em couve-nabo e nabo no estado de Iowa, USA (VICENTE; HOLUB, 2013).

Posteriormente, Vauterin et al. (1995) com base na hibridização de DNA-DNA propôs que as espécies de *X. campestris* ficassem restritas a *X. campestris* pv. *campestris* e outras cinco patovares que causam doenças em brássicas (pvs. *aberrans* (Knösel) Dye, *armoraciae* (McCulloch) Dye, *barbareae* (Burkholder) Dye, *incanae* (Kendrick & Baker) Dye, e *raphani* (White) Dye. Além de *X. campestris* pv. *campestris*, apenas *X. campestris* pv. *aberrans* (Knösel) Dye também pode causar podridão negra em brássicas. Alguns autores têm questionado a classificação de *X. campestris* pv. *aberrans* com base em testes de patogenicidade e análise da sequência multilocus (MLSA), sugerindo que seja reclassificada como pv. *campestris* (FARGIER; MANCEAU, 2007; FARGIER; SAUX; MANCEAU, 2011). Isolados de *X. campestris* pv. *campestris* também podem ser classificados em raças com base em sua interação diferencial com cultivares de brássicas, já tendo sido verificadas nove raças para a bactéria (VICENTE et al., 2001).

Em todas as regiões do mundo onde se cultivam brassicáceas (ALVAREZ; CHO, 1978; JENSEN et al., 2010; MASSOMO et al., 2003; MIRIK et al., 2008; POPOVIĆ et al., 2013; SCHAAD; THAVEECHAI, 1983) a podridão negra vem sendo relatada, nas mais variadas condições, durante todos os períodos de cultivo. Normalmente a maior intensidade de doença ocorre em regiões onde predomina clima quente e úmido, nas regiões tropicais, subtropicais e continentais úmidas, pois temperaturas e umidades elevadas, no ar e no solo, favorecem a doença (CARRIJO; RÊGO, 2000; FILGUEIRA, 2008). Em climas frios a doença também ocorre, porém raramente evolui a ponto de destruir toda a planta (WILLIAMS, 2007).

A doença ocorre praticamente em todas as brássicas cultivadas, como brócolis (*Brassica oleraceae* L. var. *italica* Plenk.), couve-comum (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC), couve-flor (*Brassica oleraceae* L. var. *botrytis* L.), repolho (*B. oleracea* L. var. *capitata* L.) e outras brássicas silvestres, como mastruço (*Lepidium virginicum* L.) e rabanete-de-cavalo (*Raphanus raphanistrum* L.) (CARRIJO; RÊGO, 2000). Devido às lesões nas folhas, que reduzem o valor comercial do produto, a podridão negra é uma doença bastante destrutiva, sendo considerado fator limitante à produção (LEMA et al., 2012). É mais importante em couve comum e repolho, pois afeta as folhas que é a parte comercializada (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997).

No Brasil, a distribuição da podridão negra é generalizada, sendo amplamente encontrada em todas as regiões produtoras, pelo fato da bactéria ser transmitida por sementes e mudas (RODRIGUES-NETO; MALAVOLTA-JR., 1995). No estado de Pernambuco, foi detectada uma incidência de 77,60% para podridão negra em repolho, no município de Camocim de São Félix, principal produtor de brássicas (AZEVEDO; MICHEREFF; MARIANO, 2002) e a prevalência da doença no estado foi de 88,9% em cultivos de couve-flor (PERUCH; MICHEREFF; ARAÚJO, 2006). Estudo recente realizado com 159 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* obtidos de brócolis, couve-comum, couve-flor e repolho dos principais municípios produtores no estado de Pernambuco, localizados nas mesorregiões do Agreste (Bom Jardim, Bezerros, Camocim de São Félix, Saloá e Sairé) e da Mata (Chã Grande), indicaram a importância da doença para o Estado e revelaram a alta diversidade genética na população. Isolados de *X. campestris* pv. *aberrans* não foram detectados (MELO, 2016).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* é uma bactéria Gram-negativa, com formato de bastonete possuindo apenas um flagelo polar para mobilidade. Cresce em meios de cultura de rotina como ágar nutritivo e ágar nutritivo-extrato de levedura-dextrose, apresentando colônias amareladas, mucóides e convexas, com diâmetro de 1 a 2 mm em até 4h (SCHAAD; THAVEECHAI, 2001). A coloração amarela é devido à produção do pigmento xantomonadina. É aeróbica e não utiliza asparagina como fonte de carbono e nitrogênio. Não apresenta crescimento em 0,1% de cloreto detrifeniltetrazólio e 2-5% de NaCl. Hidroliza o amido e liquefaz moderadamente a gelatina (MARIANO et al., 2001). Essa bactéria sobrevive em uma ampla faixa de temperatura de 5-36°C, sendo a temperatura ideal de desenvolvimento de aproximadamente 28°C (CARRIJO; RÊGO, 2000). A identificação molecular ao nível

de patovar pode ser realizada utilizando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* específicos 2f/2r (LEU et al., 2010).

Os sintomas da podridão negra ocorrem em qualquer estágio fenológico da planta. Em sementeiras, é observada murcha e queima de uma ou de ambas as folhas cotiledonares, geralmente iniciando-se nas margens, progredindo para o interior das mesmas, que se tornam secas e caem. No campo, as folhas apresentam a lesão em forma de "V" invertido, com o vértice voltado para o centro do limbo. Com o progresso da doença, a lesão avança para a nervura principal e torna-se marrom-clara, e a folha seca devido à colonização da bactéria que obstrui o xilema e restringe o fluxo de água. No repolho, a cabeça pode apresentar-se coberta por lesões necróticas. O patógeno torna-se sistêmico invadindo as nervuras secundárias e a nervura principal da folha, que enegrecem progressivamente, enquanto a bactéria atinge o caule e a raiz (MARINGONI, 2005). O escurecimento dos tecidos vasculares da origem ao nome comum da doença “podridão negra” (BILA et al., 2012). Plantas de repolho jovens em estágio vegetativo expressam melhor os sintomas da doença do que plantas em floração. Temperaturas baixas contribuem para infecções latentes, onde a bactéria persiste no sistema vascular do xilema sem produzir sintomas (SILVA, 2015).

O sintoma característico da doença em "V" invertido é resultado da penetração da bactéria na planta, que ocorre principalmente por meio dos hidatódios, aberturas naturais localizadas nas margens das folhas (MARINGONI, 2005). Por essas estruturas a água no estado líquido é eliminada, acumulando-se na forma de gotas nas bordas das folhas. Esse fenômeno chamado “gutação”, normalmente ocorre no início da manhã, quando o solo está úmido e a transpiração reduzida (HUANG, 1986; HUGOUVIEUX; BARBER; DANIELS, 1998). Gotas contaminadas com a bactéria podem ser reabsorvidas pela folha, levando consigo a bactéria em suspensão para cavidade dos hidatódios e para dentro do sistema vascular (BRETSCHEIDER; GONELLA; ROBENSON, 1989; HUGOUVIEUX et al., 1998). O patógeno também pode penetrar pelos estômatos e ferimentos (ALVAREZ, 2000; GUDESBLAT; TORRES; VOJNOV, 2009; LUGO et al., 2013; SHELTON; HUNTER, 1985). Danos mecânicos provocados por insetos, tratos culturais, granizo ou geadas favorecem a penetração da bactéria na planta (CARRIJO; RÊGO, 2000).

Atualmente não existe um método de controle eficiente da podridão negra, assim a melhor forma de controle da doença é a prevenção, uma vez que instalada no campo o

controle se torna difícil por se tratar de uma doença sistêmica (GHAZALIBIGLAR, 2014). O uso de sementes livres de *X. campestris* pv. *campestris* é uma prática indispensável no controle da podridão negra (MARINGONI, 2005; MELO, 2016; WILLIAMS, 1980). O tratamento de sementes de brássicas através de métodos físicos (termoterapia) e produtos químicos (antibióticos e cúpricos) pode ser empregado na erradicação da bactéria, no entanto, nenhum tratamento é totalmente eficaz (FILGUEIRA, 2008; MARINGONI, 2005; VICENTE; HOLUB, 2013).

O controle da podridão negra é realizado através de diversas práticas, que incluem rotação de culturas, remoção de restos de cultura, eliminação de plantas daninhas (GRIESBACH; LOPTIEN; MIERSCH, 2003; VICENTE; HOLUB, 2013), cultivo longe de lavouras antigas, plantio em condições de cultivo protegido, adoção de sistema de irrigação que não promova o molhamento foliar (HALFELD-VIEIRA; NECHET; ARAÚJO, 2010), não fazer plantios seguidos com brássicas na mesma área (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997), utilização de cultivares precoces e o uso de cultivares resistentes (CARRIJO; RÊGO, 2000). De acordo com algumas empresas que comercializam sementes no país, alguns cultivares/híbridos apresentam bons níveis de resistência a *X. campestris* pv. *campestris* tais como: esmeralda, fênix, fuyutoyo, green valley, klabish (repolho), hanabi, ramoso Brasília (brócolis) e HT 116, juliana, sarah, sharon, verediana (couve-flor) (HORTEC, 2016; ISLA, 2016; SAKATA, 2016; SYNGENTA, 2016).

Para um eficiente controle da podridão negra é fundamental conhecer a ecologia do patógeno, determinando os mecanismos de sobrevivência e disseminação. *X. campestris* pv. *campestris* sobrevive na semente, interna ou externamente (CARRIJO; RÊGO, 2000), sendo importantes agente de disseminação e fontes de inóculo para epidemias, mesmo que a taxa de infecção seja baixa (ROBERTS et al., 1999; KRAUTHAUSEN; LAUN; WOHANKA, 2011) Além disso, a bactéria sobrevive em restos culturais incorporados no solo por até dois anos, entretanto, não é capaz de sobreviver mais do que seis meses na superfície do solo, podendo servir como fonte de inóculo secundário (BILA et al., 2012). A disseminação no campo ocorre principalmente através de água de irrigação e chuvas, podendo também acontecer por meio de ferramentas, equipamentos, trabalhadores, transplante e insetos (CARRIJO; RÊGO, 2000).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* também sobrevive em plantas daninhas (SCHAAD; DIANESE, 1981). No entanto, inexistem estudos no Brasil que identifiquem plantas daninhas como hospedeiro desse importante fitopatógeno, fato que ressalta a importância deste trabalho.

3. Sobrevivência de bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* associadas ao filoplano de plantas daninhas

Planta daninha é qualquer vegetal que cresce onde não é desejado. Dentro dessa definição ampla também deve ser enquadrada como tal as plantas que persistem no campo com a cultura sucessora, também chamadas de tiguera (LORENZI, 2014).

A presença de plantas daninhas em cultivos agrícolas representa sérios problemas pelos múltiplos prejuízos que ocasionam, quer dificultando ou onerando os tratamentos culturais, quer determinando perdas na produção pela concorrência por água, luz, nutrientes ou espaço físico (KARAM et al., 2010; SILVA; FERREIRA; FERREIRA, 2006). Outro efeito deletério das plantas daninhas na produtividade de cultivos está associado à ação indireta, quando essas plantas hospedam pragas e micro-organismos patogênicos às culturas (MILEO et al., 2006).

Quando ocupam extensas áreas, as plantas daninhas tornam-se potenciais fontes de inóculo de fitopatógenos (nematóides, fungos, bactérias e vírus) em cultivos comerciais, com desempenho fundamental na epidemiologia das doenças como hospedeiros secundários (CARVALHO, 2013; CHAVES et al., 2003).

Dentro do seu ciclo de vida, as fitobactérias têm seu sítio de sobrevivência dependente de sua interação e condições com o ambiente e hospedeiro (MARCUSO, 2009). As bactérias fitopatogênicas podem sobreviver entre as estações de cultivo no solo como células livres ou associadas ao tecido de plantas mortas (HABTE; ALEXANDER, 1977; LEBEN, 1981). Porém, diante da dificuldade que muitas delas possuem de sobreviver no solo, algumas são capazes de sobreviver como residente e epifítica na superfície das plantas hospedeiras, constituindo-se como uma fonte de inóculo potencial na ausência da doença (ROMEIRO, 2011; SCHUSTER; COYNE, 1974). Além da sobrevivência na superfície de plantas hospedeiras, as fitobactérias também podem sobreviver em plantas não hospedeiras e plantas daninhas (ROMEIRO, 2011).

A identificação dos nichos de sobrevivência dos fitopatógenos representa uma relevante contribuição no sentido de conhecer o funcionamento de agroecossistemas. Este conhecimento é de suma importância para o estabelecimento de práticas adequadas de manejo, visando ao controle de fitopatógenos (VALARINI; SPADOTTO, 1995). Bactérias do gênero *Xanthomonas* são especificamente conhecidas pela capacidade de sobreviver como residentes ou epifíticas, na superfície de plantas hospedeiras e também de plantas daninhas (SWINGS; CIVEROLO, 1993). Nessa fase, as bactérias multiplicam-se na superfície de plantas saudáveis sem causar infecção, fazendo uso de pequenas quantidades de nutrientes secretados na superfície das plantas (GOTO, 1990; ROMEIRO, 2011).

Vários estudos relataram a sobrevivência de espécies de *Xanthomonas* em uma variedade de plantas daninhas, tendo diferentes órgãos da planta como nichos ecológicos. Capim colônia (*Panicum maximum* Jacq) e capim amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Fedde) encontradas em beiras de estradas, constituem-se em potenciais fontes de inóculo para a população epifítica de *X. axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al., agente causal do cancro cítrico (KIMURA, 1981). População epifítica de *X. axonopodis* pv. *allii* Roumagnac foi encontrada sobrevivendo em alfafa (*Medicago sativa* L.), lentilha (*Lens culinaris* Medik) e soja (*Glycine max* L.), e mesmo quando em rotação com feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) sobrevivia epifiticamente junto com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Kersters & Swing (GENT; LANG; SCHWARTZ, 2005).

Ram; Ramesh e Kishum (1994) relataram a presença de *X. campestris* pv. *mangiferae indicae* em 50% das principais plantas daninhas encontradas em pomares de manga (*Mangifera indica* L.) na Índia. Isolados de outros patógenos de *X. campestris* já foram relatados em plantas daninhas, como *X. campestris* pv. *vitians* (Brown) Dye, a qual foi detectada sobrevivendo nas principais plantas daninhas encontradas em campos de produção de uva na Califórnia/EUA (ROBINSON; JONES; PERNEZNY, 2006). Em *Ensete* spp., uma planta daninha nativa das regiões tropicais da África pertencente à família Musaceae, foi detectada a bactéria *X. campestris* pv. *musacearum* Yirgou and Bradbury (MARTINS, 2016). Peixoto et al. (2007), investigando possíveis hospedeiros alternativos de *X. campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, com o intuito de fornecer subsídios para o manejo da doença em videira, obtiveram isolados da bactéria das plantas daninhas *Alternanthera tenella* Colla, *Amaranthus* sp., *Glycine* sp. e *Senna*

obtusifolia (L.) H.S. Irwin & Barneby, que apresentavam sintomas, as quais foram coletadas em parreirais de Juazeiro e Petrolina, no Submédio do Vale do São Francisco.

A sobrevivência epifítica de *X. vesicatoria* foi avaliada em plantas daninhas coletadas em campos de produção de tomate e em campos de tomateiro em pousio com histórico da mancha bacteriana na Flórida. A bactéria foi detectada nas daninhas *Ambrosia artemisiifolia* L., *Eclipta alba* (L.) L., *Trifolium repens* L., *Eupatorium capillifolium* (Lam.) Small e nas solanáceas infestantes *Solanum americanum* Mill. e *Physalis pubescens* L. A detecção de populações de *X. vesicatoria* foi considerada muito baixa, apenas 11 de 203 amostras de plantas daninhas continha a bactéria, sugerindo que as plantas daninhas não foram importantes para epidemiologia da mancha bacteriana (JONES et al., 1986). Segundo Bradbury (1993), uma espécie de planta daninha chamada de *Nicandra physaloides* (L.) Gaertn, também conhecida como joá de capote, foi relatada como hospedeiro natural de *X. vesicatoria*, enquanto a planta daninha joá-bravo (*S. symsimbriifolium* Lam.), se mostrou hospedeiro por inoculação artificial. *Solanum nigrum* L., *Datura* spp., *Physalis* spp. também são citadas como hospedeiros dessa bactéria (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Espécies de *Xanthomonas* causadoras de mancha bacteriana foram obtidas de folhas da planta maria-pretinha (*Solanum nigrum* L.= *S. americanum* Mill.) que apresentavam lesões necróticas, em lavouras nos estados de Goiás e São Paulo (PEREIRA et al., 2009). Em folhas de oito espécies de plantas daninhas, encontradas dentro e nas bordaduras de um campo de feijão infectado com crestamento bacteriano comum foram encontradas populações epífitas de *X. vesicatoria* em folhas de *Oxalis latifolia* Kunth, *Cyperus rotundus* L., *Amarathus hybridus* L. e *Bidens pilosa* L. (KARAVINA et al., 2011). Associadas a plantas daninhas sintomáticas em lavouras de tomateiro, Araújo et al. (2015) obtiveram isolados de *X. perforans* das espécies *N. physaloides* e *S. americanum*, e *X. gardneri* de *Euphorbia heterophylla* L.

Com relação à sobrevivência de *X. campestris* pv. *campestris* em plantas daninhas e hospedeiros alternativos, poucos relatos foram encontrados na literatura. Estudos realizados por Schaad e Dianese (1981) avaliaram o potencial das plantas daninhas da família Brassicaceae como fonte de inóculo de *X. campestris* pv. *campestris* na Geórgia e Califórnia. O patógeno foi detectado infectando *Brassica campestris* L., *Lepidium virginicum* L., *Coronopus didymus* (L.) S., *Raphanus sativus* L., *B. geniculata* (L.) Lagr.-Foss, *B. niger* L. e *Cardaria pubescens* L. A presença de *X.*

campestris pv. *campestris* na superfície das folhas e em raízes de *L. virginicum* coletadas em diferentes áreas também foram avaliadas pelos autores. A bactéria pôde ser detectada nas folhas, no entanto, não foi encontrada nas raízes. Essa bactéria também foi encontrada em associação com *Centella asiatica* (L.) Urban em Bangalore, Índia (KISHUN; CHAND, 1988). Através de inoculação artificial foi testada a capacidade de sobrevivência de *X. campestris* pv. *campestris* em 26 espécies de plantas daninhas comuns em campos agrícolas do Brasil. Destas, apenas *L. virginicum* e *R. raphanistrum* apresentaram elevado potencial para sobrevivência epifítica da bactéria (SILVA et al., 2017).

Em virtude da importância econômica das culturas das solanáceas e das brássicas para o estado de Pernambuco, estudos sobre sobrevivência e detecção de *Xanthomonas* spp. em plantas daninhas é de fundamental importância para a adoção de estratégias adequadas ao manejo da doença nas regiões de cultivo no estado e no Brasil. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar espécies de *Xanthomonas* associadas a plantas daninhas em campos de produção de hortaliças no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2016 Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 12 jan. 2017.

ALMEIDA, N. F.; YAN, S.; CAI, R.; CLARKE, C. R.; MORRIS, C. E.; SCHAAD, N. W.; SCHUENZEL, E. L.; LACY, G. H.; SUN, X.; JONES, J. B.; CASTILLO, J. A.; BULL, C. T.; LEMAN, S.; GUTTMAN, D. S.; SETUBAL, J. C.; VINATZER, B. A. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 3, p. 208-215, 2010.

ALVAREZ, A. M. Black rot of crucifers. In: SLUSARENKO, A.; FRASSER R. S. S.; VAN LOON, L. C (Ed.). **Mechanisms of resistance of plant diseases**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. cap.1, p. 21-52.

ALVAREZ, A. M.; CHO, J. J. Black rot of cabbage in Hawaii: inoculum source and disease incidence. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, n. 10, p. 1456-1459, 1978.

ARAÚJO, E. R.; COSTA, J. R.; PONTES, N. C.; QUEZADO-DUVAL, A. M. *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* associated with bacterial leaf spot on weeds in Brazilian tomato fields. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 143, p. 543-548, 2015.

ARAÚJO, E. R.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL, A.M. Specific primers for *Xanthomonas vesicatoria*, a tomato bacterial spot causal agente. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 137, p. 5-9. 2013.

AZEVÊDO, S.S.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R. Levantamento da intensidade da podridão negra e da alternariose do repolho no Agreste de Pernambuco e determinação do tamanho das amostras para quantificação dessas doenças. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, p.299-306. 2002.

BARBOSA, V. The processing tomato growing system under tropical and subtropical conditions – the Brazilian experience. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE PROCESSING TOMATO, n. 1., 1996, Recife. **Anais...** Recife: IPA/ASHS, 1997. p. 94-97.

BILA, J.; MONDJANA, A. M.; MORTENSEN, C. N.; LUND, O. S. **Podridão negra de repolho em Moçambique**: estratégias para o manejo sustentável da doença. Copenhaga: DSHC, 2012. 9 p.

BOUZAR, H.; JONES, J. B.; MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E.; SCOTT, J. W. Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 1, p. 39-44. 1994

BRADBURY, J. F. **Guide of plant pathogenic bacteria**. Slough: C.A.B. International, 1993. 332 p.

BRETSCHNEIDER, K. E.; GONELLA, M. P.; ROBESON, D. J. A comparative light and electron microscopical study of compatible and incompatible interactions between *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and cabbage (*Brassica oleracea*). **Physiological and molecular plant pathology**, Londres, v. 34, n. 4, p. 285-297, 1989.

BULL, C.T.; DE BOER, S.H.; DENNY, T.P.; FIRRAO, G.; FISCHER-LE SAUX, M.; SADDLER, G.S.; SCORTICINI, M.; STEAD, D.E.; TAKIKAWA, Y. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 92, p. 551-592, 2010.

CARRIJO, I. V.; RÊGO, A. M. Doenças das brássicas. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. p. 335-371.

CARVALHO, L. B. **Plantas daninhas**. 1 ed. Santa Catarina: editado pelo autor. 2013. v. 1, p. 6-7.

CHAVES, A. L. R.; BRAUN, M. R.; EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; GALLETI, S. R. *Erigon bonariensis*: hospedeira alternativa do *Lettuce mosaic* vírus no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 307-311, 2003.

COSTA, J. R.; ARAÚJO, E. R.; BECKER, W. F.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, p. 149-154, 2012.

CUPPELS, D. A.; LOUWS, F. J.; AINSWORTH, T. Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. **Plant disease**, Saint Paul, v. 90, n. 4, p. 451-458, 2006.

DE LEY, J. Modern molecular methods in bacterial taxonomy: evaluation, application, prospects. In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 1978, Angers. **Proceedings...** France: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 1978. p. 347-357.

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

EPPO -.European and mediterranean plant protection organization. *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*), causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. **EPPO Bulletin**, France, v. 43, n. 1, p. 7-20, 2013.

FARGIER, E.; MANCEAU, C. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. **Plant Pathology**, Chichester, v. 56, n. 5, p. 805-818, 2007.

FARGIER, E.; SAUX, M. F.; MANCEAU, C. A. Multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart v. 34, p. 156-165, 2011.

FERREIRA-TONIN, M.; RODRIGUES-NETO, J.; HARAKAVA, R.; DESTÉFANO, S. A. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial *rpoB* gene sequences and species differentiation by PCR-RFLP. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, p. 1419-1424, 2012.

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

GARDNER, M.W.; KENDRICK, J.B. Bacterial spot of tomato. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 21, p.123-156, 1921.

GENT, D. H.; LANG, J. M.; SCHWARTZ, H. F. Epiphytic Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on Leguminous Hosts and Onion. **Plant Disease**, Saint Paul, v.89, n.5, p.558-564, 2005.

GHAZALIBIGLAR, H. **Discovery of a Paenibacillus isolate for biocontrol of black rot in brassicas**. 2014, 164 f. Tese (Doctor of Philosophy) - Lincoln University, New Zealand, 2014.

GOODE, M. J.; SASSER, M. Prevention - the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, p. 831-834, 1980.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic, 1990. 342 p.

- GRIESBACH, E.; LOPTIEN, H.; MIERSCH, U. Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson in cabbage *Brassica oleracea* L. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 110, n. 5, p. 461-475, 2003.
- GUDESBLAT, G. E.; TORRES, P. S.; VOJNOV, A. A. Stomata and pathogens: warfare at the gates. **Plant signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 4, n. 12, p. 1114-1116, 2009.
- HABTE, M.; ALEXANDER, M. Further evidence for the regulation of bacterial populations in soil by protozoa. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 113, n. 3, p. 181-183, 1977.
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; ARAÚJO, S. L. F. **Principais doenças em cultivos de pequenas propriedades do entorno de Boa Vista**. Roraima: Embrapa, 2010. 31 p. (Documentos 36).
- HAMZA, A. A.; ROBENE-SOUSTRADE, I.; JOUEN, E.; LEFEUVRE, P.; CHIROLEU, F.; FISHER-LE SAUX, M.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Multilocus sequence analysis-and amplified fragment length polymorphism-based characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 35, n. 3, p. 183-190, 2012.
- HORTEC. **Produtos**. Bragança Paulista, 2016. Disponível em: <<http://www.hortec.com.br/es/produtos>>. Acesso em: 08 jan. 2017.
- HUANG, J. S. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, n. 1, p. 141-157, 1986.
- HUGOUVIEUX, V.; BARBER, C. E.; DANIELS, M. J. Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. **Molecular plant-microbe interactions**, Saint Paul, v. 11, n. 6, p. 537-543, 1998.
- ISLA. **Produtos**: hortaliças. Porto Alegre, 2016. Disponível em: <https://isla.com.br/cgibin/busca.cgi?title=Hortali%E7as&id_grupo=1>. Acesso em: 08 jan. 2017.
- JENSEN, B. D.; VICENTE, J. G.; MANANDHAR, H. K.; ROBERTS, S. J. Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields in Nepal. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 3, p. 298-305, 2010.
- JONES, J.B.; LACY, G.H.; BOUZAR, H.; STALL, R.E.; SCHAAD, N.W. Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p.755-762, 2004.
- JONES, J. B. Bacterial spot. In: JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. (Ed.). **Compendium of tomato diseases**. 1. ed. Saint Paul: America Phytopathological Society Press, 1997. p. 73.
- JONES, J. B.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; ALMIRA, E. C.; ROBERTS, P. D.; BOWEN, B.W.; SUDBERRY, J.; STRICKLER, P. M.; CHUN, J. Systematic analysis

- of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 50, p. 1211-1219, 2000.
- JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of tomato diseases**. Saint Paul: APS Press, 1991. 73 p.
- JONES, J. B.; POHRONEZNY, K. L.; STALL, R. E.; JONES, J. P. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 4, p. 430-434, 1986.
- JONES, J.B.; STALL, R.E. Diversity among xanthomonads pathogenics on pepper and tomato. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto v. 36, p. 41-58, 1998.
- KARAM, D.; MELHORANÇA, A. L.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, J. A. A. **Cultivo do milho**: Plantas daninhas. Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção, versão eletrônica, 6° ed. 2010. Disponível em:
<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/plantasdaninhas.htm>. Acesso em: 18 jan. 2017.
- KARAVINA, C; MANDUMBU, R.; PARWADA, C.; ZIVENGE, E. Epiphytic Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (E. F. SM). **Journal of Animal and Plant Sciences**, Nairobi, v. 9, n. 2, p. 1161-1168, 2011.
- KEBEDE, M.; TIMILSINA, S.; AYALEW, A.; ADMASSU, B.; POTNIS, N.; MINSAVAGE, G. V.; GOSS, E. M.; HONG, J. C.; STRAYER, A.; PARET, M.; JONES, J. B.; VALLAD, G. E. Molecular characterization of *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot of tomato in Ethiopia. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 140, n. 4, p. 677-688, 2014.
- KIMURA, O. Importância das populações “residentes” de fitobactérias na epidemiologia de enfermidades bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 310-311, 1981.
- KISHUN, R.; CHAND, R. Epiphytic survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on *Centella asiatica* (L.) Urban. **International Journal of Tropical Plant Diseases**, Jodhpur, v. 6, n. 2, p. 189-193, 1988.
- KOENRAADT, H.; VAN BETTERAY, B.; GERMAIN, R.; HIDDINK, G.; JONES, J. B.; OOSTERHOF, J.; RIJLAARSDAM, A.; ROORDA, P.; WOULDY, B. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 808, p. 99-102, 2009.
- KRAUTHAUSEN, H. J.; LAUN, N.; WOHANKA, W. Methods to reduce the spread of the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, in brassica transplants. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 118, n. 1, p. 7, 2011.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds), **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas, 4 ed. São Paulo. Editora Ceres. p. 607-626, 2005.
- LEBEN, C. How plant-pathogenic bacteria survive. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 65, n. 8, p. 633-637, 1981.

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

LEMA, M.; CARTEA, M. E.; SOTELO, T.; VELASCO, P., SOENGAS, P. Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by Brassica spp. genotypes and rep-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, p. 159-169, 2012.

LEU, Y. S.; DENG, W. L.; YANG, W. S.; WU, Y. F.; CHENG, A. S.; HSU, S. T.; TZENG, K. C. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *X. campestris* pv. *raphani*. **Plant Pathology Bulletin**, Chichester, v. 19, p. 137-147, 2010.

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

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

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 7 ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2014. 283 p.

LUGO, A. J.; ELIBOX, W.; JONES, J. B.; RAMSUBHAG, A. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* affecting crucifers in Trinidad. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 136, n. 1, p. 61-70, 2013.

MARCUZZO, L. L. Aspectos epidemiológicos de sobrevivência e de ambiente no gênero *Xanthomonas*. **Ágora: Revista de Divulgação Científica**, Mafra, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2009.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; OLIVEIRA, I. S.; NASCIMENTO, A. R. P. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: Imprensa Universitária UFRPE, 2001. 368 p.

MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 285-291.

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

MARTINS, O. M. **Murcha bacteriana da banana, causada por *Xanthomonas*: sérios prejuízos à bananicultura na África**. 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355163/1994598/fold07-10_murchaBacteriana.pdf/b25b4236-3b9d-4879-9d27-2807ef37d81f>. Acesso em: 20 jan. 2017.

MASSOMO, S. M. S.; HANNE, N.; ROBERT B. MABAGALA.; KELD M. G.; JOHN, H.; CARMEN, N. M. Identification and characterisation of *Xanthomonas*

campestris pv. *campestris* strains from Tanzania by pathogenicity tests, biolog, rep-PCR and fatty acid methyl ester analysis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 8, p. 775-789, 2003.

MELO, E. A. **Estrutura de população e caracterização filogenética de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco**. 2016, 82 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

MILEO, L. J.; BENTES, J. L. S.; SILVA, J. F.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Plantas de cobertura de solo como hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola*. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 677-683, 2006.

MIRIK, M.; SELCUK, F.; AYSAN, Y.; SAHIN, F. First outbreak of bacterial black rot on cabbage, broccoli, and brussels sprouts caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the Mediterranean Region of Turkey. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 1, p. 176-176, 2008.

MORETTI, C.; AMATULLI, M. T.; BUONAURIO, R. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 466-471, 2009.

PEIXOTO, A.R.; MARIANO, R.L.R.; MOREIRA, J.O.T.; VIANA, I.O. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 161-164, 2007.

PEREIRA, M. V.; COSTA, J. R.; QUEZADO-DUVAL, A. M. *Xanthomonas* sp. infectando maria-pretinha em lavoura de tomate industrial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE TOMATE INDUSTRIAL, 3.; SEMINÁRIO NACIONAL DE TOMATE DE MESA, 1.; 2009, Goiânia. **Anais...** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. Trabalho 68 1/1, p. 68, CD-ROM.

PEREIRA, R. C.; ARAÚJO, E. R.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Occurrence of *Xanthomonas* species causing bacterial spot in fresh market tomato fields in Brazil. In: III International Symposium on Tomato Diseases, n. 914, 2011, Italy. **Proceedings...** Ischia: Acta Horticulturae, 2011. p. 61-64.

PERUCH, L. A. M.; MICHEREFF, S. J.; ARAÚJO, I. B. Levantamento da intensidade da alternariose e podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 464-469, 2006.

POPOVIĆ, T.; BALAZŽ, J.; STAROVIĆ, M.; TRKULJA, N.; IVANOVIĆ, Ž.; IGNJATOV, M.; JOŠIĆ, D. First report of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* as the causal agent of black rot on oilseed rape (*Brassica napus*) in Serbia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 3, p. 418-418, 2013.

POTNIS, N.; KRASILEVA, K.; CHOW, V.; ALMEIDA, N. F.; PATIL, P.B.; RYAN, R.P.; SHARLACH, M.; BEHLAU, F.; DOW, J.M.; MOMOL, M.T.; WHITE, F.F.; PRESTON, J.F.; VINATZER, B.A.; KOEBNIK, R.; SETUBAL, J.C.; NORMAN, D.J.; STASKAWICZ, B.J.; JONES, J.B. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. **BMC Genomics**, London, v. 12, 146 p, 2011.

POTNIS, N.; TIMILSINA, S.; STRAYER, A.; SHANTHARAJ, D.; BARAK, J. D.; PARET, M. L.; VALLAD, G. E.; JONES, J. B. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 907-920, 2015.

QUEZADO-DUVAL A.M.; LOPES, C.A. **Mancha bacteriana**: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. Brasília: EMBRAPA. 2010. 24p. (Circular Técnica 84).

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

QUEZADO-SOARES, A. M.; LOPES, C. A. Controle químico da mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n. 1, p. 21, 1999. Resumo.

QUEZADO-SOARES, A. M.; SILVA, V. L.; GIORDANO, L. B.; LOPES, C. A. Redução na produtividade de tomateiro para processamento industrial devida à mancha-bacteriana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 38., 1998, Petrolina. **Resumo...** Petrolina: SOB, 1998. p. 266.

RAM, K.; RAMESH, C.; KISHUM, R. Epiphytic survival of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* on weeds and its role in MBCD. **Plant Disease Research**, Punjab, v. 9, p. 35-40, 1994.

ROBERTS, S. J.; HILTUNEN, L. H.; HUNTER, P. J.; BROUGH, J. Transmission from seed to seedling and secondary spread of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica transplants: effects of dose and watering regime. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 9, p. 879-889, 1999.

ROBINSON, P. E. J.; JONES, B.; PERNEZNY, K. Bacterial Leaf Spot of Lettuce: Relationship of Temperature to Infection and Potential Host Range of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 4, p. 465-470, 2006.

RODRIGUES- NETO, J.; MALAVOLTA JR., V. A. Doenças causadas por bactérias em crucíferas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 183, p. 56-59, 1995.

ROMEIRO, S. R. Sobrevivência de bactérias fitopatogênicas e suas implicações. In: _____. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2011. cap. 12, p. 257-292.

SAKATA. **Pimentão Dahra RX**. Bragança Paulista: Sakata Seed Sudamerica. 2016. Disponível em <<http://www.sakata.com.br/produtos/hortalicas/solanaceas/pimentao>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

SAKATA. **Produtos**: hortalças, São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.sakata.com.br/#>>. Acesso em: 08 jan. 2017.

SCHAAD, N. W. DIANESE, J. C. Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 11, p. 1215-1220, 1981.

- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; LACY, G. H. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: APS Press, 2001. p. 175-200.
- SCHAAD, N. W.; THAVEECHAI, N. Black rot of crucifers in Thailand. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 11, p. 1231-1234, 1983.
- SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, n. 1, p. 199-221, 1974.
- SEMINIS. **Impacto**. St. Louis: Seminis Grow Forward. 2016. Disponível em, <http://www.seminis.com/global/br/products/Pages/Impacto.aspx>> Acesso em: 17 jan. 2017.
- SHELTON, A. M.; HUNTER, J. E. Evaluation of the potential of the flea beetle *Phyllotreta cruciferae* to transmit *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, causal agent of black rot of crucifers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, New York, v. 7, n. 3, p. 308-310, 1985.
- SHERBAKOFF, C. D. Report of the associate plant pathologist. **Florida Agriculture Experiment Station Report**, 1916-1917:66R-86R, 1918.
- SILVA, A. C.; FERREIRA, F. A; FERREIRA, L. R. Manejo integrado de plantas daninhas em hortaliças. **Pesquisa & Tecnologia**, São Paulo, v. 3, n. 2, 2006.
- SILVA, J. C. **Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no solo, no filoplano e na rizosfera de plantas daninhas**. 2015, 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2015.
- SILVA, J. C.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; SOMAN, J. M.; TOMASIN, T. D.; SARTORI, M. P.; MARINGONI, A. C. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in the phyllosphere and rizosphere of weeds. **Plant Pathology**, Dordrecht, Online, 2017. Doi: 10/1111/ppa.12682.
- STALL, R. E. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: cause of bacterial spot of tomato and pepper. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Ed.). *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993. cap. 1.10, p. 57-60.
- STALL, R. E.; JONES, J. B.; MINSAVAGE, G. V. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p.265-284. 2009.
- STOYANOVA, M.; VANCHEVA, T.; MONCHEVA, P.; BOGATZEVSKA, N. Differentiation of *Xanthomonas* spp. causing bacterial spot in Bulgaria based on biolog system. **International Journal of Microbiology**, Stuttgart, v. 2014, 2014, 7 p.
- SUTIC, D. Bakterioze crvenog patlidzana (tomato bacteriosis). **Review of Applied Mycology**, Kew, v. 36, n. 6, p. 734-735, 1957.
- SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Ed.). *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993. 399 p.
- SYNGENTA. **Pimentão híbrido Commandant**. São Paulo: Syngenta do Brasil, 2016. Disponível em: <<http://www.syngenta.com/country/br/pt/produtosemarcas/sementes/vegetais/Pages/pimentao-hibrido-commandant.aspx>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

SYNGENTA. **Produtos e soluções**: sementes. São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www3.syngenta.com/country/br/pt/produtosemarcas/sementes/vegetais/Pages/home.aspx>>. Acesso em: 08 jan. 2017.

TIMILSINA, S.; JIBRIN, M. O.; POTNIS, N.; MINSAVAGE, G. V.; KEBEDE, M.; SCHWARTZ, A.; BART, R.; STASKAWICZ, B.; BOYER, C.; VALLAD, G. E.; PRUVOST, O.; JONES, J. B.; GOSS, E. M. Multilocus sequence analysis of xanthomonads causing bacterial spot of tomato and pepper plants reveals strains generated by recombination among species and recent global spread of *Xanthomonas gardneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 81, n. 4, p. 1520-1529, 2015.

VALARINI, P. J.; SPADOTTO, C. A. Identificação de nichos de sobrevivência de fitopatógenos em áreas irrigadas de Guaíra, SP. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 30, n. 10, p. 1239-1243, 1995.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 45, p.472-489, 1995.

VICENTE, J. G.; CONWAY, J.; ROBERTS, S. J.; TAYLOR, J. D. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 5, p. 492-499, 2001.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to Brassica crops. **Molecular plant pathology**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 2-18, 2013.

WILLIAMS, P. H. Black rot. In: RIMMER, S.R.; SHATTUCK, V.I.; BUCHWALDT, L. (Ed.). **Compendium of brassica diseases**. Saint Paul: APS Press, 2007. p. 60-62.

WILLIAMS, P. H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, p. 736-742, 1980.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington v. 21, n. 1, p. 153-177, 1978.

Capítulo II

***Xanthomonas euvesicatoria* e *X. campestris* pv. *campestris*
associadas a plantas daninhas em cultivos de hortaliças no
estado de Pernambuco, Brasil**

1 *Xanthomonas euvesicatoria* e *X. campestris* pv. *campestris* associadas a plantas
2 daninhas em cultivos de hortaliças no estado de Pernambuco, Brasil

3
4 **Leandro Victor Silva dos Santos • Edilaine Alves de Melo; Adriano Márcio Freire**
5 **Silva; Kátia Cilene da Silva Felix; Alice Maria Quezado-Duval; Rosa de Lima**
6 **Ramos Mariano; Elineide Barbosa de Souza**

7
8 Accepted: / Published online:

9
10 L. V. S. Santos • E. A. Melo • A. M. F. Silva • K. C. S. Felix • R. L. R. Mariano

11 Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE,
12 Brasil.

13 A. M. Quezado-Duval

14 Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, Brasil.

15 E. B. Souza (✉)

16 Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE,
17 Brasil.

18 Email: elineidebs@yahoo.com.br

19
20
21
22
23
24
25

26 **Resumo**

27

28 O gênero *Xanthomonas* compreende bactérias que infectam um vasto número de
29 espécies de plantas de importância agrícola e podem sobreviver em plantas daninhas. O
30 objetivo desse estudo foi detectar espécies de *Xanthomonas* em plantas daninhas em
31 campos de hortaliças no estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil. Colônias
32 bacterianas típicas do gênero *Xanthomonas* foram isoladas das plantas daninhas
33 *Aeollanthus suaveolens* (CRM3), *Amaranthus lividus* (CRM11 e CRM16),
34 *Althernanthera philoxeroides* (CRM42), *Sida glomerata* (CRM53) e *Emilia fosbergii*
35 (CRM60), encontradas entre linhas de plantios de solanáceas e brássicas. A análise
36 filogenética do gene *gyrB* juntamente com a utilização da PCR com *primers* específicos,
37 possibilitou a identificação dos isolados como *Xanthomonas euvesicatoria* (CRM11,
38 CRM16, CRM42, CRM53 e CRM 60) e *X. campestris* pv. *campestris* (CRM3). Os
39 isolados de *X. euvesicatoria* mostraram-se patogênicos a plantas e frutos de tomateiro e
40 pimentão, sendo CRM42 e CRM53 capazes de induzir podridão mole nos frutos. Os
41 isolados CRM42, CRM53 e CRM60 degradaram pectato em menos de dois dias, o que
42 caracteriza uma forte atividade pectinolítica. Além disso, os cinco isolados de *X.*
43 *euvesicatoria* também apresentaram forte atividade amilolítica. O isolado CRM3 de *X.*
44 *campestris* pv. *campestris* foi patogênico a todas as espécies de brássicas testadas
45 (repolho, couve-comum, couve-flor e brócolis). Esse estudo demonstra a importância de
46 plantas daninhas como hospedeiros alternativos e fontes de inóculo das bactérias *X.*
47 *euvesicatoria* e *X. campestris* pv. *campestris*, sendo o primeiro relato destas plantas
48 daninhas como hospedeiros dessas espécies de *Xanthomonas*.

49

50 **Palavras-chave:** fitobacterioses, hospedeiros alternativos, identificação, fonte de
51 inóculo, manejo.

52

53 **Abstract**

54

55 The genus *Xanthomonas* includes bacteria that infects a large number of plant crops and
56 can survive in weeds. The aim of this study was to detect *Xanthomonas* species in
57 weeds found in fields of vegetables in the state of Pernambuco, Northeastern region of
58 Brazil. Bacterial colonies typical of the genus *Xanthomonas* were isolated from the

59 weeds *Aeollanthus suaveolens* (CRM3), *Amaranthus lividus* (CRM11), *A. lividus*
60 (CRM16), *Althernanthera philoxeroides* (CRM42), *Sida glomerata* (CRM53) and
61 *Emilia fosbergii* (CRM60), growing naturally in solanaceous and brassica plantations.
62 The phylogenetic analysis of the *gyrB* gene together with the PCR using specific
63 primers allowed the identification of isolates as *Xanthomonas euvesicatoria* (CRM11,
64 CRM16, CRM42, CRM53 and CRM 60) and *X. campestris* pv. *campestris* (CRM3).
65 The isolates of *X. euvesicatoria* showed to be pathogenic to plants and fruits of tomato
66 and pepper, being CRM42 and CRM53 able to induce soft rot in the fruits. The isolates
67 CRM42, CRM53 and CRM60 degraded pectate in less than two days, which
68 characterizes a strong pectinolítica activity. In addition, the five isolates of *X.*
69 *euvesicatoria* also showed strong amyolytic activity. The isolate CRM3 of *X.*
70 *campestris* pv. *campestris* was pathogenic for all species of brassica vegetables tested
71 (cabbage, cauliflower, kale and broccoli). This study demonstrates the importance of
72 weeds as alternative hosts and inoculum sources for *X. euvesicatoria* and *X. campestris*
73 pv. *campestris* and is also the first report of these weeds as hosts of these *Xanthomonas*
74 species.

75

76 **Key-words:** bacterial plant disease, alternative hosts, identification, source of inoculum,
77 management.

78

79 **Introdução**

80

81 A presença de plantas daninhas em cultivos agrícolas representa sérios
82 problemas pelos múltiplos prejuízos que ocasionam, devido as mesmas concorrerem
83 com as plantas cultivadas por fatores de crescimento (Karam et al., 2010; Silva et al.,
84 2006), e também por hospedarem pragas e micro-organismos patogênicos as plantas de
85 interesse comercial (Mileo et al., 2006). Plantas daninhas têm sido consideradas fontes
86 de inóculo e estão associadas à persistência de espécies de *Xanthomonas* em campos de
87 produção (Jones et al. 1986; Ignatov et al. 2007), podendo ter um papel importante na
88 epidemiologia das doenças.

89

90 O gênero *Xanthomonas* compreende um grande grupo de espécies de bactérias
91 fitopatogênicas que afetam uma ampla gama de hospedeiros, incluindo plantas de
considerável importância econômica (Rodriguez-R et al., 2012). Dentro desse gênero

92 encontram-se as espécies do complexo causador da mancha bacteriana e *Xanthomonas*
93 *campestris* pv. *campestris*.

94 *X. vesicatoria* (Doidge) Vauterin, *X. euvesicatoria* Jones et al., *X. perforans*
95 Jones et al. e *X. gardneri* (Sutic) Jones et al. compõem as espécies do complexo
96 causador da mancha bacteriana (Jones et al., 2004) em solanáceas. As quatro espécies
97 têm sido reportadas no Brasil em campos de tomateiro de mesa e industrial (Quezado-
98 Duval et al., 2005; Quezado-Duval et al., 2010; Pereira et al., 2011; Costa et al., 2012).
99 Em tomateiro para indústria em condições experimentais de campo, sob irrigação por
100 aspersão, foi registrada redução de até 52% da produção (Quezado-Soares et al., 1998).
101 De acordo com a European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO,
102 2013) as plantas de tomateiro e pimentão atuam como principais hospedeiros dessas
103 bactérias, mas as plantas daninhas atuam como hospedeiros alternativos, o que viabiliza
104 a permanência do patógeno no campo, mesmo na ausência dos hospedeiros principais.

105 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é o agente causal da podridão negra das
106 crucíferas, uma doença de grande importância para as brássicas, causando perdas que
107 variam de 10 a 50% da produção (Rathaur et al., 2015). A doença afeta um grande
108 número de brássicas, incluindo repolho (*Brassica oleraceae* L. var. *capitata* L.), couve
109 comum (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC), brócolis (*Brassica oleracea* L. var.
110 *italica* Plenk.), couve-flor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.), couve-chinesa
111 (*Brassica chinensis* L.) e couve de bruxelas (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*
112 Zenk.) (Peruch et al., 2006; Singh; Rathaur, Vicente, 2016). A podridão negra ocorre
113 em todas as regiões do Brasil. No estado de Pernambuco, devido às condições
114 climáticas extremamente favoráveis, foi detectada prevalência da doença de 90% em
115 couve-flor e incidência de até 77% em áreas de repolho (Peruch et al., 2006). *X.*
116 *campestris* pv. *campestris* sobrevive nas sementes (Krauthausen et al., 2011) em restos
117 culturais (Bila et al., 2012) e também em plantas daninhas (Schaad & Dianese, 1981).

118 No Brasil poucas são as informações na literatura sobre a importância das
119 plantas daninhas como hospedeiros alternativos de fitobactérias nas áreas de produção
120 de hortaliças. Portanto, o objetivo desse estudo foi detectar espécies de *Xanthomonas*
121 spp. em plantas daninhas em campos de cultivo de hortaliças no estado de Pernambuco,
122 região Nordeste do Brasil.

123

124 **Material e Métodos**

125

126 Coleta das plantas daninhas e isolamento de *Xanthomonas* spp.

127 As coletas das plantas daninhas foram realizadas em áreas de cultivo de
128 hortaliças dos principais municípios produtores no estado de Pernambuco, Nordeste do
129 Brasil, localizados nas mesorregiões do Agreste (Bom Jardim, Bezerros, Camocim de
130 São Félix, Garanhuns, Saloá e Sairé) e Mata (Chã Grande). As coletadas foram
131 realizadas próximas a plantios de solanáceas e brássicas, e de cada planta foram
132 coletadas duas amostras, as quais foram catalogadas e registradas por fotografia. Uma
133 amostra foi utilizada para isolamento e a outra herborizada. A identificação botânica das
134 plantas ocorreu no Laboratório de Taxonomia de Plantas (LATAX) e no Herbário
135 Vasconcelos Sobrinho, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

136 O isolamento de *Xanthomonas* spp. foi realizado a partir dos tecidos
137 sintomáticos e assintomáticos de folhas das plantas daninhas, em meio 523 (Kado &
138 Heskett,1970). As colônias típicas do gênero *Xanthomonas* foram purificadas e
139 preservados pelos métodos de dessecação em papel de filtro e em água destilada
140 esterilizada (ADE) (Souza et al., 2016), sendo mantidas em meio ágar nutritivo-
141 dextrose-levedura (NYDA) (Pusey & Wilson, 1984) para identificação e realização de
142 testes de patogenicidade.

143

144 Identificação bioquímica dos isolados ao nível de gênero

145 O sistema Biolog Gen III (Biolog Inc.), que contém 71 diferentes fontes de
146 carbono e 23 substâncias químicas inibidoras, foi utilizado para identificar os isolados
147 ao nível de gênero, seguindo as recomendações do fabricante. As suspensões
148 bacterianas foram preparadas no fluido de inoculação IF-A, após ajuste da transmitância
149 para 92% em turbidímetro (Biolog Inc.) a partir de culturas cultivadas em meio BUG[®]
150 (Biolog Universal Growth) a 29°C (\pm 0,5°C) por 36 h. Em seguida, 100 μ L das
151 suspensões foram distribuídos por poço nas microplacas, que foram incubadas por 36 h
152 a 33 °C. A presença de crescimento bacteriano nos poços foi determinada pela cor
153 púrpura que indica a redução do cloreto de trifenil tetrazólio (TZC). Os dados obtidos
154 das leituras foram analisados pelo programa Microbiolog 4.20.05.

155

156 Extração do DNA

157 A extração de DNA dos isolados foi realizada com a utilização do Kit Miniprep
158 para extração de DNA genômico bacteriano (Axygen Biosciences, USA), de acordo
159 com as recomendações do fabricante. O DNA genômico foi quantificado por
160 comparação com o marcador High DNA Mass Ladder (Introvigen, Brasil), através da
161 mistura contendo 4 µL de DNA concentrado com 2 µl do tampão 6X DNA Loading
162 Dye (Fermentals Life Sciences, Canadá) e 1,5 µL de SYBER® Safe DNA Gel Stain
163 (10X) (Life Technologies, Brasil). Em seguida, submeteram-se as amostras de DNA à
164 eletroforese (80 V) em gel agarose a 1% por 1,5 h. Posteriormente, o gel foi visualizado
165 em fotodocumentador (Gel Imaging Systems UVP, EUA). Por fim as amostras foram
166 armazenadas a - 20 ° C.

167

168 Identificação molecular dos isolados ao nível de gênero através do gene *gumD*

169 A amplificação por PCR do gene *gumD* foi realizada utilizando os *primers* X-
170 gumD F7 (5'GGCCGCGAGTTCTACATGTTCAA3') e X-gumD R7
171 (5'CACGATGATGCGGATATCCAGCCACAA3'), específicos para determinação de
172 espécies do gênero *Xanthomonas* do grupo II, o qual amplificam o fragmento de DNA
173 de 402 pb (Adriko et al., 2014). As reações foram compostas de tampão 5 X GoTaq
174 flexi (Promega Madison, Wis., USA), 200 µM de cada dNTPs (Promega), 1,25U de
175 GoTaq DNA polimerase (Promega, Madison, Wis.) e 50 ng de DNA. A concentração de
176 MgCl₂ (Promega, Madison, Wis.) foi de 1,5mM para um volume final de 25 µL. As
177 condições da PCR consistiram de 30 ciclos, com desnaturação inicial por 3 min a 95 °C,
178 desnaturação por 20 seg à 95 °C, anelamento por 15 seg à 66 °C e extensão por 15 seg à
179 72 °C, e extensão final por 3 min à 72 °C. As reações foram realizadas em
180 termociclador modelo PTC-100 (MJ Research, Estados Unidos). 3µL de cada amostra
181 (produtos de PCR) foi corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (10X) e submetidos a
182 eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris-borato EDTA) a 50 V / cm
183 durante 45 min. Em seguida, o gel foi visualizado em fotodocumentador, sob luz UV
184 (Gel Imaging Systems UVP, EUA).

185

186 Sequenciamento do gene *gyrB* e análise filogenética

187 A identificação dos isolados também foi realizada por meio do sequenciamento e
188 análise filogenética do gene *gyrB* (DNA gyrase subunit β). A amplificação foi realizada
189 utilizando um volume final de 25µl contendo 1X de PCR Master Mix, 0,4 µM de cada

190 primer e 50 ng de DNA. As reações foram realizadas em 35 ciclos, com desnaturação
191 inicial de 3 min a 94 °C e cada ciclo consistindo de 50 seg a 94 °C para desnaturação.
192 A temperatura de anelamento foi de 60 °C por 50 seg, já a fase de extensão consistiu de
193 1 min a 72 °C. Ao final dos ciclos foi realizada a extensão final por 7 min a 72 °C. As
194 amostras foram amplificadas em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research, Estados
195 Unidos). Controles negativos (reações livres de DNA) foram incluídos para verificar a
196 presença de contaminantes. Alíquota de 3µL de cada amostra foi corada com SYBR®
197 Safe DNA Gel Stain (10X) e submetida à electroforese em gel de agarose a 1% em
198 tampão TBE (Tris-borato EDTA) a 80 V / cm durante 1,0 h. O sequenciamento foi
199 realizado pela Macrogen® (Seul, Coréia do Sul). As montagens dos contigs foram
200 realizadas com auxílio do programa Staden Package (Staden et al., 1998) e o
201 alinhamento das sequências foi realizado com a ferramenta Clustal W, através do
202 software MEGA v.6.0. Através do software MrBayes foi realizada análise de Inferência
203 Bayesiana utilizando-se o modelo de substituição de nucleotídeos TIM3+G,
204 selecionados por meio do critério de informações bayesiano (bayesian information
205 criterion - BIC) com o auxílio do JModel Test 2.1.3. As Sequências do gene *gyrB* das
206 espécies *X. euvesicatoria* (KM555055.1 e KR349548.1), *X. vesicatoria* (EU498980.1 e
207 EU499099.1), *X. perforans* (HQ591287.1 e FJ561686.1), *X. gardneri* (EU499058.1 e
208 EU499178.1) e *X. campestris* pv. *campestris* (KF904860.1 e FJ561648.1) obtidas do
209 GenBank foram incluídas nas análises. A bactéria *Stenotrophomonas* sp. foi utilizada
210 como grupo externo.

211

212 Identificação de espécies de *Xanthomonas* do complexo causador da mancha bacteriana
213 em solonáceas por PCR

214 A identificação molecular das espécies de *Xanthomonas* do complexo
215 causador da mancha bacteriana foi realizada com os *primers*: BS-XeF
216 (CTAGAACTCGGCGTATCG) e BS-XeR (5'- GTCGGACATAGTGGACACATAC)
217 (amplificação de um fragmento de DNA de 173 pb) para *X. euvesicatoria*; e BS-XpR
218 (5'- GTGCAGGTCAATTATCAGAATGTGG) (fragmento de DNA de 197 pb) para *X.*
219 *perforans* (Koenraad et al., 2009). Os volumes finais de PCR variaram de acordo com a
220 combinação de *primer*-DNA das espécies, variando de 46 a 52 µl. Assim, cada reação
221 continha 4,8 µl de tampão 1X; 1,44 µl de MgCl₂ (1,5-1,33 mmol l⁻¹); 3,84 µl de dNTPs
222 (0,2-0,18 mmol l⁻¹ de cada dNTPs); 19,2 µl de uma mistura contendo os quatro pares de

223 primers (2,0-1,77 $\mu\text{mol l}^{-1}$ para todos os primers); 1 μl de DNA *Taq* polimerase (1,26-
224 1,11 U); 13,72 μl de água Milli-Q[®] e alíquotas de 2 μl de DNA molde de cada espécie.
225 As condições da PCR foram: 94 °C por 5 min para desnaturação inicial, seguido de 30
226 ciclos de 94 °C por 30 seg, 66 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão
227 final a 72 °C por 7 min. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose (3,0%)
228 por eletroforese em tampão TBE 0,5X a 100 V durante 2 h e 30 min. Em seguida, o gel
229 foi visualizado em fotodocumentador, sob luz UV (Gel Imaging Systems UVP/EUA).

230

231 Identificação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* com *primers* específicos

232 Para identificar se os isolados de *Xanthomonas* obtidos eram *X. campestris* pv.
233 *campestris*, foi realizada análise de PCR utilizando os *primers* 2f (5'-
234 TGGGTTTTTCGCCTATCAAAC-3') e 2r (5'- TGCAACTATTCCTAGCACCG-3'), o
235 qual amplificam o fragmento de DNA de 200 pb (Leu et al, 2010). As reações foram
236 compostas por 12,5 μL de PCR 1X Master Mix, 0,25 μM de cada *primer* e 100 ng de
237 DNA, para um volume final de 25 μL . As condições da PCR consistiram de 35 ciclos,
238 com desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, cada ciclo com 30 seg a 95 °C, 30 seg a 60
239 °C e 30 seg a 72 °C, e extensão final por 10 min a 72 °C. 3 μl de cada amostra foram
240 corados com SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (10X) e submetida a eletroforese em gel de
241 agarose a 1,0 % por 1 h. O resultado foi visualizado em fotodocumentador, sob luz UV.
242 O marcador GeneRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Canadá) foi
243 utilizado para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados. A eletroforese foi
244 conduzida a 80 V/cm, durante 50 min e as bandas foram visualizadas em
245 fotodocumentador, sob luz UV (Gel Imaging Systems UVP/EUA).

246

247 Caracterização quanto à patogenicidade a diferentes hospedeiros

248 Os testes de patogenicidade dos isolados de *X. euvesicatoria* foram realizados
249 em tomateiro e pimentão. Sementes de tomateiro (hibrido TY 2006) e de pimentão
250 (cultivar Rubia R) foram semeadas em bandejas de poliestireno contendo substrato
251 Basaplant[®]. Após 15 dias, foram transplantadas para vasos plásticos de 500 ml,
252 contendo uma mistura de solo:húmus (3:1 v/v). Para inoculação preparou-se uma
253 suspensão bacteriana em sulfato de magnésio (10 mMol l⁻¹) com concentração ajustada
254 em espectrofotômetro para 10⁸ UFC ml⁻¹. Borrifadores manuais foram utilizados para
255 aspergir a suspensão sobre a área foliar das plantas quando estas apresentavam com

256 quatro folhas verdadeiras. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 24h antes
257 da inoculação e 48h após a inoculação. Passado esse período as plantas permaneceram
258 em condições de casa de vegetação. Uma semana após a inoculação, fez-se a primeira
259 avaliação quanto à presença e ausência de sintomas. O delineamento experimental foi
260 inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por
261 uma planta com quatro folhas.

262 O teste de patogenicidade também foi realizado em frutos de tomateiro e
263 pimentão. Com auxílio de uma almofada de alfinetes entomológicos foram realizados
264 ferimentos de aproximadamente 2,5 mm de profundidade nos frutos previamente
265 lavados com sabão neutro em água corrente. Em seguida, 10 µL de uma suspensão com
266 10^8 UFC mL⁻¹ foi depositada sobre o ferimento. Após inoculação os frutos foram
267 dispostos sobre placas de Petri as quais foram acomodadas dentro de bandejas de
268 plástico e recobertas com sacolas plásticas para formação de câmara úmida. Em
269 seguida, as bandejas foram acomodadas em estufa tipo B.O.D. (Biochemistry Oxygen
270 Demand), sob temperatura de 30°C por 48 h. A avaliação para presença ou ausência de
271 sintomas foi realizada quatro dias após inoculação. O delineamento experimental foi
272 inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada repetição constituída por um
273 fruto com seis pontos de inoculação.

274 Para os testes de patogenicidade do isolado de *X. campestris* pv. *campestris*
275 sementes de couve-comum (cultivar ‘Legacy’), couve-flor (‘Verona’), repolho (‘Astrus
276 plus’) e brócolis (‘Legacy’) foram semeadas e transplantadas da mesmas forma que as
277 solanáceas. Plantas com 30 dias de transplantadas foram inoculadas pela técnica de
278 corte das margens das folhas com pequenas tesouras mergulhadas na suspensão
279 bacteriana em água destilada esterilizada ajustada em espectrofotômetro para 10^8 UFC
280 mL⁻¹. As inoculações foram realizadas em cinco pontos por folha, nas três folhas mais
281 jovem de cada planta, conforme descrito por Vicente et al. (2002). As plantas
282 testemunha foram inoculadas apenas com ADE. Todas as plantas foram mantidas em
283 casa de vegetação com temperatura de 28 ± 2 °C com irrigação diária. O delineamento
284 experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição
285 constituída por uma planta com três folhas, com cinco pontos de inoculação cada.

286 Após observação dos sintomas para os dois patossistemas, foi realizado o
287 reisolamento do patógeno a partir de lesões foliares características de mancha bacteriana

288 e podridão negra em meio NYDA, assim como em frutos lesionados, completando os
289 postulados de Koch's.

290

291 Hidrólise do amido e utilização de pectato

292 A capacidade de hidrolisar amido e pectato foi determinada para os isolados de
293 *X. euvesicatoria*. O crescimento bacteriano foi depositado em quatro pontos sobre o
294 meio ágar nutritivo suplementado com amido a 1% e no meio cristal violeta pectato,
295 respectivamente (Cuppel and Kelman, 1974). A avaliação foi realizada 36 h após. O
296 isolado foi considerado positivo para atividade amilolítica quando se observou a
297 presença de zona clara ao redor do crescimento bacteriano, após inundação das placas
298 com lugol. Uma depressão no meio foi interpretada como uma reação positiva para a
299 degradação do pectato. Foram utilizados controles positivos e negativos.

300

301 **Resultados**

302

303 Coleta das plantas daninhas e isolamento de *Xanthomonas* spp.

304 Setenta e uma amostras de plantas daninhas foram coletadas em áreas de cultivo
305 de hortaliças em seis municípios da mesorregião do Agreste e um município da Mata de
306 Pernambuco, pertencentes às famílias botânicas: Amaranthaceae (n = 13), Asteraceae (n
307 = 17), Boraginaceae (n = 1), Commelinaceae (n = 5), Euphorbiaceae (n= 4), Lamiaceae
308 (n = 1), Malvaceae (n = 2), Phyllantaceae (n = 1), Poaceae (n = 7), Portulacaceae (n =
309 17), Rubiaceae (n = 2) e Turneraceae (n = 1).

310 Culturas bacterianas obtidas a partir de fragmentos foliares de espécies de
311 plantas daninhas em meio 523 mostraram colônias mucoides, arredondadas e com
312 pigmento amarelado, típicas do gênero *Xanthomonas*, para amostras com e sem
313 sintomas. Através da microscopia óptica foram observadas células em forma de
314 bastonetes e Gram negativas. Foram obtidos seis isolados das plantas daninhas
315 *Aeollanthus suaveolens* (CRM3), *Amaranthus lividus* (CRM11 e CRM16),
316 *Althernanthera philoxeroides* (CRM42), *Sida glomerata* (CRM53) e *Emilia fosbergii*
317 (CRM60) (Figuras 1 e 2; Tabela 1), com lesões foliares sendo observadas em quatro
318 espécies (*A. suaveolens*, *A. lividus*, *A. philoxeroides* e *E. fosbergii*). Após a
319 preservação, os isolados foram depositados na Coleção de Culturas Rosa Mariano do

320 Laboratório de Fitobacteriologia e as plantas incluídas na coleção do herbário
321 Vasconcelos Sobrinho, ambos da UFRPE.

322

323 Identificação bioquímica e molecular (gene *gumD*) dos isolados ao nível de gênero

324 O sistema Biolog Gen III identificou os seis isolados como pertencentes ao
325 gênero *Xanthomonas*. Na análise do gene *gumD*, os isolados amplificaram um
326 fragmento de DNA de 402 pb com o par de *primers* X-gumDF7/ X-gumDR7 (Figura 3),
327 confirmando assim que pertencem ao gênero *Xanthomonas* e as espécies do Grupo II
328 desse gênero.

329

330 Sequenciamento do gene *gyrB* e análise filogenética

331 A árvore filogenética obtida por meio de Inferência Bayesiana com a sequência
332 do gene *gyrB* mostrou que os isolados CRM11, CRM16, CRM42, CRM53 e CRM60
333 formaram um grupo consistente com *X. euvesicatoria* isolado BC3710 e *X. perforans*
334 isolado CFBP6864. Com isso pode-se dizer que tais isolados pertencem a uma destas
335 espécies. Já o isolado CRM3 agrupou com *X. campestris* pv. *campestris* (CFBP5241),
336 sendo então considerado membro desta espécie (Figura 4).

337

338 Identificação de espécies de *Xanthomonas* do complexo causador de mancha bacteriana
339 e *X. campestris* pv. *campestris* por PCR

340 Na reação de PCR com os primers BS-XeF/BS-XeR, os isolados CRM11,
341 CRM16, CRM42, CRM53 e CRM60 amplificaram um fragmento de 173 pb específico
342 para *X. euvesicatoria* (Figura 5).

343 O isolado CRM3 amplificou um fragmento de 200 pb quando submetido a
344 reação de PCR com o par de *primers* 2f/2r específico para *X. campestris* pv. *campestris*
345 (Figura 6).

346

347 Caracterização quanto à patogenicidade a diferentes hospedeiros

348 Todos os isolados de *X. euvesicatoria* foram capazes de causar sintomas em
349 plantas e frutos de tomateiro e pimentão (Figura 7). As plantas apresentaram sintomas
350 10 dias após a inoculação, que se caracterizaram como manchas necróticas circundadas
351 por halos cloróticos. Nos frutos inoculados com CRM53 e CRM42 foram observados
352 sintomas de podridão mole três dias após a inoculação.

353 O isolado CRM3, identificado como *X. campestris* pv. *campestris*, mostrou-se
354 patogênico aos diferentes hospedeiros de brássicas (brócolis, couve-flor, couve-folha e
355 repolho) com o início dos sintomas de podridão negra sendo observados cinco dias
356 após a inoculação.

357

358 Hidrólise do amido e utilização de pectato

359 Todos os isolados de *X. euvesicatoria* hidrolisaram o amido e os isolados
360 CRM42, CRM53 e CRM60 apresentaram reação positiva para a degradação do pectato.

361

362 **Discussão**

363

364 Plantas daninhas nas áreas de produção de diversas culturas tornam-se potenciais
365 fontes de inóculo de micro-organismos fitopatogênicos, sendo fundamental na
366 epidemiologia de doenças como hospedeiros secundários (Chaves et al., 2003). Além
367 disso, estudos comprovam que hospedeiros alternativos podem aumentar a
368 agressividade de fitopatógenos no campo (Grönberg et al., 2012).

369 Várias espécies de plantas daninhas já foram descritas como hospedeiros
370 alternativos de *Xantomonas* do complexo causador da mancha bacteriana, dentre elas:
371 *Ambrosia artemisiifolia*, *Eclipta alba*, *Eupatorium capillifolium*, *Physalis pubescens*,
372 *Trifolium repens* (Jones et al., 1986), *Solanum americanum* (Araújo et al., 2015; Jones
373 et al., 1986); *S. nigrum*, *S. symsimbriifolium* (Bradbury, 1993), *Nicandra physaloides*
374 (Araújo et al., 2015; Bradbury, 1993), *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium álbum*,
375 *Datura* spp., *Digitaria sanguinalis*, *Portulaca oleraceae*, *Setaria glauca* (Kurozawa &
376 Pavan, 2005), *Amaranthus hybridus*, *Bidens pilosa*, *Cyperus rotundus*, *Oxalis latifolia*
377 (Karavina et al., 2011) e *Euphorbia heterophylla* (Araújo et al., 2015).

378 No presente estudo foram detectadas as plantas daninhas *A. lividus*, *A.*
379 *philoxeroides*, *E. fosbergii* e *S. glomerata* como hospedeiros alternativos de *X.*
380 *euvesicatoria*. Essas espécies ainda não haviam sido citadas na literatura como
381 hospedeiros de *Xanthomonas* do complexo causador da mancha bacteriana. No Brasil,
382 existe relato de *N. physaloides* e *S. americanum* como hospedeiros de *X. perforans* e *E.*
383 *heterophylla* como hospedeiro de *X. gardneri* (Araujo et al., 2015). Em todas as áreas
384 onde se realizaram as coletas espécies do gênero *Althernanthera* e *Amaranthus* foram
385 comumente as mais encontradas, o que indica que essas plantas daninhas são as que

386 possuem uma maior importância como fonte de inóculo de *X. euvesicatoria*,
387 contribuindo assim, para uma ampla disseminação da doença. No Brasil, a mancha
388 bacteriana é uma das doenças mais importantes do tomateiro para processamento
389 industrial e de mesa, independente do estágio da cultura, com ocorrência frequente em
390 áreas irrigadas (Barbosa, 1997), podendo ser causada por *X. vesicatoria*, *X.*
391 *euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (Quezado-Duval et al., 2005; Quezado-Duval;
392 Lopes, 2010; Pereira et al., 2011; Costa et al., 2012). A descoberta de novas plantas
393 daninhas como hospedeiros de *X. euvesicatoria* é uma grande contribuição para
394 entendimento da epidemiologia da doença.

395 *A. lividus*, *E. fosbergii* e *S. glomerata* apresentavam lesões foliares, indicando
396 que *X. euvesicatoria* foi capaz de infectar essas plantas daninhas em condições naturais
397 de campo, sendo esse fato de grande importância na epidemiologia da doença. Infecções
398 naturais também foram observadas em outras plantas daninhas para espécies de
399 *Xanthomonas* do complexo causador da mancha bacteriana (Araújo et al., 2015).

400 A análise filogenética das sequências do gene *gyrB* mostrou que os isolados
401 CRM11, CRM16, CRM42, CRM53 e CRM60 agruparam com *X. euvesicatoria* e *X.*
402 *perforans*. No entanto, através da análise de PCR os isolados foram todos identificados
403 como *X. euvesicatoria*. Existe controvérsia na classificação da espécie *X. perforans* e
404 segundo Barak et al. (2016), *X. euvesicatoria* e *X. perforans* compõem uma única
405 espécie, pois foi verificada através de genômica comparativa que as mesmas possuem
406 uma similaridade superior a 99%.

407 Todos os isolados de *X. euvesicatoria* foram capazes de causar sintomas em
408 plantas e frutos de tomateiro e pimentão. Segundo Potnis et al. (2015) *X. euvesicatoria* e
409 *X. vesicatoria* causam doença em pimentão e tomateiro, enquanto *X. perforans* e *X.*
410 *gardneri* são conhecidos por infectarem apenas tomateiro. Os isolados CRM42 e
411 CRM53 induziram podridão mole em frutos de tomateiro e pimentão (Figura 7 D e E),
412 tendo sido confirmada a atividade pectinolítica dos isolados no teste *in vitro*. *X.*
413 *euvesicatoria* é reportada até o presente momento como uma bactéria que possui fracas
414 atividades pectinolítica e amilolítica (Jones et al., 2004; EPPO, 2013). Nossos resultados
415 contrariam este fato, já que a utilização de pectato foi detectada nos isolados CRM42,
416 CRM53 e CRM60 em menos de dois dias, o que caracteriza uma forte atividade
417 pectinolítica. Além disso, os cinco isolados de *X. euvesicatoria* também apresentaram

418 forte atividade amilolítica. Este é o primeiro relato de isolados dessa bactéria causando
419 podridão mole e forte atividade pectinolítica e amilolítica.

420 Com relação a *X. campestris* pv. *campestris*, são relacionadas como plantas
421 daninhas hospedeiros naturais: *Brassica campestris*, *B. geniculata*, *B. Níger*, *Cardaria*
422 *pubescens*, *Coronopus didymus*., *Lepidium virginicum*, *Raphanus sativus*, (Schaad &
423 Dianese, 1981) e *Centella asiatica* (Kishun & Chand, 1988). Através de inoculação
424 artificial as espécies *L. virginicum* e *R. raphanistrum* apresentaram elevado potencial
425 para sobrevivência epifítica dessa bactéria (Silva et al., 2017). Nesse estudo, o isolado
426 CRM3 obtido da planta daninha *A. suaveolens*, conhecida como erva macassá, foi
427 identificado através da análise filogenética do gene *gyrB*, assim como, pela utilização de
428 *primers* específicos, como *X. campestris* pv. *campestris*. Esta bactéria apresenta uma
429 ampla gama de hospedeiros, sendo patogênica a diversas espécies botânicas (Zhao et al.,
430 2000; Miguel-Wruck et al., 2010), mas nenhuma das espécies de plantas daninhas dos
431 campos de hortaliças do Nordeste brasileiro tinha sido registrada previamente como
432 hospedeiro dessa bactéria, constituindo, portanto, o primeiro registro de *A. suaveolens*
433 como hospedeiro alternativo de *X. campestris* pv. *campestris*.

434 Em todas as regiões do mundo onde se cultivam brassicáceas (Alvarez; Cho,
435 1978; Jensen et al., 2010; Massomo et al., 2003; Mirik et al., 2008; Popović et al., 2013;
436 Schaad; Thaveechai, 1983) a podridão negra vem sendo relatada, nas mais variadas
437 condições, durante todos os períodos de cultivo. No Brasil, a distribuição da podridão
438 negra é generalizada, sendo amplamente encontrada em todas as regiões produtoras,
439 pelo fato da bactéria ser transmitida por sementes e mudas (Rodrigues-Neto; Malavolta-
440 JR., 1995). Ressaltasse também a capacidade da bactéria sobreviver em plantas
441 daninhas (Schaad; Dianese, 1981), o que foi constatado no presente estudo.

442 O conhecimento sobre a gama de hospedeiros de *X. euvesicatoria* e *X.*
443 *campestris* pv. *campestris* é importante quando se trata do manejo das doenças em
444 relação a infestação dos cultivos por plantas daninhas. Uma das práticas mais eficazes
445 para manejo das doenças causadas por esses patógenos é a rotação de culturas, que tem
446 como princípio eliminar plantas suscetíveis na área de plantio, reduzindo assim a
447 população do patógeno pela ausência de tecidos suscetíveis (Quezado-Duval; Lopes,
448 2010). Eventualmente, a falta de capinas periódicas viabiliza a convivência das plantas
449 daninhas com a cultura principal durante praticamente todo o ciclo da cultura (Miléo et
450 al., 2007).

451 Esse estudo demonstrou a importância de plantas daninhas como hospedeiros
452 alternativos para as bactérias *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* e *X. campestris* pv.
453 *campestris*, durante os cultivos e nos períodos de entressafra de hortaliças (solanáceas e
454 brássicas), uma vez que as mesmas podem servir como fonte de inóculo, contribuindo
455 para a permanência do patógeno nas áreas de produção, além de promover a infecção
456 dos próximos cultivos. Além do mais, este é o primeiro relato de *A. lividus*, *E. fosbergii*
457 e *S. glomerata* como hospedeiros de *X. euvesicatoria*, de *A. philoxerioides* como
458 hospedeiro de *X. gardneri* e de *A. suaveolens* como hospedeiro de *X. campestris* pv.
459 *campestris*.

460

461 **Agradecimentos**

462

463 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela
464 concessão da bolsa de Mestrado a Leandro V. S. Santos e pela bolsa de produtividade
465 das pesquisadoras Elineide B. Souza (Proc. No. 307348/2011-3) e Rosa L. R. Mariano.
466 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio
467 financeiro e bolsa de pesquisa a Kátia C. S. Félix (Proc. No. 23038.003635/2013-60,
468 AUXPE 1585/2013).

469

470 **Referências**

- 471 Adriko, J.; Mbega, E. R., Mortesen, C. N., Wulff, E. G., Tushemereirwe, W. K.,
472 Kubiriba, J., Lund, O. S. (2014). Improved PCR for identification of members of
473 the genus *Xanthomonas*. *European Journal of Plant Pathology*, 138 (2), 293-306.
- 474 Alvarez, A. M., Cho, J. J. (1978). Black rot of cabbage in Hawaii: inoculum source and
475 disease incidence. *Phytopathology*, 68 (10), 1456-1459.
- 476 Araújo, E. R., Costa, J. R., Pontes, N. C., Quezado-Duval, A. M. (2015). *Xanthomonas*
477 *perforans* and *X. gardneri* associated with bacterial leaf spot on weeds in
478 Brazilian tomato fields. *European Journal of Plant Pathology*, 143 (3), 543-548.
- 479 Barak, J. D., Vancheva, T., Lefeuvre, P., Jones, J. B., Timilsina, S., Minsavage, G. V.,
480 Vallad, G. E., Koebrick, R. (2016). Whole-genome sequences of *Xanthomonas*
481 *euvesicatoria* strains clarify taxonomy and reveal a stepwise erosion of type 3
482 effectors. *Frontiers in Plant Science*, 7 (1805), 12 p.

- 483 Barbosa, V. (1997). The processing tomato growing system under tropical and
484 subtropical conditions – the Brazilian experience. In: *International Conference on*
485 *the Processing Tomato*, (1), Recife: IPA/ASHS, 94-97.
- 486 Bila, J., Mondjana, A. M., Mortensen, C. N., Lund, O. S. (2012). *Podridão negra de*
487 *repolho em Moçambique: estratégias para o manejo sustentável da doença*. 9 p.
- 488 Bradbury, J. F (1993). *Guide of plant pathogenic bacteria*. Slough: C.A.B.
489 International, 332 p.
- 490 Chaves, A. L. R., Braun, M. R., Eiras, M., Colariccio, A., Galleti, S. R. (2003). *Erigon*
491 *bonariensis*: hospedeira alternativa do lettuce mosaic vírus no Brasil.
492 *Fitopatologia Brasileira*, 28 (3), 307-311.
- 493 Costa, J. R, Araújo, E. R., Becker, W. F., Ferreira, M. A. S. V., Quezado-Duval, A. M.
494 (2012). Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da
495 mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC. *Tropical Plant*
496 *Pathology*, 37 (2), 149-154.
- 497 Cuppels, D., Kelman, A. (1974). Evaluation of selective media for isolation of soft-rot
498 bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology*, 64, 468-475.
- 499 EPPO - European and mediterranean plant protection organization. (2013).
500 *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*,
501 *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*), causing bacterial spot of
502 tomato and sweet pepper. *EPPO Bulletin*, 43 (1), 7-20.
- 503 Goode, M. J., Sasser, M (1980). Prevention - the key to controlling bacterial spot and
504 bacterial speck of tomato. *Plant Disease*, 64 (9), 831-834.
- 505 Grönberg, L., Andersson, B., Yuen, J (2012). Can weed hosts increase aggressiveness
506 of *Phytophthora infestans* on potato? *Phytopathology*, 12 (4), 429-433.
- 507 Ignatov, A., Sechler, A., Schuenzel, E. L., Agarkova, I., Oliver, B., Vidaver, A. K.,
508 Schaad, N. W (2007). Genetic diversity in populations of *Xanthomonas*
509 *campestris* pv. *campestris* in cruciferous weeds in Central Coastal California.
510 *Phytopathology*, 97 (7), 803-812.
- 511 Jensen, B. D., Vicente, J. G., Manandhar, H. K., Roberts, S. J. (2010). Occurrence and
512 diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields
513 in Nepal. *Plant Disease*, 94 (3), 298-305.

- 514 Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., Schaad, N.W. (2004).
515 Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of
516 tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27 (6), 755-762.
- 517 Jones, J. B.; Pohronezny, K. L.; Stall, R. E.; Jones, J. P. (1986). Survival of
518 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on crop residue, weeds, seeds,
519 and volunteer tomato plants. *Phytopathology*, 76 (4), 430-434.
- 520 Kado, E. I., Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*,
521 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60
522 (6), 969-976.
- 523 Karam, D., Melhorança, A. L., Oliveira, M. F., Silva, J. A. A. (2010). Cultivo do milho:
524 Plantas daninhas. Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção, versão
525 eletrônica, 6° ed. Disponível em:
526 <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/plantasdaninhas.html>.
527 Acesso em: 18 jan, 2017.
- 528 Karavina, C., Mandumbu, R., Parwada, C., Zivenge, E. (2011). Epiphytic Survival of
529 *xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 9 (2),
530 1161-1168.
- 531 Kishun, R., Chand, R. (1988). Epiphytic survival of *Xanthomonas campestris* pv.
532 *campestris* on *Centella asiatica* (L.) Urban. *International Journal of Tropical*
533 *Plant Diseases*, 6 (2), 189-193.
- 534 Koenraad, H., Van Betteray, B., Germain, R., Hiddink, G., Jones, J.B., Oosterhof, J.,
535 Rijlaarsdam, A., Roorda, P., Woudt, B. (2009). Development of specific primers
536 for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *Acta*
537 *Horticulturae*, 808 (13), 99-102.
- 538 Krauthausen, H. J., Laun, N., Wohanka, W. (2011). Methods to reduce the spread of the
539 black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, in brassica
540 transplants. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 118 (1), 7-16.
- 541 Kurozawa, C., Pavan, M.A. (2005). Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*
542 Mill). In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA
543 (Eds), *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*, (p. 607-626). 4
544 ed. São Paulo, Editora Ceres.
- 545 Leu, Y. S., Deng, W. L., Yang, W. S., Wu, Y. F., Cheng, A. S., Hsu, S. T., Tzeng, K. C.
546 (2010). Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of

- 547 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *X. campestris* pv. *raphani*. *Plant*
548 *Pathology Bulletin*, 19 (2), 137-147.
- 549 Massomo, S. M. S., Hanne, N., Robert B. Mabagala., Keld M. G., John, H.,
550 Carmen, N. M. (2003). Identification and characterisation of *Xanthomonas*
551 *campestris* pv. *campestris* strains from Tanzania by pathogenicity tests, biolog,
552 rep-PCR and fatty acid methyl ester analysis. *European Journal of Plant*
553 *Pathology*, 109 (8), 775-789.
- 554 Miguel-Wruck, D. S., Oliveira, L. A., Dias, L. A. S. (2010). Host specificity in
555 interaction *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*-brassicac. *Summa*
556 *Phytopathologica*, 36(2), 129-133.
- 557 Mileo, L. J., Bentes, J. L. S., Silva, J. F., Christoffoleti, P. J. (2007). Plantas de
558 cobertura de solo como hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola*.
559 *Planta Daninha*, 24 (4), 677-683.
- 560 Mirik, M., Selcuk, F., Aysan, Y., Sahin, F. (2008). First outbreak of bacterial black rot on
561 cabbage, broccoli, and brussels sprouts caused by *Xanthomonas campestris* pv.
562 *campestris* in the Mediterranean Region of Turkey. *Plant Disease*, 92 (1), 176-
563 176.
- 564 Pereira, R. C., Araújo, E. R., Ferreira, M. A. S. V., Quezado-Duval, A. M.
565 (2011). Occurrence of *Xanthomonas* species causing bacterial spot in fresh market
566 tomato fields in Brazil. In: *III International Symposium on Tomato Diseases*, 914,
567 61-64.
- 568 Peruch, L. A. M., Michereff, S. J., Araújo, I. B. (2006). Levantamento da intensidade da
569 alternariose e podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco
570 e Santa Catarina. *Horticultura Brasileira*, 24 (4), 464-469.
- 571 Popović, T., Balaž, J., Starović, M., Trkulja, N., Ivanović, Ž., Ignjatov, M., Jošić, D.
572 (2013) .First report of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* as the causal agent
573 of black rot on oilseed rape (*Brassica napus*) in Serbia. *Plant Disease*, 97(3), 418-
574 418.
- 575 Potnis, N., Timilsina, S., Strayer, A., Shantharaj, D., Barak, J. D., Paret, M. L., Vallad,
576 G. E., Jones, J. B. (2015). Bacterial spot of tomato and pepper: diverse
577 *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide
578 challenge. *Molecular Plant Pathology*, 16 (9), 907–920.

- 579 Pusey, P.L., Wilson, C.L. (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot
580 by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*, 68(9), 753-756.
- 581 Quezado-Duval A.M., Lopes, C.A. (2010). *Mancha bacteriana*: uma atualização para o
582 sistema de produção integrada de tomate indústria. Brasília: EMBRAPA. 24p.
583 (Circular Técnica 84).
- 584 Quezado-Duval, A. M., Lopes, C. A., Leite Júnior, R. P., Lima, M. F., Camargo, L. E.
585 A. (2005). Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of
586 processing tomatoes in Brazil. *Acta Horticulturae*, The Hague, 695 (11), 101-108.
- 587 Quezado-Soares, A. M., Lopes, C. A. (1999). Controle químico da mancha-bacteriana
588 em tomateiro para processamento industrial. *Summa Phytopathologica*, 25 (1), 21
589 p. Resumo.
- 590 Quezado-Soares, A. M., Silva, V. L., Giordano, L. B., Lopes, C. A. (1998). Redução na
591 produtividade de tomateiro para processamento industrial devida à mancha-
592 bacteriana. *Horticultura Brasileira*, 16(1), /Resumo 266/.
- 593 Rathaur, P. S., Singh, D., Raghuwanshi, R., Yadava, D. K. (2015). Pathogenic and
594 genetic characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races based
595 on Rep-PCR and Multilocus Sequence Analysis. *Journal of Plant Pathology &*
596 *Microbiology*, 6 (10), 9 p.
- 597 Rodrigues- Neto, J., Malavolta, J. R., V. A. (1995). Doenças causadas por bactérias em
598 crucíferas. *Informe Agropecuário*, 17 (183), 56-59.
- 599 Rodriguez-R, L. M., Grajales, A., Arrieta-Ortiz, M. L., Salazar, C., Restrepo, S., Bernal,
600 A. (2012). Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. *BMC*
601 *Microbiology*, 12 (43), 14 p.
- 602 Schaad, N. W., Dianese, J. C. (1981). Cruciferous weeds as sources of inoculum of
603 *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. *Phytopathology*, 71 (11), 1215-
604 1220.
- 605 Schaad, N. W., Thaveechai, N. (1983). Black rot of crucifers in Thailand. *Plant Disease*,
606 67 (11), 1231-1234.
- 607 Silva, A. C., Ferreira, F. A., Ferreira, L. R. (2006). Manejo integrado de plantas
608 daninhas em hortaliças. *Pesquisa & Tecnologia*, 3 (2), 7p.
- 609 Silva, J. C., Silva Júnior, T. A. F., Soman, J. M., Tomasin, T. D., Sartori, M. P.,
610 Maringoni, A. C. (2017). Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in

- 611 the phyllosphere and rizosphere of weeds. *Plant Pathology*, Online. Doi:
612 10/1111/ppa.12682.
- 613 Singh, D., Rathaur, P. S., Vicente, J. G. (2016). Characterization, genetic diversity and
614 distribution of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races causing black rot
615 disease in cruciferous crops of India. *Plant Pathology*, 65 (9), 1411-1418.
- 616 Souza, E. B., Mariano, R. L. R., Felix, K. C. S., Silva, J. R. (2016). Isolamento de
617 bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. (Eds)
618 *Manual de Práticas em Fitobacteriologia*. (pp. 37-49). 3 ed. Recife: Eduferpe.
- 619 Staden, R., Beal, K. F., Bolfield, J. K (1998). The Staden Package. *Bioinformatic*
620 *Method Protocol*, 132, 115-130.
- 621 Vicente, J. G., Taylor, J. D., Sharpe, A. G., Parkin, I. A., Lydiate, D. J., King, G. J.
622 (2002). Inheritance of Race-Specific Resistance to *Xanthomonas campestris* pv.
623 *campestris* in *Brassica* Genomes. *Phytopathology*, 92 (10), 1134-1141.
- 624 Zhao, Y., Damicone, J. O., Demezenas, D. H., Bender, C. L. (2000). Bacterial leaf spot
625 diseases of leafy crucifers in Oklahoma caused by pathovars of *Xanthomonas*
626 *campestris*. *Plant Disease*, 84 (9), 1008-1014.
- 627



628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657

658 **Fig. 1** Plantas daninhas hospedeiras de *Xanthomonas euvesicatoria*: **a-** *Amaranthus lividus*; **b-**
659 *Althernanthera philoxeroides*; **c-** *Sida glomerata*; **d-** *Emilia fosbergii*.

660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689



Fig. 2 Planta daninha *Aeollanthus suaveollens*, hospedeiro alternativo da fitobactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

690

691

692

693

694

695

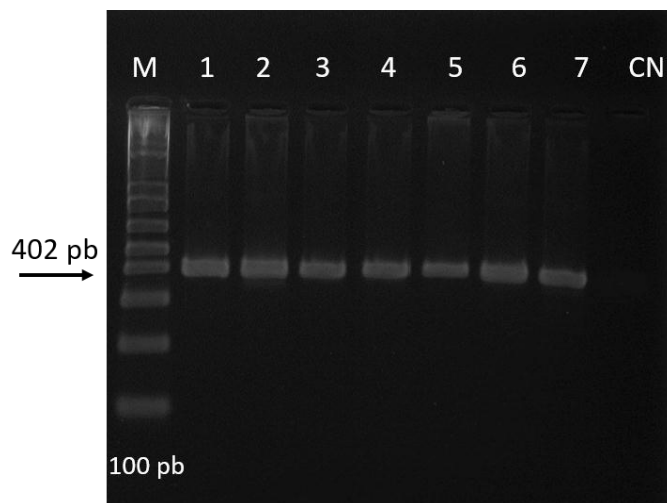
696

697

698

699

700



701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

Fig. 3 Amplificação de DNA de isolados de *Xanthomonas* obtidos de plantas daninhas, usando o primer específico X-gumDF7/X-gumDR7 para *Xanthomonas* do grupo II. (1) *Xanthomonas perforans*, (2) CRM3, (3) CRM11, (4) CRM16, (5) CRM42, (6) CRM53, (7) CRM60 e Controle negativo (CN).

723

724

725

726

727

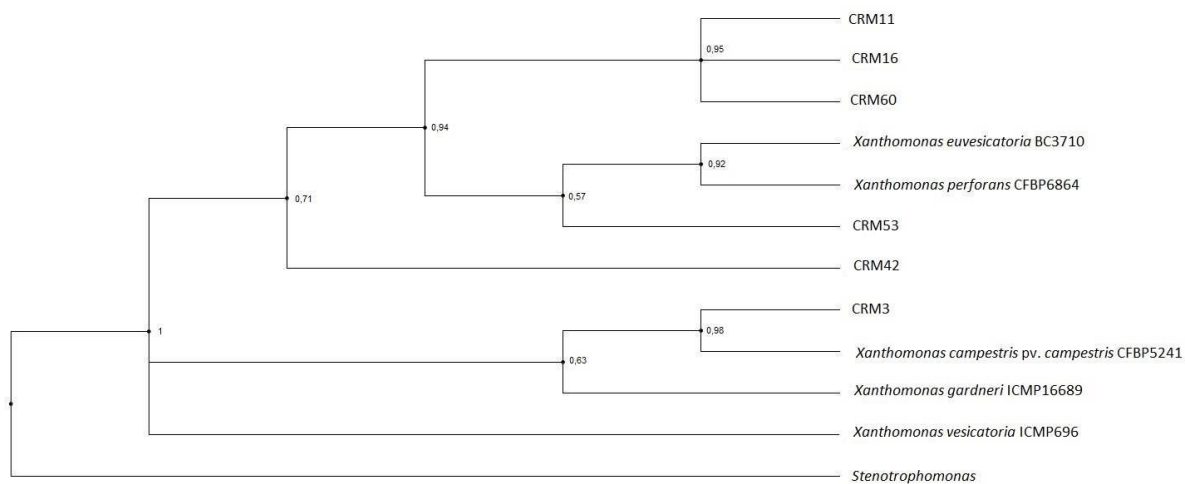
728

729

730

731

732



733

Fig. 4 Árvore filogenética construída por Inferência Baeyiana utilizando sequências do gene

734

gyrB, de isolados do complexo causador da mancha bacteriana das solanáceas e *Xanthomonas*.

735

campestris pv. *campestris* obtidos de plantas daninhas.

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

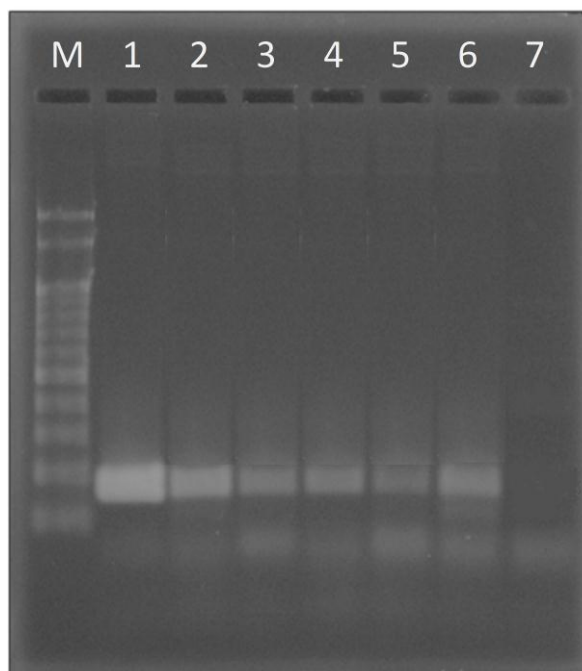
766

767

768

769

770



771 **Fig. 5** Amplificação de DNA de isolados de *Xanthomonas* obtidos de plantas daninhas, através
772 de PCR convencional com os *primers* BS-XeF/BS-XeR, específicos para *Xanthomonas*
773 *euvesicatoria*. (1) *X. euvesicatoria* (isolado EH2009-130), (2) CRM11, (3) CRM16, (4)
774 CRM42, (5) CRM53, (6) CRM60 e (7) Controle negativo (CN).

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

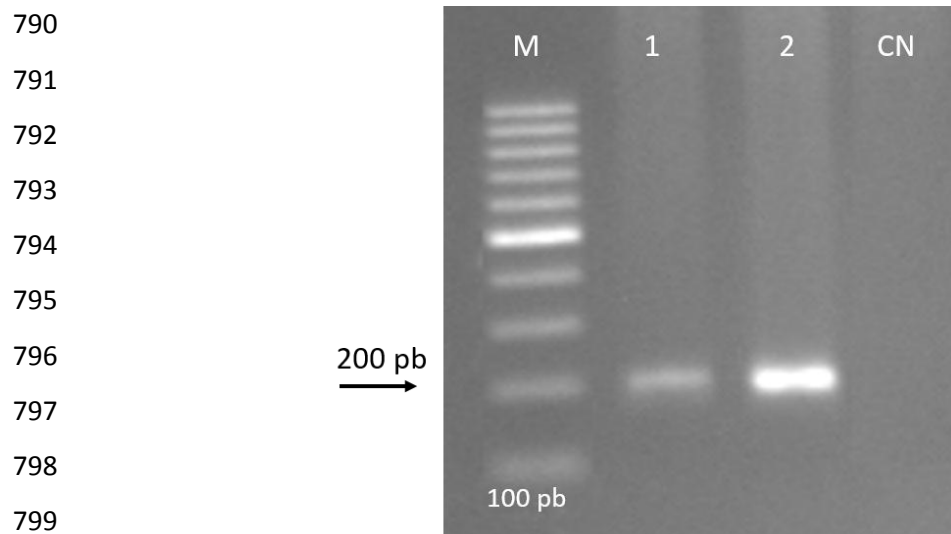


Fig. 6 Amplificação de DNA de isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* obtido de planta daninha, com *primer* específico 2f/2r. (1) *X. campestris* pv. *campestris* isolado patotipo (IBSBF959), (2) CRM3 e Controle negativo (CN)

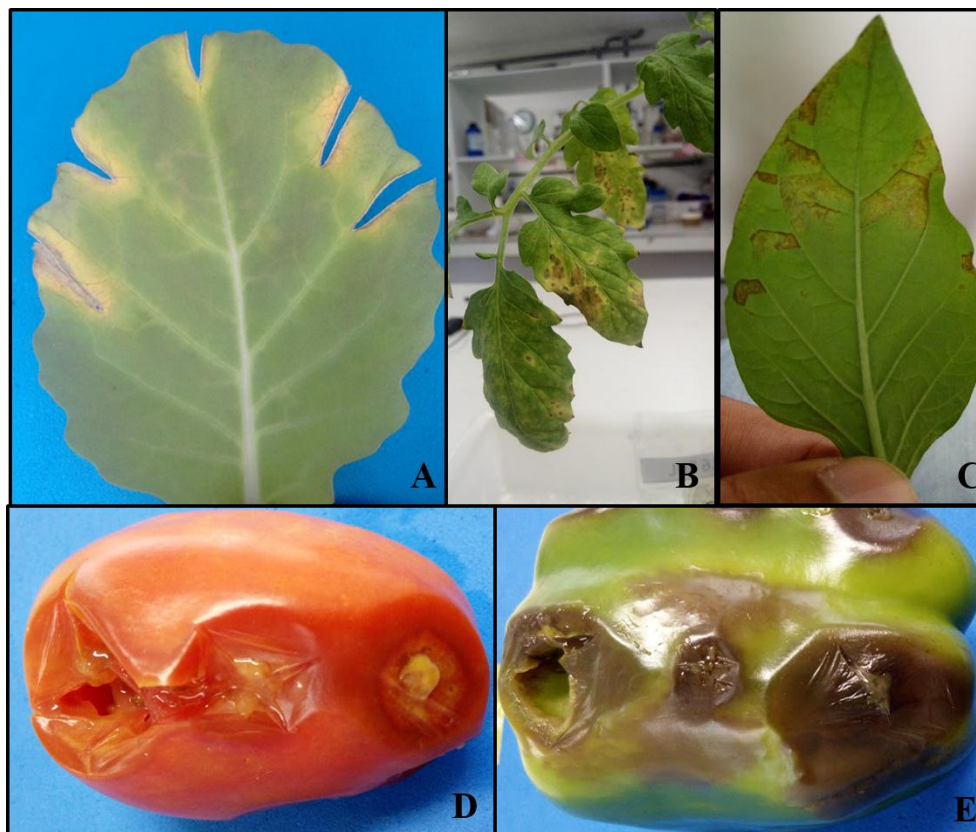


Fig. 7 Lesões em folhas e frutos observadas após inoculação artificial de isolados de *Xanthomonas* spp. obtidos de plantas daninhas: **A**- lesão foliar em couve-comum causada por *X. campestris* pv. *campestris*, 5 dias após inoculação; **B** e **C**- lesão foliar em tomateiro e pimentão, causada por *X. euvesicatoria*, 10 dias após inoculação; **D** e **E** – podridão mole em frutos de tomate e pimentão causada por *X. euvesicatoria*, onde pode-se observar a presença de exsudação bacteriana.

Tabela 1. Origem, designação e hospedeiros de isolados bacterianos do gênero *Xanthomonas* obtidos de plantas daninhas no estado de Pernambuco

Isolados	Planta daninha hospedeira	Família botânica	Município/ Mesorregião
CRM3	<i>Aeollanthus suaveolens</i>	Lamiaceae	Chã-Grande/ Mata
CRM11	<i>Amaranthus lividus</i>	Amarantaceae	Camocim de São Félix/ Agreste
CRM16	<i>Amaranthus lividus</i>	Amarantaceae	Chã-Grande/Agreste
CRM42	<i>Althernanthera philoxeroides</i>	Amarantaceae	Bom Jardim/ Agreste
CRM53	<i>Sida glomerata</i>	Malvaceae	Bom Jardim/ Agreste
CRM60	<i>Emilia fosbergii</i>	Asteraceae	Chã-Grande/ Mata

Conclusões gerais

CONCLUSÕES GERAIS

-Algumas plantas daninhas nos campos de cultivo de hortaliças em Pernambuco são hospedeiros alternativos das fitobacterias *Xanthomonas euvesicatoria* e *X. campestris* pv. *campestris*;

-*Amaranthus lividus* (caruru), *Althernanthera philoxeroides* (erva-de-jacaré), *Sida glomerata* (guanxuma branca) e *Emilia fosbergii* (bela-emília) são hospedeiros alternativos de *X. euvesicatoria*;

-Os isolados CRM11, CRM16, CRM42, CRM53 e CRM60 são patogênicos a plantas e frutos de tomateiro e pimentão, e os isolados CRM42 e CRM53 causam podridão mole nos frutos;

- Todos os isolados possuem forte atividade amilolítica e os isolados CRM42, CRM53 e CRM60 apresentam forte atividade pectinolítica;

- A planta daninha *Aeollanthus suaveolens*, conhecida como erva macassá, é hospedeiro alternativo de *X. campestris* pv. *campestris*;

-O isolado CRM3, identificado como *X. campestris* pv. *campestris*, é patogênico as brássicas repolho, brócolis, couve-comum e couve-flor.