



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-POSAGRO

WASHINGTON LUIS MANDUCA DA SILVA

**BACTÉRIAS DE FILOPANO DE MARACUJAZEIRO COMO AGENTE
DE CONTROLE BIOLÓGICO DA MANCHA-BACTERIANA**

BOA VISTA
RORAIMA-BRASIL
2013

WASHINGTON LUIS MANDUCA DA SILVA

**BACTÉRIAS DE FILOPANO DE MARACUJAZEIRO COMO AGENTE
DE CONTROLE BIOLÓGICO DA MANCHA-BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Agronomia, área de concentração em produção vegetal, da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Pesquisador Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira

Co-orientador: Pesquisador Dr. Daniel Augusto Schurt

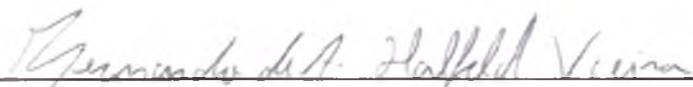
BOA VISTA
RORAIMA-BRASIL
2013

WASHINGTON LUIS MANDUCA DA SILVA

Bactérias de filoplano de maracujazeiro como agentes de controle biológico da mancha-bacteriana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Produção Vegetal.

Aprovado: 25 de março de 2013.



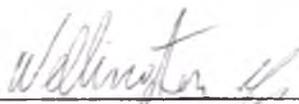
Pesquisador Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira
Orientador- Embrapa Meio Ambiente



Pesquisador Dr. Daniel Augusto Schurt
Coorientador - Embrapa Roraima



Pesquisador Dr. Edvan Alves Chagas
Embrapa Roraima



Prof. Dr. Wellington Farias Araújo
UFRR

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

S586b Silva, Washington Luis Manduca da Silva.
Bactérias de filoplano de maracujazeiro como agente de controle biológico da mancha bacteriana / Washington Luis Manduca da Silva. – Boa Vista, 2013.
84 p. : il.

Orientador: Pesquisador. Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira.
Co-orientador: Pesquisador Dr. Daniel Augusto Schurt

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Agronomia

1 - Antibiose. 2 – Fontes de carbono. 3 – *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. 4 – Seleção massal 5 – Sideróforo 6 – *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* I - Título. II – Vieira, Bernardo de Almeida Halfeld (orientador). III – Schurt, Daniel Augusto (co-orientador)

CDU- 634 1:632 1

**Á Deus pai, a razão de tudo e de todos.
Aos meus pais Irlene Lira Manduca e Manoel Correia da Silva, que me deram a vida
e me ensinaram a vivê-lá.
Ao meu filho.
Aos meus irmãos, pelo companheirismo da vida.
Aos meus amigos pelo apoio nos momentos difíceis.
Dedico este trabalho.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado nos momentos de fraqueza e angústia e por me direcionar sempre para o caminho certo da vida.

Aos meus pais Manoel Correia da Silva e Irlene Lira Manduca, por todo o tempo dedicado para minha educação e contribuição para condução dos meus estudos.

Aos meus irmãos, Joanne Lira Alexandre, Geonvane Lira Alexandre, Ylmyky Manduca da Silva, Kátia Mylena Lira da Silva e Vitória Arusa Correia, pelo companheirismo ao longo da vida e pelo apoio moral.

Aos pesquisadores Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira, Dr. Daniel Augusto Schurt e Dra. Alessandra Keiko Nakasone Ishida, pela orientação e contribuição para a elaboração desse trabalho.

Ao professor Dr. Wellington Farias Araújo e ao pesquisador Dr. Edvan Alves Chagas, pelas efetivas contribuições científicas.

À Maria Jesuína Lima da Silva, que esteve sempre ao meu lado.

Todos os meus familiares e, em especial a minha tia Iria Lira.

Ao técnico do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, Giovanni Ribeiro de Souza e aos estagiários Luciana Baú Trassato e Samuel Silva, por todo o apoio logístico.

Aos meus amigos, Pablo Lima de Souza Cruz, Lindemberg de Matos Galvão, Raphael Henrique da Silva Siqueira, Stéfanny Araújo Martins, Nádia Santos, Diego Avise Montanha e Francisco Clemilto da Silva Maciel.

Aos colegas Ricardo Bardalez, Maria Luiza, Ruy Guilherme, Hilton Xavier, Marcela Liege, Maria da Conceição, Jefferson Venâncio, Alexandre Baraúna, Juliana Espíndola, Tarcício Gomes, Marcos Wanderley, Ronaldo Benedette e Diego Cruz.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para que o objetivo de conclusão deste trabalho fosse alcançado.

Aos docentes da POSAGRO, pelos ensinamentos concebidos.

À Universidade Federal de Roraima e Embrapa Roraima, pela oportunidade de realização deste curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

BIOGRAFIA

WASHINGTON LUIS MANDUCA DA SILVA, filho de Manoel Correia da Silva e Irlene Lira Manduca, nasceu em 10 de dezembro de 1983 na cidade de Boa Vista, Roraima. Concluiu o ensino médio na Escola Estadual Professor Camilo Dias. Concluiu o curso Técnico em Secretariado, pelo Instituto Federal de Roraima em 2005. Ingressou no Curso de Agronomia em 2006, e o concluiu em 2010. Em 2009, participou do Programa de Educação Tutorial do Curso de Agronomia da UFRR. Monitor das Disciplinas, Experimentação para Ciências Agrárias em 2009 e Princípios de Entomologia em 2010. Bolsista PIBIC- CNPq, em 2008, 2009 e 2010. Em 2011, iniciou o Mestrado em Agronomia, do Programa de Pós-Graduação, área de concentração Produção Vegetal, da Universidade Federal de Roraima-UFRR.

No momento ruim da vida, prefiro fingir que estou tranquilo e vencer, do que transmitir meu medo e perder.

(Tiago Augusto da Cunha)

SILVA, Washington Luis Manduca da. **Bactérias de filoplano de maracujazeiro como agente de controle biológico da mancha-bacteriana**. 2013. 84p. Dissertação de Mestrado em Agronomia-Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2013.

RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho selecionar bactérias residentes de filoplano de maracujazeiro como possível agente de biocontrole da mancha-bacteriana que tem como agente causal a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (*Xap*) e estudar os mecanismos de ação envolvidos no controle biológico. A primeira etapa de seleção baseou-se em testes *in vivo* com 224 isolados obtidos a partir de folhas saudáveis de maracujazeiro amarelo coletadas em pomares comerciais, sendo 102 oriundos do estado de Roraima, 72 do Pará e 50 de São Paulo. Estes foram testados em casa-de-vegetação no controle das bactérias fitopatogênicas originadas dos estados de Roraima (*Xap*-RR), São Paulo (*Xap*-SP) e Pará (*Xap*-PA). Após esta etapa, foram selecionados os residentes de filoplano RR-46; RR-29; RR-133; RR-98 e RR-14, oriundo de Roraima e SP-11; SP-18; SP-22; SP-48 e SP-28, provenientes de São Paulo devido apresentarem baixos níveis de severidade da doença 2,3; 2,8; 2,9; 3,5; 3,6; 3,2; 3,25; 3,55; 4,25 e 6,25%, respectivamente. Não houve nenhum antagonista detectado como promissor proveniente do estado do Pará. Foram selecionados os isolados RR-14; RR-29; RR-46; RR-98; RR-133; SP-11; SP-18; SP-22; SP-28 e SP-48, para a segunda etapa de seleção. Esta realizada, *in vitro* onde os isolados foram submetidos aos ensaios para verificação da utilização de fontes únicas de carbono para verificação de sobreposição de nicho, antibiose por difusão em meio de cultura, produção de sideróforos e influência na atividade da enzima peroxidase na planta. Os resultados demonstraram que os isolados RR-98 e RR-113 foram capazes de competir por nicho somente contra *Xap*-RR, através da sobreposição de nicho. Na antibiose, por difusão em meio de cultura o isolado RR-29, foi capaz de inibir três isolados de *Xap*, provenientes de RR, SP, PA e o isolado SP-28 inibiu apenas as duas últimas. A produção de sideróforos foi observada somente pelos isolados RR-29 e SP-28. Nenhum antagonista foi capaz de influenciar no aumento da atividade de peroxidases nas plantas de maracujazeiro o que indica que não são capazes de induzirem resistência. A sobreposição de nicho, competição por ferro e/ou antibiose são fatores que explicam a capacidade de controle da mancha-bacteriana, mediadas pelos isolados RR-98 e RR-133, RR-29 e SP-28.

Palavras-chave: antibiose. fontes de carbono. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. seleção massal. sideróforo. *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

SILVA, Washington Luis Manduca da. **Phylloplane bacteria as biological control agent of bacterial spot**. 2013. 84p. M. S. Dissertation in agronomy-Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2013.

ABSTRACT

The objective of this work was to select residents phylloplane bacteria passion fruit as a possible biocontrol agent of bacterial spot which is the causal agent *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (*Xap*) and study the mechanisms involved in biological control. The first stage of selection was based on *in vivo* tests with 224 isolates obtained from healthy leaves of yellow passion fruit collected from commercial orchards, and 102 from the state of Roraima, 72 from Pará and 50 from São Paulo. These were tested in green-house control of phytopathogenic isolates originating from the states of Roraima (*Xap*-RR), São Paulo (*Xap*-SP) and Pará (*Xap*-PA). After this step, we selected phylloplane residents RR-46, RR-29, RR-133, RR-98 and RR-14, from Roraima and SP-11, SP-18, SP-22, SP-48 and SP-28, from São Paulo due to the low levels of severity 2,3; 2,8; 2,9; 3,5; 3,6; 3,2; 3,25; 3,55; 4,25 and 6,25%, respectively. There was no antagonist detected from the state of Pará. Were selected isolates RR-14, RR-29, RR-46, RR-98, RR-133, SP-11, SP-18, SP-22, SP-28 and SP-48, for the second stage of selection. This isolates were subjected to tests to check the use of single sources of carbon for verification of niche overlap, antibiosis, diffusion of inhibitory substances in culture medium, production of siderophores and influences the activity of peroxidase enzyme in the plant. The results showed that isolates RR-98 and RR-113 were able to compete only against for *Xap*-RR, by overlapping niche. In antibiosis by diffusion in a culture medium for isolated RR-29, was able to inhibit three isolates of *Xap*, from RR, SP, and PA. The strain SP-28 only inhibited the last two. The siderophore production was observed only for the isolated RR-29 and SP-28. No antagonist was able to influence the increase of the peroxidase activity of passion fruit plants which indicates they are not resistance inducers. Niche overlap, competition for iron and / or antibiosis are features that explain the ability to control bacterial spot, mediated by isolates RR-98 and RR-133, RR-29 and SP-28.

Keywords: antibiosis. carbon sources. peroxidase. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. mass selection. *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO GERAL	12
2.1	Objetivos Específicos.....	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1	Maracujá (<i>Passiflora edulis</i> Deg. f. <i>flavicarpa</i> Sims).....	13
3.2	Mancha-bacteriana.....	14
3.3	Bactérias de Filoplano como Possíveis Agentes de Biocontrole.....	16
4	CAPÍTULO 1: SELEÇÃO MASSAL DE ISOLADOS BACTERIANOS RESIDENTES DE FILOPLANO DO MARACUJAZEIRO VISANDO O BIOCONTROLE DA MANCHA - BACTERIANA	21
4.1	RESUMO.....	21
4.2	ABSTRACT.....	22
4.3	INTRODUÇÃO.....	23
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.4.1	Isolamento das Bactérias de Filoplano do Maracujazeiro.....	24
4.4.2	Seleção Massal das Bactérias com Capacidade de Biocontrole <i>in vivo</i>	25
4.5	RESULTADOS.....	27
4.5.1	Isolamento das Bactérias de Filoplano do Maracujazeiro.....	27
4.5.2	Seleção Massal das Bactérias com capacidade de Biocontrole <i>in vivo</i>	27
4.6	DISCUSSÃO.....	40
4.7	CONCLUSÕES.....	42
5	CAPÍTULO 2: MECANISMOS DE BIOCONTROLE DA MANCHA BACTERIANA MEDIADOS POR BACTÉRIAS DO FILOPLANO	43
5.1	RESUMO.....	43
5.2	ABSTRACT.....	44
5.3	INTRODUÇÃO.....	45
5.4	MATERIALE MÉTODOS.....	47
5.4.1	Capacidade de Metabolizar Diferentes Fontes de Carbono.....	47
5.4.2	Produção de Sideróforos.....	48
5.4.2.1	Detecção de Pioverdina.....	48
5.4.3	Antibiose em Meio de Cultura.....	49

5.4.4	Efeito das Bactérias do Filoplano na Atividade da Peroxidase em Plantas de Maracujazeiro.....	49
5.4.4.1	Obtenção dos Extratos.....	50
5.4.4.2	Determinação da Atividade de Peroxidasas (PO).....	50
5.5	RESULTADOS	52
5.5.1	Capacidade de Metabolizar Diferentes Fontes de Carbono.....	52
5.5.2	Produção de Sideróforos.....	56
5.5.2.1	Detecção de Pioverdina.....	58
5.5.3	Antibiose em Meio de Cultura.....	58
5.5.4	Efeito das Bactérias do Filoplano na Atividade da Peroxidase em Plantas de Maracujazeiro.....	59
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICES	79
	ANEXOS	80

1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro (*Passiflora* spp.) é uma planta tropical, com ampla variabilidade genética, originário da América do Sul e tem o Brasil como seu centro de diversidade (MANICA, 2005). A família Passifloraceae é formada por 18 gêneros e 630 espécies, sendo o gênero *Passiflora* o mais importante economicamente (MANICA, 2005). Porém, no Brasil, cerca de 95% dos cultivos comerciais baseiam-se em uma única espécie, o maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Deg. f. *flavicarpa* Sims), devido à qualidade dos seus frutos, vigor, produtividade e rendimento em suco (MELTTI; BRÜCKNER, 2001). Atualmente, o Brasil é maior produtor mundial da fruta (AREDES et al, 2009)

Atualmente a cultura do maracujazeiro enfrenta muitos problemas de ordem fitossanitária, como doenças causadas por fungos, vírus, bactérias e nematóides. A mancha-bacteriana do maracujazeiro ou mancha-oleosa causada por [*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye.] é uma das mais severas, podendo causar prejuízos em torno de 20 a 30% aos produtores (ERENO, 2011). Devido a grande dificuldade de controle e a falta de opções de produtos químicos com baixa eficiência, economicamente viáveis e menos agressivos ao meio ambiente. Dessa forma, há necessidade de pesquisas que visem o desenvolvimento de variedades resistentes a doença ou de novos métodos alternativos de controle da doença (JUNQUEIRA, 2010).

O controle biológico surge como uma alternativa atraente para auxiliar no controle da mancha-bacteriana do maracujazeiro. O controle biológico tem como definição a redução da densidade de inóculo ou atividades determinantes da doença causada por um patógeno, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas (BAKER; COOK, 1974).

Dentre as diversas bactérias benéficas que existem na natureza, as endofíticas, as rizobactérias e as residentes de filoplano podem vir a ser utilizadas como agentes de biocontrole (HALFELD-VIEIRA, 2002).

Considera-se que as bactérias residentes de filoplano como potenciais agentes de biocontrole de enfermidades de plantas, possam ser capazes de atuar por antagonismo direto contra patógenos ou por indução de resistência (ROMEIRO,

2007), com um impacto ambiental mínimo, o que pode levar à melhoria das técnicas de cultivo e evitar perdas acentuadas por doenças. Entretanto, a filosfera é ambiente complexo, que sofre variações intermitentes de componentes micros ambientais (ANDREWS; HIRANO, 1991; WILSON et al., 1999) como umidade, temperatura, incidência de radiação, ventilação, composição e quantidade de nutrientes. Conseqüentemente, a eficiência dos agentes de biocontrole de doenças da parte aérea depende da capacidade de sobrevivência e da manutenção de populações em alta densidade nesse ambiente (HALFELD-VIEIRA, 2004). Assim, na busca por procariotas residentes do filoplano como agentes de biocontrole é preciso prospectar e estudar suas potencialidades (ROMEIRO, 2007).

Pesquisas com microrganismos procariotas têm se destacado como agentes de biocontrole, por resultados promissores. Dentre estes, as bactérias utilizadas no controle biológico mais comum, pertencem a espécies dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. O uso de *Bacillus spp.* é mais explorado, pelo fato de produzirem estruturas de resistência denominadas, endósporos que se tornam uma vantagem no processo de formulação e viabilidade. As *Pseudomonas spp.* também têm sido muito utilizadas, devido a sua versatilidade fisiológica (GARCIA, 2008).

Como ainda são escassas as pesquisas relativas ao controle biológico da mancha-bacteriana do maracujazeiro, a busca por isolados bacterianos residentes de filoplano tem como objetivo selecionar agentes com eficiência no controle dessa enfermidade.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi estudar uma alternativa de controle da mancha-bacteriana do maracujazeiro como componente do manejo integrado da doença.

2.1 Objetivos Específicos

Constituir uma coleção de bactérias selecionadas de filoplano de maracujazeiro com evidência de capacidade de controle da mancha-bacteriana;

Estudar o(s) mecanismo(s) de biocontrole envolvido(s) na seleção de isolados bacterianos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Maracujá (*Passiflora edulis* Deg. f. *flavicarpa* Sims)

Maracujazeiros são plantas pertencentes à família Passifloraceae, cultivadas para produção de frutos, fins ornamentais e produtos farmacológicos. O tipo mais cultivado é o amarelo ou azedo, cujo fruto é utilizado para produzir suco e polpa, sendo também conhecido pelas suas propriedades calmantes (LUIZON, 2009). É nativo da América do Sul e é amplamente cultivado em países tropicais e subtropicais (LIMA, 2002).

O maracujá amarelo é o mais cultivado e comercializado no país devido à qualidade de seus frutos (ZERAİK et al., 2010). O Brasil é o maior produtor de maracujá, com aproximadamente 60% da produção mundial (ARÊDES et al., 2009). No país, a produção da fruta é estimada em 664.000 toneladas, sendo a área cultivada correspondente a 47.032 hectares por ano, com destaque para os Estados da Bahia, Espírito Santo e São Paulo que são os maiores produtores do maracujá (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2010). Porém, tem uma participação pequena no mercado internacional, tendo como um dos principais fatores que contribuem para essa situação os problemas fitossanitários que a cultura apresenta (BRIGNANI NETO, 2002).

Roraima não possui destaque na produção nacional de maracujá, mas em contra partida a fácil comercialização, bem como o clima ideal para seu cultivo, fizeram aumentar a área plantada no Estado, muitas vezes sem a devida preocupação com os problemas fitossanitários, que podem onerar ou mesmo inviabilizar a atividade (HALFELD-VIEIRA et al. , 2007).

A cultura do maracujá pode ser afetada por uma diversidade de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides. Em algumas regiões do país, doenças como a bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*), murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*), virose do endurecimento do fruto (*Passion fruit Woodiness Virus*) e a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) têm sido limitantes de produção (FALEIRO et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2005).

Com destaque especial, para a mancha-bacteriana do maracujazeiro, a qual é de difícil controle e de ocorrência generalizada no Brasil (OLIVEIRA; RUGGIERO, 1998).

3.2 Mancha-bacteriana

A mancha-bacteriana do maracujazeiro [*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye]] (GONÇALVES e ROSATO, 2002) é uma doença que tem como hospedeiros espécies pertencentes ao gênero *Passiflorae* (LIBERATO, 2002). Anteriormente o patógeno era classificado como *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye; porém, teve sua espécie reclassificada no ano de 2000 (GONÇALVES; ROSATO, 2000).

O primeiro relato da doença no Brasil ocorreu em 1968, na região de Araraquara, estado de São Paulo (PEREIRA, 1969). Em Roraima seu primeiro relato ocorreu em julho de 2005, tendo como hospedeiro o maracujá amarelo (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006a).

A mancha-bacteriana pode ser facilmente reconhecida, pelo encharcamento do tecido, com coloração verde-escura, ao redor das manchas que se formam nas folhas, sendo comum o início do desenvolvimento das lesões a partir dos bordos foliares. As lesões avançam rapidamente em direção ao centro, progredindo para uma queima severa, na maioria das vezes com halo amarelado em torno do tecido necrosado, com o desenvolvimento da doença ocorre seca das folhas e, posteriormente, desfolha, reduzindo consideravelmente a produtividade. Ao atingindo os feixes vasculares a bactéria causa infecção sistêmica, podendo ocasionar morte de ramos e, ocasionalmente, até a morte da própria planta (HALFELD-VIEIRA et al., 2007).

Já nos frutos, a doença se caracteriza pelo surgimento de manchas grandes, inicialmente esverdeadas e oleosas, depois pardas, em geral circulares e bem delimitadas. Apesar de superficiais, essas manchas, em condições favoráveis, permitem que o patógeno penetre na polpa, fermentando-a e também podendo alcançar as sementes, o que inviabiliza sua comercialização (VIANA et al., 2003). A semente pode veicular o patógeno tanto interna como externamente (VILLANOVA et al., 2007).

O patógeno pode ser disseminado por meio de mudas contaminadas, água da chuva ou irrigação associada ao vento, pelos instrumentos de poda, colheita, ou pelo próprio homem. Sobrevive principalmente em restos de cultura, sendo que o período de sobrevivência pode ser reduzido com o seu enterrio (LIBERATO; COSTA, 2001; SANTOS FILHO et al., 2004). A bactéria penetra através de estômatos, hidatódios

agronômicas aceitáveis que tenham resistência a doença. Neste contexto, o controle biológico pode vir a ser uma ferramenta adicional auxiliando na redução dos danos. Devido ao alvo biológico, postula-se que as bactérias do filoplano são mais promissoras nesse papel, por ocuparem o mesmo nicho do patógeno.

3.3 Bactérias de Filoplano como Possíveis Agentes de Biocontrole

O termo filosfera representa o ambiente sob influência do filoplano (LAST, 1955), que é fisicamente a superfície foliar (LAST; DEIGHTON, 1965).

A população dos microrganismos que vivem no filoplano de plantas é extremamente complexa com referência na sua constituição e também existe uma grande diversidade de eventos e condições que determinam sua dinâmica (BEATTIE; LINDOW, 1995; KINKEL et al., 1996; KINKEL, 1997). Isto representa um habitat comum para microrganismos e muitos deles podem apresentar potencialidades como agentes de controle biológico de doenças (BAKER; COOK, 1974).

Na diversidade populacional dos microrganismos que residem no filoplano como leveduras e fungos filamentosos, as bactérias são as mais abundantes e encontradas em densidades médias de 10^6 - 10^7 células/cm² de área foliar (LINDOW; LEVEAU, 2002).

A filosfera se caracteriza como um ambiente bastante hostil e a microbiota residente no filoplano fica exposta as condições que podem variar rapidamente, tais como temperatura, a radiação ultra-violeta, o teor de água e a disponibilidade de nutrientes (HIRANO; UPPER, 2000), condições que dificultam o estabelecimento de populações no filoplano. Estes fatores ocasionam muitas das vezes ineficiência dos agentes de biocontrole promissores, devido a sua incapacidade de sobreviver ou manter suas populações em alta densidade, o que os impede de exercer suas funções no controle de doenças (LEBEN, 1985).

As bactérias possuem estratégias para sobreviverem em condições de estresse, como a tolerância o escape e a versatilidade nutricional. A primeira diz respeito à capacidade de tolerar as condições adversas do ambiente, como variações na umidade, variações extremas de temperatura, incidência de radiação ultravioleta (JACOBS; SUNDIN, 2001), enquanto a segunda trata da habilidade da bactéria em explorar sítios que apresentem condições estáveis, menos sujeitos ao

estresse ambiental (BEATTIE; LINDOW, 1995; BEATTIE; LINDOW, 1999). Em termos nutricionais, preconiza-se que a bactéria deva ser suficientemente versátil, do ponto de vista metabólico, para utilizar os nutrientes disponíveis e ser capaz de competir por eles com os componentes da microbiota circundante (ROMEIRO, 2007).

É necessário destacar a importância da disponibilidade de certos nutrientes para a permanência das populações de residentes no filoplano. De acordo com Wilson; Lindow (1994), a presença de carbono é determinante para que haja efetiva colonização das células bacterianas. As fontes de carbono disponíveis podem ser encontradas, principalmente nas formas de glicose e frutose, que são secretadas do interior das plantas (MERCIER; LINDOW, 2000; YUEH et al., 2001;). Desta forma, se caracterizam sítios específicos no filoplano (WELLER; SAETTLER, 1980; LEBEN, 1981; LEBEN, 1988), onde as populações residentes podem variar de acordo com a disponibilidade de nutrientes.

Um antagonista com devido potencial de biocontrole deve possuir características específicas, como ser capaz de se estabelecer com eficiência em locais protegidos, tais como depressões entre as células, nas bases dos tricomas, nas depressões entre células da epiderme e ao longo das nervuras (MARIANO; McCARTER, 1991), também conseguir manter-se em condições ambientais desfavoráveis, ter um grande potencial de competição por nutrientes e capacidade em produzir substâncias antimicrobianas de amplo espectro, que reduzem as chances dos propágulos de fitopatógenos sobreviverem (BETTIOL, 1997), o que reduziria a chance de ocorrência de ciclos secundários da doença. Uma dessas características é a capacidade de sintetizar agentes quelantes específicos para o íon ferro chamados de sideróforos, o que pode ser importante em ambientes com limitações desse mineral (VARMA; CHINCHOLKAR, 2007). O sideróforo pode ser produzido por fungos e bactérias, exerce a propriedade de ligar-se ao íon ferro, sendo posteriormente transportados para o interior da célula. Assim, atuam como agentes solubilizadores extracelulares sob condições limitantes de ferro (VARMA; CHINCHOLKAR, 2007).

Os diferentes tipos de sideróforos geralmente ocorrem de acordo com o gênero de cada bactéria. Exemplificando, *Burkholderia spp.* produzem ornibactina, *Mycobacterium spp.* produzem micobactina. Porém existem algumas exceções, onde pioverdina e cepabactina podem ser produzidas tanto por *Pseudomonas spp.*

quanto por *Burkholderia spp.*, e a enterobactina pode ser produzida por *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* e *Erwinia spp.* (BULTREYS, 2007, apud PELZER, 2010).

No filoplano, a capacidade de competição é maior quando ocorre sobreposição das exigências nutricionais do antagonista e do fitopatógeno, resultando em um baixo nível de coexistência entre os dois organismos em que um tende a excluir o outro (WILSON; LINDOW, 1994). Portanto, é desejável que bactérias residentes no filoplano utilizadas para atuar no controle biológico de organismos fitopatogênicos devam possuir habilidades para competir com o patógeno alvo por nutrientes e nichos, multiplicando-se e desenvolvendo-se nas mesmas condições ambientais ideais para a ocorrência da doença (ROMEIRO, 2007).

Antagonistas que agem por antibiose são os mais indicados para o controle biológico dos patógenos biotróficos, porque esses possuem uma fase epifítica relativamente curta e geralmente exigem pouco ou nenhum nutriente exógeno para penetração e podem sofrer a ação de produtos antimicrobianos nessa fase. Por outro lado os necrotróficos tendem a ter crescimento saprofítico no filoplano, utilizando nutrientes exógenos em pré-penetração (ANDREWS, 1992). Por isso, antagonistas que concorrem por nutrientes, poderiam ser eficazes nessa situação.

Outro mecanismo que pode ser utilizado pelo antagonista é a produção de enzimas capazes de degradar diferentes componentes, como os que constituem a parede celular, o que se caracteriza como mecanismo de parasitismo (KONG et al., 1997; GUETSKY et al., 2002), uma vez que se admite que é um meio da bactéria ter acesso a nutrientes originados de outros microrganismos. Porém, muitas vezes, a produção de antibióticos e enzimas ocorrem simultaneamente, dificultando a elucidação do mecanismo de controle envolvido (WHIPPS, 2001 apud HALFELD-VIERA, 2002).

Os antagonistas ainda podem produzir substâncias voláteis para inibir a ação dos fitopatógenos. Uma das mais comuns investigadas é o ácido cianídrico (HCN), um inibidor de hemi-proteínas, tais como, a citocromo oxidase e a cloreto dismutase (RIKKEN et al., 1996). O cianeto pode levar à inibição da cloreto dismutase, assim como outras hemi-enzimas envolvidas na redução do perclorato. A inibição dessas enzimas resulta em acúmulo de cloreto no interior da célula, a qual pode entrar em colapso (SONG; LOGAN, 2004).

Também podem induzir resistência a planta contra doenças sendo este um dos mecanismos de biocontrole que mais se estudou nos últimos anos (WHIPPS, 2001), principalmente utilizando rizobactérias como indutores (STICHER et al., 1997; VAN LOON et al., 1998), porém, existem evidências que bactérias do filoplano também podem induzir resistência (HALFELD-VIEIRA et al., 2006). Neste sentido, algumas enzimas têm sido consideradas indicadoras do estado de indução em plantas. Dentre estas a enzima peroxidase destaca-se por gerar produtos que estão ligados na formação da parede celular vegetal, suberização e lignificação (KOLATTUKUDY et al., 1992). As atividades das peroxidases, em plantas infectadas por patógenos, ou em plantas induzidas, estão também ligadas à oxidação de compostos fenólicos, que são tóxicos aos patógenos (SUTIC; SINCLAIR, 1991). O acúmulo de lignina, e de compostos fenólicos, tem sido correlacionado com a resistência das plantas a patógenos (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002).

Por isso as tentativas de se utilizar residentes de filoplano como agentes de biocontrole continuam sendo realizadas, apesar de todas as características da condição inóspita do ambiente do filoplano (BETTIOL, 1997). Como exemplo, podemos citar os trabalhos realizados por Macagnan (2001); Halfeld-Vieira (2002); Garcia (2004); Macagnan (2005); Vieira Júnior (2005).

Em trabalhos mais recentes, podemos destacar os realizados por Rollemberg (2008) que trabalhando com isolados bacterianos residentes de filoplano de macieira como potencial agente de biocontrole da mancha das folhas da macieira causado por *Colletotrichum* spp., encontrou sete isolados A19, A131, A132 (Campo Largo), A68, A69 (Porto Amazonas), A135 e A137(Quatro Barras) em avaliação a campo considerados promissores para o biocontrole da mancha das folhas da macieira.

Já Garcia (2008), objetivando o biocontrole do cretamento bacteriano comum do feijoeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) por procariontes em condições de casa de vegetação, trabalhou com cinco bactérias pré-selecionadas (*Bacillus cereus* UFV-172 e UFV-75 isoladas de filoplano de feijoeiro; *Pseudomonas putida* UFV-053 isolada de rizosfera de feijoeiro; *B. cereus* UFV-101, isolado de rizosfera de tomateiro; e *P. putida* UFV-Pp, isolada de filoplano de tomateiro), e concluiu que os cinco antagonistas reduziram a severidade da doença em comparação com o controle, que consistiu em plantas tratadas com água.

Em outro trabalho, Ocampos (2010) utilizou 324 bactérias isoladas do filoplano visando o biocontrole da alternariose e da podridão negra da couve, selecionou

como os mais promissores no experimento em casa de vegetação, os isolado UFV-215 para o controle da alternariose e o UFV-247 para o controle da podridão negra. Observou também que os dois isolados foram compatíveis em testes *in vitro* e no controle das duas doenças em plantas de couve, concluindo que ambas as bactérias selecionadas apresentaram eficiência como agentes de biocontrole contra as doenças em estudo, em experimentos em casa de vegetação, demonstrando grande potencial para utilização no campo.

Entretanto, dentre os diversos agentes bióticos que podem ser utilizados em controle biológico, as bactérias do filoplano são uma alternativa ainda pouco explorada, principalmente quando comparadas às rizobactérias (LINDOW; LEVEAU, 2002) e esta diferença se deve, em grande parte, às características do habitat onde cada um se encontra. Explorar suas potencialidades e investigar como podem ser utilizadas como agentes de controle biológico de patógenos de parte aérea, pode trazer grandes contribuições no manejo de doenças (HALFELD-VIEIRA, 2002).

Diante disso, se faz necessária mais pesquisas sobre diversas culturas e no caso do maracujazeiro, ainda não se tem informação sobre a ação de bactérias residentes de filoplano que tenham ação de controle biológico de doenças da parte aérea.

4. CAPÍTULO 1: SELEÇÃO MASSAL DE ISOLADOS BACTERIANOS RESIDENTES DE FILOPLANO DO MARACUJAZEIRO, VISANDO O BIOCONTROLE DA MANCHA-BACTERIANA

4.1 RESUMO

A seleção massal *in vivo* é uma etapa de grande importância para que não haja o direcionamento do controle biológico apenas pelos mecanismos envolvidos, mas sim pela eficácia do agente de biocontrole. Objetivou-se com esse trabalho selecionar bactérias residentes de filoplano do maracujazeiro como possível agente de biocontrole da mancha-bacteriana que tem como agente causal a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. 224 isolados foram obtidos a partir de folhas sadias de maracujazeiro amarelo coletadas em pomares comerciais, sendo 102 oriundos do estado de Roraima, 72 do Pará e 50 de São Paulo. O isolamento foi feito com a utilização de metade de uma folha definitiva sadia imersa em solução salina (0,85% NaCl) estéril com 0,3% de Tween 80, mantidas em shaker por 20 min. e semeadas em placa de Petri contendo meio de cultura 523 após realização de diluições em série. Quatro etapas de seleção para os isolados de Roraima, três para os isolados de São Paulo e três para os isolados do Pará foram realizadas em casa-de-vegetação para que houvesse uma confirmação da capacidade antagônica desses isolados. A severidade da doença variou entre 1,1% e 15,3% para os isolados originados de Roraima, 1,15% a 27,5 % para os isolados de São Paulo e 1,5% a 36,4% para os isolados do Pará. Foram selecionados os residentes de filoplano RR-43; RR-29; RR-133; RR-98 e RR-14, oriundos de Roraima e SP-11; SP-18; SP-22; SP-48 e SP-28, oriundo de São Paulo devido terem apresentado baixos níveis de severidade da doença 2,3; 2,8; 2,9; 3,5; 3,6; 3,2; 3,25; 3,55; 4,25 e 6,25%, respectivamente. Não houve nenhum antagonista detectado como promissor proveniente do Pará. Foram selecionados os isolados RR-43; RR-29; RR-133; RR-98; RR-14 SP-11; SP-18; SP-22; SP-48 e SP-28, para os ensaios *in vitro*.

Palavras-chave: controle biológico. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. seleção massal. *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

4.2 ABSTRACT

The mass selection *in vivo* is a step of great importance that there be no targeting of biological control mechanisms involved, but only about the efficacy of the biocontrol agent. The objective of this work was to select residents phylloplane bacteria passion fruit as possible biocontrol agent of bacterial spot which is the causal agent *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. 224 isolates were obtained from healthy leaves of yellow passion fruit collected from commercial orchards, and 102 from the state of Roraima, 72 from Pará and 50 from São Paulo. The isolation was done using a half of definitive leave soaked in sterile saline (0.85% NaCl) with 0,3% Tween 80 and maintained in a shaker for 20 minutes, followed by serial dilutions and seeding in Petri dishes containing culture medium 523. Four steps to select for isolates of Roraima, three for isolates from São Paulo and three isolates from Pará were conducted in greenhouse so there would be a confirmation of the antagonistic efficacy of these isolates. Disease severity ranged between 1,1% and 15,3% for isolates from Roraima, 1,15% to 27,5% for isolates from São Paulo and 1,5% to 36,4% for isolates Pará were selected residents phylloplane RR-43, RR-29, RR-133, RR-98 and RR-14, derived from Roraima and SP-11, SP-18, SP-22, SP-48 and SP-28, coming from São Paulo because they presented low levels of disease severity 2,3; 2,8; 2,9; 3,5; 3,6; 3,2; 3,25; 3,55; 4,25 and 6.25%, respectively. There was no antagonist detected from Pará. Were selected isolates RR-43, RR-29, RR-133, RR-98, RR-14 SP-11, SP-18, SP-22, SP-48 and SP-28, for *in vitro* assays.

Key words: biological control. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. mass selection. *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

4.3 INTRODUÇÃO

O termo filoplano postulado por Last; Deighton (1965), considera a superfície foliar, já o termo filosfera, adotado por Last (1955) em analogia à rizosfera, é o ambiente sob influência da superfície das folhas. A população microbiana residente desse habitat é complexa em sua constituição e diversidade de eventos (KINKEL et al., 1996; KINKLE, 1997). Apesar das condições muitas vezes adversas, o filoplano constitui um habitat natural comum para diversos microrganismos e muitos deles podem apresentar, potencialidade como agentes de controle biológico de enfermidades (BAKER; COOK, 1974; BLAKEMAN; FOKKEMA, 1982), ou serem indiferentes, apenas residindo no filoplano. Contudo a utilização de bactérias de filoplano no controle biológico de doenças de planta tem sido estudada nos últimos anos (ROMEIRO; GARCIA, 2007), tendo em vista que estas possuem diferentes mecanismos que podem atuar no biocontrole, via antagonismo, antibiose, parasitismo, competição e indução de resistência (GERHARDSON, 2002).

Na busca por bactérias de filoplano com potencial para o biocontrole, é necessário à realização de prospecção e estudos sobre suas potencialidades (ROMEIRO, 2007).

Halfeld-Vieira et al. (2003), compararam os resultados de 10 isolados previamente selecionados como potenciais agente de biocontrole contra *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em condições de casa-de-vegetação com os teste e antibiose *in vitro* para se determinar se este atributo seria adequado como critério de seleção de antagonistas e concluíram que, se os testes de antibiose *in vitro* realizados fossem utilizados como critério de seleção, a maioria dos isolados mais eficientes teriam sido descartados.

Desta forma, a seleção massal de residentes de filoplano corresponde a uma etapa de grande importância para que não haja o direcionamento do processo pelos mecanismos envolvidos, mas sim pela eficácia do agente de biocontrole.

Portanto, este trabalho objetivou selecionar bactérias isoladas de filoplano do maracujazeiro para o biocontrole da mancha-bacteriana, em condições de casa-de - vegetação, a partir de isolados bacterianos obtidos nos estados de Roraima, São Paulo e Pará.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Isolamento das Bactérias de Filoplano do Maracujazeiro

Folhas de maracujazeiro foram coletadas nos Municípios de Jaguariúna (SP), Castanhal e São Francisco do Pará (PA) e Alto Alegre, Boa Vista, Bonfim e São João da Baliza (RR). Durante a coleta, deu-se preferência as folhas retiradas de plantas onde não foram utilizados defensivos químicos para se ter uma variabilidade de bactérias isoladas, com o objetivo de aumentar a possibilidade de encontrar antagonistas promissores. As folhas foram acondicionadas em sacos de papel e identificadas de acordo com a localidade na qual as folhas foram retiradas.

As amostras foram processadas nos laboratórios de fitopatologia da Embrapa Meio Ambiente, Embrapa Amazônia Oriental e Embrapa Roraima, em que cada qual procedeu aos ensaios *in vivo*, descritos a seguir.

Os isolados das bactérias candidatas a antagonistas foram obtidos da seguinte forma. Metade de uma folha composta e sadia de maracujá foi depositada em Erlenmeyer de 250 ml de capacidade, contendo 100 ml de solução salina (0,85% NaCl) estéril com 0,3% de Tween 80, sendo a solução agitada por 20 minutos no Shaker. Para cada extrato, uma diluição seriada foi realizada até 10^{-3} , sendo depositados 100 μ L das amostras obtidas em cada diluição, em placas de Petri contendo meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) espalhando-se com alça de Drigalski sobre a superfície para o semeio e, posteriormente, as placas foram mantidas em incubadora BOD a 27 °C por 4 dias (HALFELD-VIEIRA et al., 2004).

Em seguida colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio, contendo meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970), coletando-se, preferencialmente, colônias com características morfológicas e culturais diferentes (HALFELD-VIEIRA et al., 2004).

Os isolados de *X. a. pv. passiflorae* utilizados nos ensaios foram obtidos nos Estados em que cada instituição está localizada sendo, portanto, cada grupo de antagonistas obtidos testado contra um isolado de *X. a. pv. passiflorae* oriundo do mesmo Estado.

4.4.2 Seleção Massal das Bactérias com Capacidade de Biocontrole *in vivo*

Plantas de maracujazeiro, oriundas de sementes extraídas de um só fruto, com 50 dias após a emergência (DAE) foram cultivadas em vasos de 1000 mL de capacidade, mantidas em casa de vegetação.

Para o preparo da suspensão dos antagonistas, colônias foram semeadas, espalhadas, em meio 523 sólido (KADO; HESKETT, 1970) e incubadas por 72h a 27 °C. Como tratamento controle negativo, utilizou-se oxiclreto de cobre a 3,5ml/L e sulfato de estreptomicina a 0,1 g/L e a testemunha foi constituída por plantas pulverizadas somente com água.

Cada planta foi colonizada com um isolado candidato a antagonista por pulverização, com uma suspensão ajustada em absorbância a $A_{540}=0,3$.

Após quatro dias da colonização, as plantas foram inoculadas com uma suspensão de células de *X. a. pv. passiflorae* ajustada em absorbância a $A_{540}= 0,15$, levando-se para câmara úmida por 24 h a 27 °C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Quatorze dias após a inoculação, quando, os sintomas estavam evidentes, as plantas tiveram a severidade da doença avaliada, utilizando-se o programa Assess 2.0 (LAMARI, 2008).

A seleção massal dos residentes de filoplano de maracujazeiro oriundos de Roraima foi dividida em quatro etapas:

A primeira etapa foi realizada, com 51 isolados e três repetições.

A segunda etapa foi realizada com 51 isolados e três repetições.

A terceira etapa foi realizada com os selecionados das duas etapas anteriores que apresentaram até 4,0% de severidade da doença, com 6 repetições. A porcentagem da severidade foi analisada por meio do proc GLM do software SAS versão 9 e do teste de Tukey a 5% de significância.

A quarta etapa foi realizada com os cinco melhores isolados retirados na terceira etapa com 20 repetições. A porcentagem da severidade foi analisada por meio do proc GLM do software SAS versão 9 e do teste de Tukey a 5% de significância.

A seleção massal dos residentes de filoplano de maracujazeiro oriundos de São Paulo foi dividida em três etapas:

A primeira etapa foi realizada com 50 isolados e três repetições;

A segunda etapa foi realizada com todos os isolados que apresentaram até 6,9 % de severidade da doença, selecionados da etapa anterior, com três repetições.

A terceira etapa foi realizada com cinco dos isolados que novamente apresentaram melhor desempenho na segunda etapa de seleção, com 20 repetições. A porcentagem da severidade da doença foi analisada por meio do proc GLM do software SAS versão 9 e do teste de Tukey a 5% de significância.

A seleção massal dos residentes de filoplano de maracujazeiro oriundos de Pará foi dividida em três etapas:

A primeira etapa foi realizada com 72 isolados e três repetições;

A segunda etapa foi realizada com os isolados que promoveram uma menor severidade da doença na etapa anterior com três repetições;

A terceira etapa foi realizada com os quatro melhores isolados das duas etapas anteriores, com 18 repetições. A porcentagem da severidade foi analisada por meio do proc GLM do software SAS versão 9 e do teste de Tukey a 5% de significância.

4.5 RESULTADOS

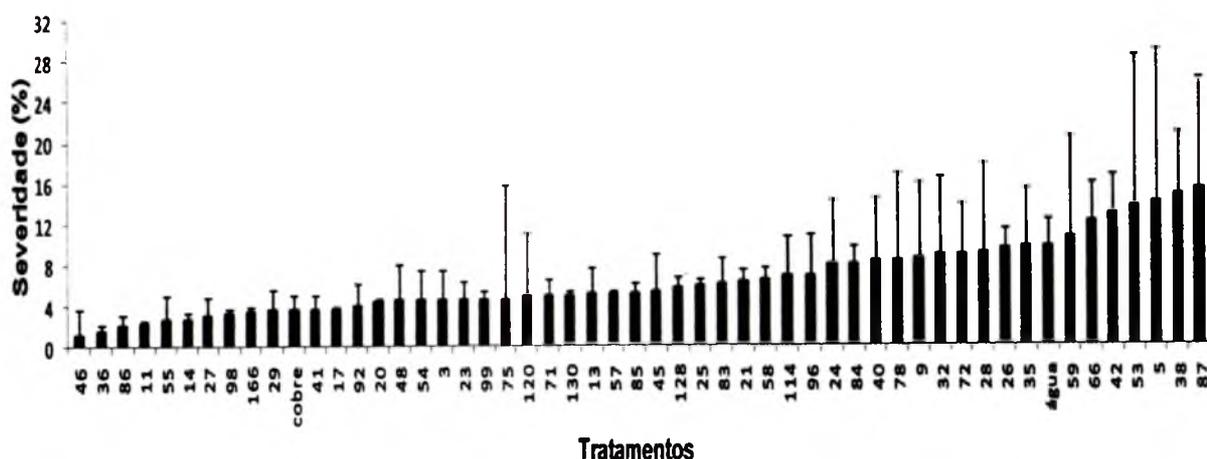
4.5.1 Isolamento das Bactérias de Filoplano do Maracujazeiro

Foram obtidos 102 residentes de filoplano de Roraima, 50 de São Paulo e 72 do Pará. As culturas, posteriormente, foram armazenadas nos laboratórios de fitopatologia da Embrapa Roraima, Embrapa Meio Ambiente e Embrapa Amazônia Oriental, respectivamente.

4.5.2 Seleção Massal das Bactérias com Capacidade de Biocontrole *in vivo*

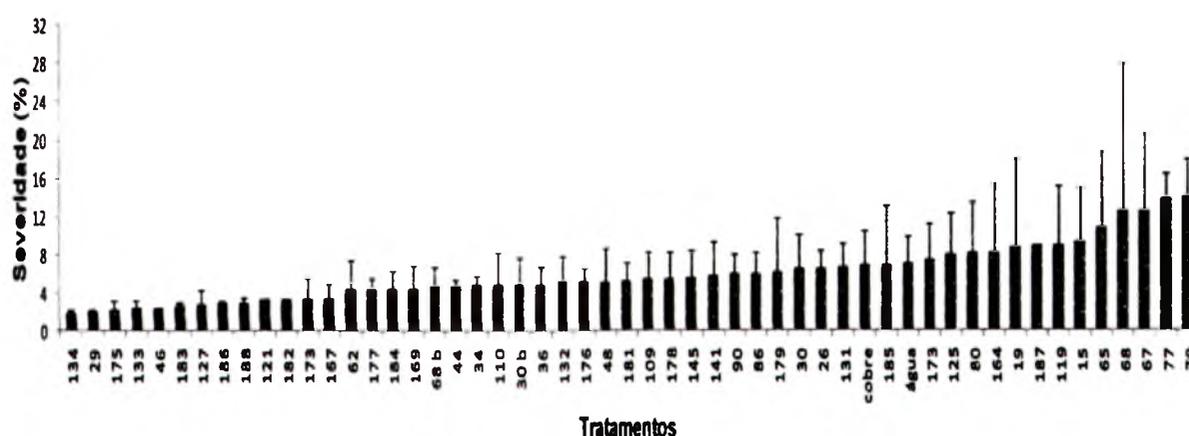
Na primeira etapa de seleção, a severidade máxima encontrada no experimento de biocontrole da mancha-bacteriana para os residentes de filoplano obtidos em Roraima foi de 15,3% e a mínima de 1,1%. Os isolados 36; 86; 11; 55; 14; 27; 98; 166; 29; 41; 17; 92 e 20 em um total de 14 foram os que apresentaram maior eficiência no biocontrole da doença, até o nível de 4% de severidade (Figura 1).

Figura 1 - Severidades e erro padrão da mancha-bacteriana do maracujazeiro na primeira etapa da seleção massal *in vivo* com folhas tratadas com cobre (controle negativo), água (controle positivo) e com 51 residentes de filoplano do maracujazeiro, oriundos de Roraima.



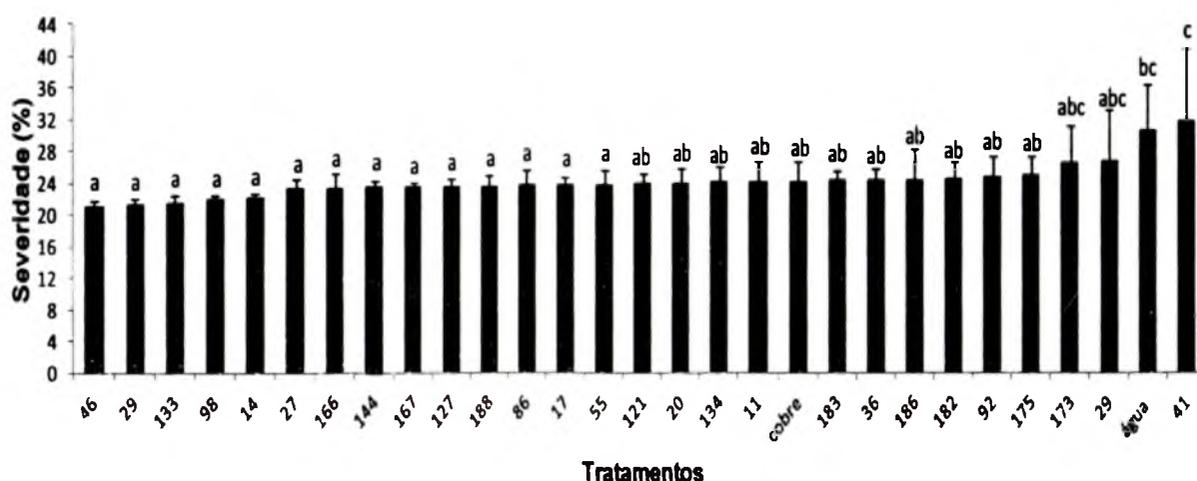
Na segunda etapa de seleção, a severidade máxima encontrada no experimento de biocontrole da mancha-bacteriana para os residentes de filoplano obtidos em Roraima foi de 14,0% e a mínima de 1,7%. Os isolados que apresentaram até 4% de severidade da doença foram, 134; 29; 175; 133; 46; 183; 127; 186; 188; 121; 182; 173; 167, totalizando 13 isolados (Figura 2).

Figura 2 - Severidades e erro padrão da mancha-bacteriana do maracujazeiro na segunda etapa da seleção massal *in vivo* com folhas tratadas com cobre (controle negativo), água (controle positivo) e com 51 residentes de filoplano do maracujazeiro, oriundos de Roraima.



Na terceira etapa de seleção massal, foram utilizados os 27 residentes de filoplano selecionados nas duas etapas anteriores (46; 29; 133; 98; 14; 27; 166; 144; 167; 127; 188; 86; 17; 55; 121; 20; 134; 11; 183; 36; 186; 182; 92; 175; 173; 29 e 41) que se destacaram por terem apresentado características de biocontrole com até 4% de severidade da doença. Houve diferença estatística com 5% de significância, entre os tratamentos utilizados, porém foram selecionados apenas os residentes de filoplano, 46; 29; 133; 98 e 14 que apresentaram 1,05; 1,08; 1,34; 1,88 e 2,10% de severidade da doença, respectivamente (Figura 3).

Figura 3 - Severidades e erro padrão da mancha-bacteriana do maracujazeiro na terceira etapa da seleção massal *in vivo* com folhas tratadas com cobre (controle negativo), água (controle positivo) e com 27 residentes de filoplano do maracujazeiro, selecionados na primeira e segunda etapa de seleção, oriundos de Roraima. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% (Dados transformados para severidade + 20).



Com o objetivo de confirmar o potencial antagônico dos residentes de filoplano, foram selecionados para quarta etapa de seleção os melhores isolados da terceira etapa que apresentaram até 2,1% de severidade da doença. Ocorreu diferença estatística com 5% de significância entre os tratamentos utilizados (Figura 4). Onde os residentes de filoplano, 43; 29; 133; 98 e 14 (Figura 5) apresentaram 2,3; 2,8; 2,9; 3,5; e 3,6% de severidade da doença, valores próximos do tratamento com cobre 1,2% e diferindo do tratamento com água que apresentou 9,5% de severidade. Portanto, caracterizando o biocontrole e sendo esses os selecionados para os ensaios *in vitro*.

Figura 4 - Severidades e erro padrão da mancha-bacteriana do maracujazeiro da quarta etapa da seleção massal *in vivo* com folhas tratadas com cobre (controle negativo), água (controle positivo) e com 5 residentes de filoplano do maracujazeiro, selecionados na terceira etapa de seleção, oriundos de Roraima. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% (Dados transformados para severidade + 20).

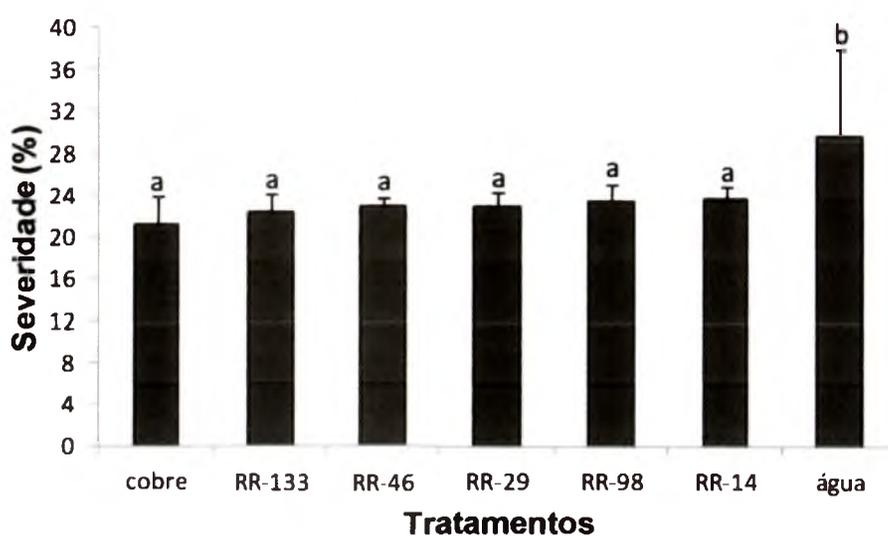
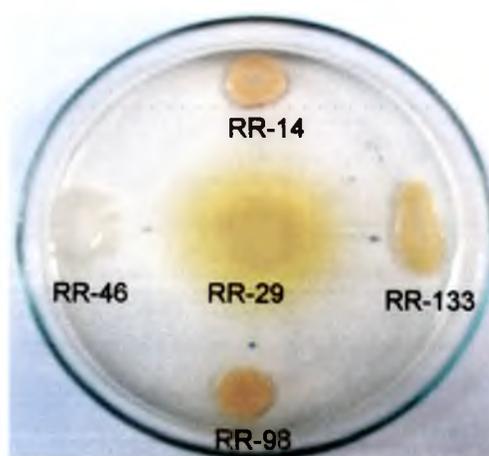
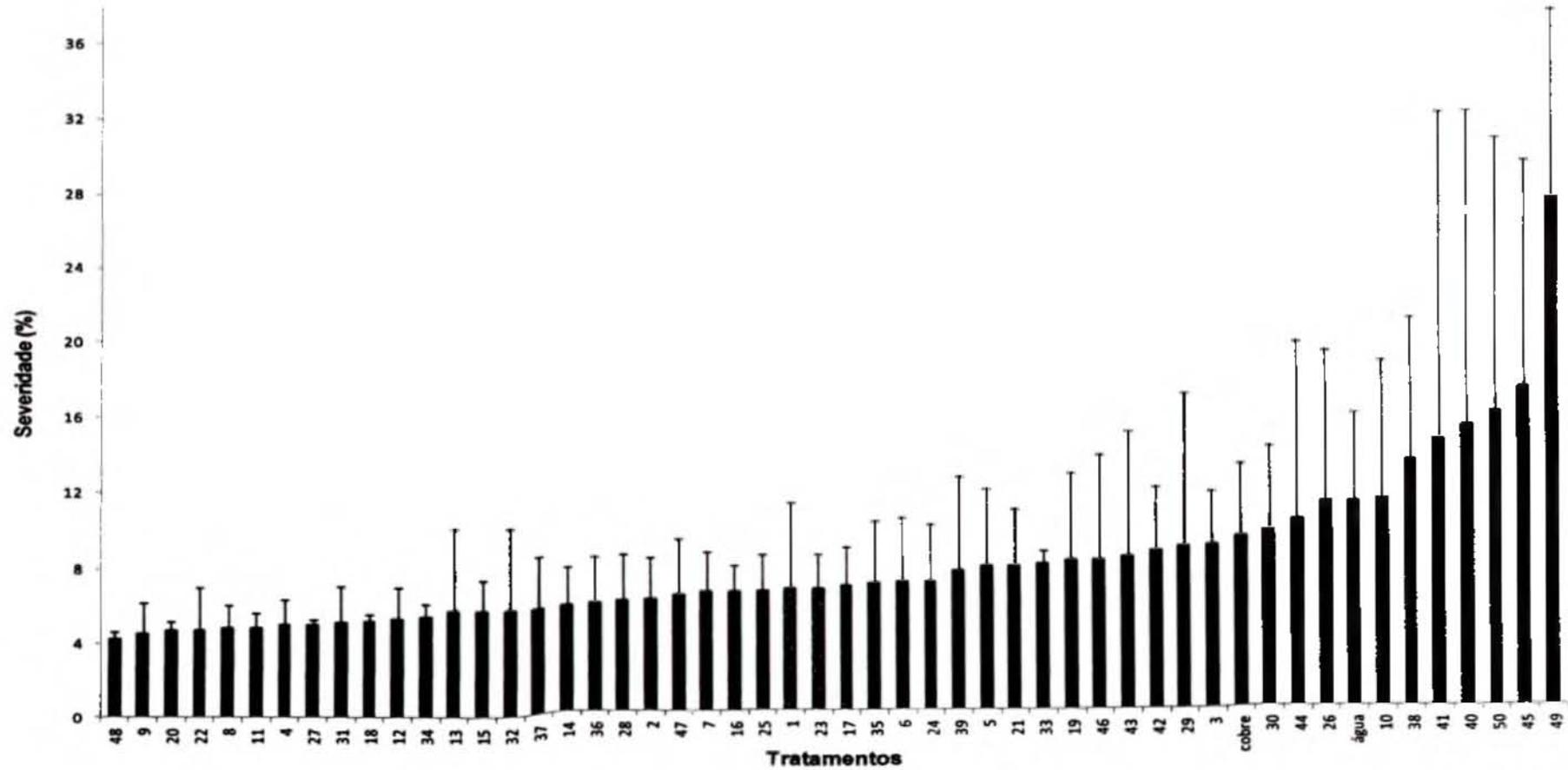


Figura 5 - Isolados RR-14, RR-29, RR-46, RR-98 e RR-113, residentes de filoplano de maracujazeiro selecionados, oriundos de Roraima.



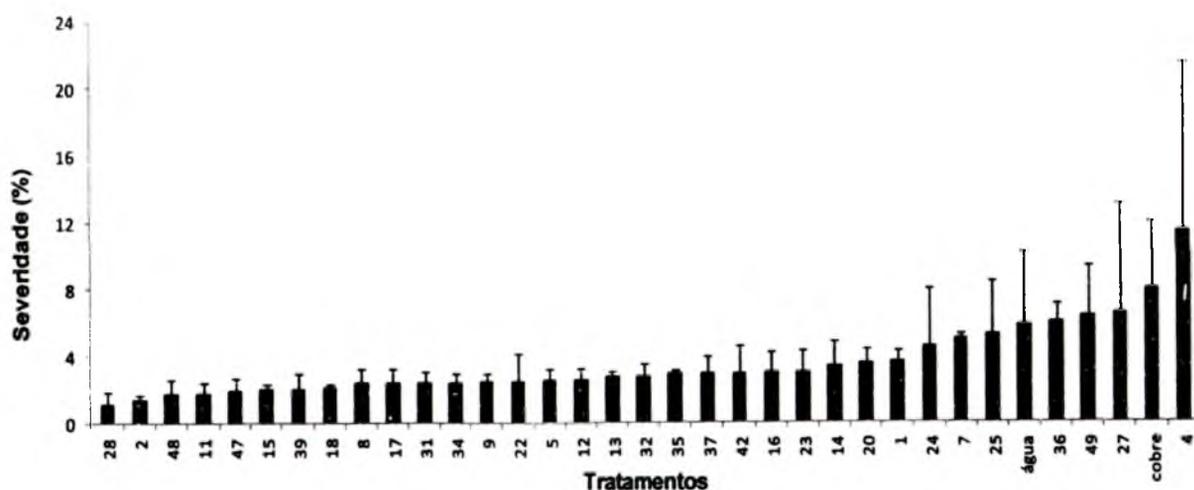
Para os residentes de filoplano oriundo de São Paulo na primeira etapa, a severidade máxima encontrada no experimento de biocontrole da mancha bacteriana do maracujazeiro foi de 27,5 e a mínima de 4,2%. Os antagonistas que apresentaram até 6,9% de severidade da doença foram selecionados (48; 9; 20; 22; 8; 11; 4; 27; 31; 18; 12; 34; 13; 15; 32; 37; 14; 36; 28; 2; 47; 7; 16; 25; 1; 23; 17; 35; 6; 24; 39; 5 e 21), totalizando 33 isolados (Figura 6).

Figura 6 - Severidades e erro padrão da mancha-bacteriana do maracujazeiro da primeira etapa da seleção massal *in vivo* com folhas tratadas com cobre (controle negativo), água (controle positivo) e com 50 residentes de floplano do maracujazeiro, oriundos de São Paulo.



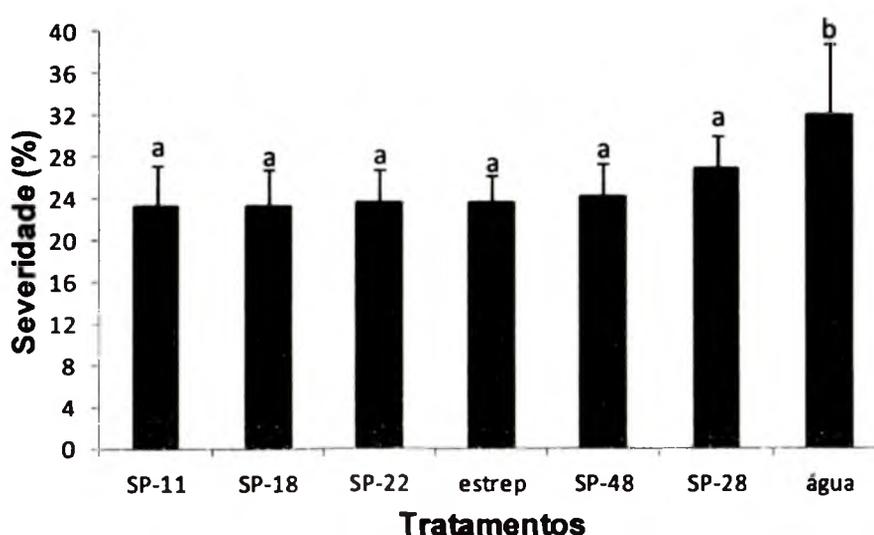
Na segunda etapa de seleção, a severidade máxima encontrada no experimento de biocontrole da mancha-bacteriana para os residentes de filoplano de São Paulo foi de 11,53% e a mínima de 1,1%. Dos 33 antagonistas selecionados na primeira etapa de seleção apenas cinco repetiram o bom desempenho na segunda etapa, que foram os isolados 22, 48, 11, 28 e 18, que apresentaram baixos níveis de severidade da doença, 1,1; 1,7; 1,8; 2 e 4% (Figura 7), o que os habilitou para terceira etapa da seleção.

Figura 7 - Severidades e erro padrão da mancha-bacteriana do maracujazeiro da segunda etapa da seleção massal *in vivo* com folhas tratadas com cobre (controle negativo), água (controle positivo) e com 33 residentes de filoplano do maracujazeiro selecionados na primeira etapa, oriundos de São Paulo.



Na terceira etapa da seleção, objetivo-se confirmar o potencial antagonístico dos cinco residentes de filoplano que foram selecionados na segunda etapa (Figura 8).

Figura 8 - Severidade e erro padrão da mancha-bacteriana do maracujazeiro da terceira etapa da seleção massal *in vivo* com folhas tratadas com sulfato de estreptomicina (controle negativo), água (controle positivo) e com 5 residentes de filoplano do maracujazeiro, selecionados na segunda etapa de seleção, oriundos de São Paulo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% (Dados transformados para severidade + 20).



Os tratamentos com os residentes de filoplano foram capazes de controlar a doença, deixando-a em níveis semelhantes ao do tratamento controle (sulfato de estreptomicina). Os antagonistas 11; 18; 22; 48 e 28 (Figura 8) apresentaram as seguintes severidades médias: 3,2; 3,25; 3,55; 4,25 e 6,25%, respectivamente, diferindo estatisticamente com 5% de significância do tratamento com água. Portanto, caracterizando o biocontrole e sendo esses os selecionados para os ensaios *in vitro*.

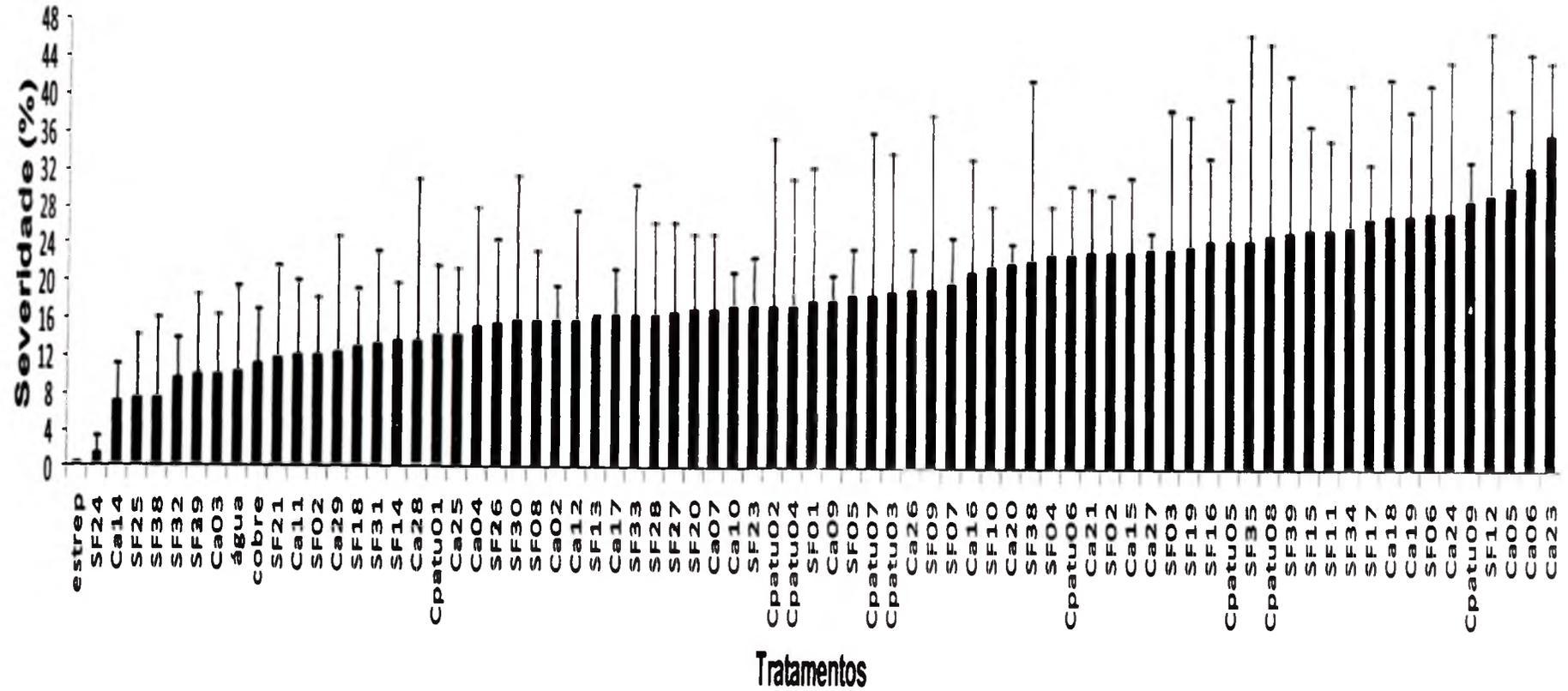
Figura 9 - Isolados SP-11, SP-18, SP-22, SP-28 e SP-48, residentes de filoplano de maracujazeiro selecionados, oriundos de São Paulo.



Na primeira etapa de seleção dos residentes de filoplano do maracujazeiro oriundos do Pará, a severidade máxima encontrada foi de 36,04% e a mínima de 1,5%. Para confirmação, numa segunda etapa, foi realizada uma re-testagem, somente com 69 isolados dos 72, eliminando os três que ocasionaram maior severidade (Figura 10).

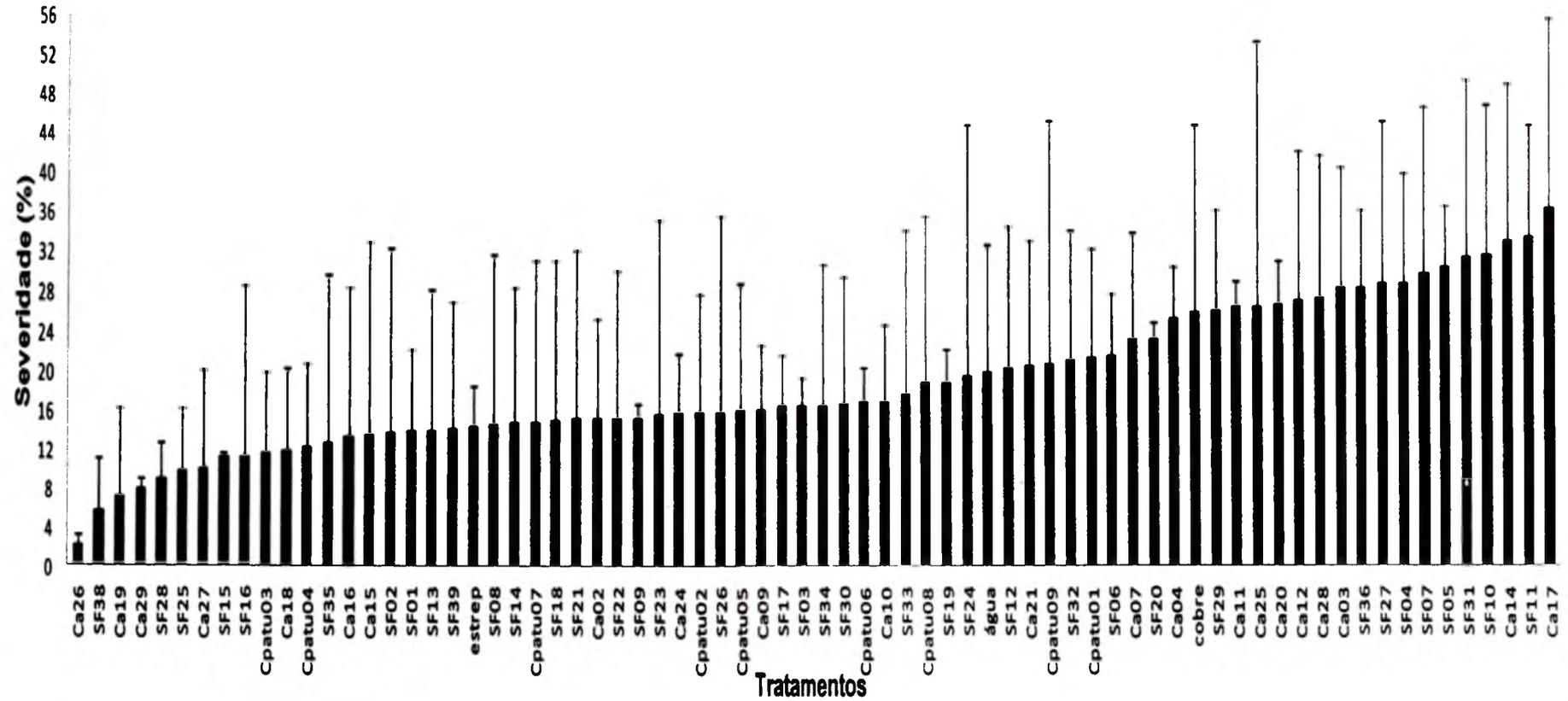
Foram selecionados os isolados: SF24, Ca14, SF25, SF38, SF32, SF29, Ca03, SF21, Ca11, SF02, Ca29, SF18, SF31, SF14, Ca28, Cpatu01, Ca25, Ca04, SF26, SF30, SF08, Ca02, Ca12, SF13, Ca17, SF33, SF28, SF27, SF20, Ca07, Ca10, SF23, Cpatu02, Cpatu04, SF01, Ca09, SF05, Cpatu07, Cpatu03, Ca26, SF09, SF07, Ca16, SF10, Ca20, SF38, SF04, Cpatu06, Ca21, SF02, Ca15, Ca27, SF03, SF19, SF16, Cpatu05, SF35, Cpatu08, SF39, SF15, SF11, SF34, SF17, Ca18, Ca19, SF06, Ca24, Cpatu09, SF12.

Figura 10 - Severidades e erro padrão da mancha-bacteriana do maracujazeiro da primeira etapa da seleção massal *in vivo* com folhas tratadas com sulfato de estreptomicina, cobre (controle negativo), água (controle positivo) e com 72 residentes de filoplano do maracujazeiro, oriundos do Pará.



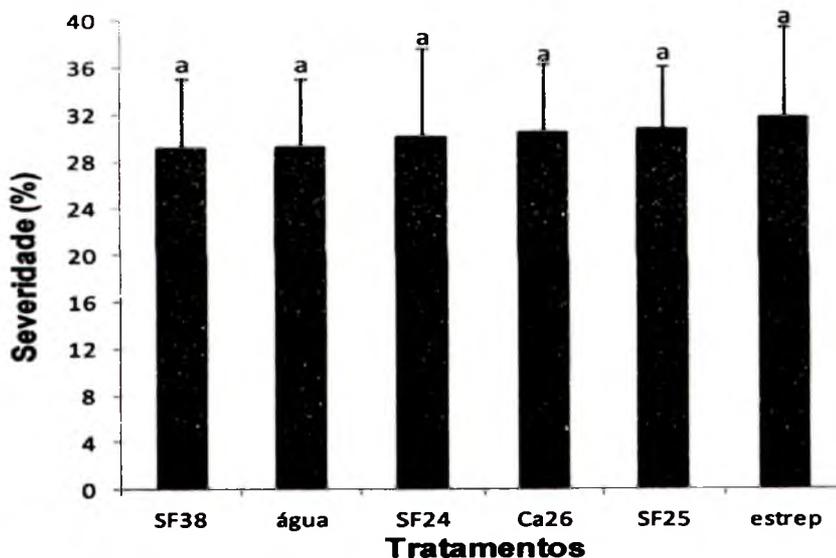
Na segunda etapa de seleção, a severidade máxima encontrada no experimento de biocontrole da mancha-bacteriana para os residentes de filoplano do Pará foi de 36,4% e a mínima de 2,2% (Figura 11). Foram escolhidos para terceira etapa apenas os isolados SF-24 e Ca-26 que foram os melhores da primeira e da segunda etapa respectivamente com 1,5% e 2,2% e os isolados SF-25 e SF-38 devido estarem entre os dez isolados com mais baixa severidade, tanto na primeira como na segunda etapa, com porcentagem da severidade da doença média de 7,3; 9,8% e 7,4; 5,6%, respectivamente. Estes isolados, portanto, foram utilizados na terceira etapa de confirmação de resultados.

Figura 11 - Severidades e erro padrão da mancha-bacteriana do maracujazeiro da segunda etapa da seleção massal *in vivo* com folhas tratadas com sulfato de estreptomicina, cobre (controle negativo), água (controle positivo) e com 69 residentes de filoplano do maracujazeiro selecionados na primeira etapa de seleção, oriundos do Pará.



Na terceira etapa, os isolados selecionados não demonstraram capacidade de biocontrole da mancha-bacteriana, o que foi evidenciado por não haver diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha (Figura 12).

Figura 12 - Severidades e erro padrão da mancha-bacteriana do maracujazeiro da terceira etapa da seleção massal *in vivo* com folhas tratadas com sulfato de estreptomicina, água e com 4 residentes de filoplano do maracujazeiro selecionados na segunda etapa de seleção, oriundos de Pará. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% (dados transformados para severidade + 20).



Os isolados SF-38, SF-24, Ca-26 e SF-25, não diferiram estatisticamente dos demais tratamentos com sulfato de estreptomicina (11,9%) e água (9,1%), devido à alta porcentagem de severidade demonstrada, 9,1; 10,1; 10,6 e 10,8%, respectivamente. Diante desses resultados nenhum isolado foi selecionado para os ensaios *in vitro*.

4.6 DISCUSSÃO

Com base nos resultados apresentados, foi possível observar que, apesar das bactérias fazerem parte do grupo de microrganismos que se encontram em maior diversidade e quantidade na superfície foliar (LINDOW; LEVEAU, 2002), somente uma pequena parcela destes microrganismos possuem características de biocontrole de doenças.

Por outro lado, é importante levar em consideração a agressividade dos isolados fitopatogênicos, já que os mesmos são oriundos de localidades distintas e podem apresentar variabilidade genética (NAKATANI et al., 2009).

No ensaio de seleção massal com os 224 residentes de filoplano, apenas 10 isolados (4,4%) foram selecionados como agentes de biocontrole da mancha bacteriana do maracujazeiro, sendo cinco de Roraima (RR-14, RR-29, RR-46, RR-98 e RR-133) e cinco de São Paulo (SP-11, SP-18, SP-22, SP-28 e SP-38). Não foi selecionado nenhum isolado do Pará, pois nenhum isolado demonstrou ter potencial para o biocontrole da doença.

Outros trabalhos de sucesso na seleção massal de agentes de controle biológico podem ser citados.

Van Toor et al. (2005) destacaram a obtenção de bactérias residentes do filoplano ou endofíticas em proporções de 1 a 5% do total avaliado. No presente estudo, a proporção foi maior do que a obtida por Halfeld-Vieira (2004), que selecionou apenas 2% dos residentes de filoplano do tomateiro. Vieira Júnior (2005), utilizando métodos de isolamento padronizados, selecionou aproximadamente 2% isolados da parte aérea de feijoeiro e Rollembeg (2008) que selecionou 4,22% de residentes de macieira. Porém, foi abaixo dos selecionados por Ocampos (2010) que selecionou 6% dos residentes de filoplano da couve.

Apesar dos ensaios de seleção massal terem sido conduzido em casa de vegetação, os coeficientes de variação foram elevados, e a explicação para esse fato foi a ocorrência de variações da severidade nas plantas dentro do mesmo tratamento, devido o filoplano ser um ambiente que dificulta o estabelecimento de populações com a finalidade de controle biológico (ROMEIRO, 2007).

Porém a busca de microrganismo para o controle biológico se baseia, na possível alternativa para o manejo da mancha bacteriana já que esse método reduz os riscos de dano ambiental que é exercido quando se utiliza o controle químico.

O biocontrole dos residentes de filoplanos selecionados contra a mancha bacteriana foi superior quando comparado com o tratamento água e significativo, quando comparado com o tratamento químico (controle). Porém, em se tratando de estratégias de controle de bacterioses, não só do maracujazeiro, como para outras culturas, não existem produtos químicos totalmente eficientes (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 1998; ROMEIRO, 2001; QUEZADO-DUVAL et al., 2003; KUHN et al., 2006; TERUMI ITAKO et al., 2012).

4.7 CONCLUSÕES

Para o biocontrole da mancha-bacteriana do maracujazeiro, foram selecionados os residentes de filoplano RR-14; RR-29; RR-98; RR-43; e RR-133 oriundos de Roraima.

Foram selecionados os residentes de filoplano SP-11; SP-18; SP-22; SP-28 e SP-48, oriundos de São Paulo.

Os residentes de filoplano provenientes do Pará, não foram eficientes no biocontrole da doença.

5. CAPÍTULO 2: MECANISMOS DE BIOCONTROLE DA MANCHA-BACTERIANA DO MARACUJAZEIRO MEDIADOS POR BACTÉRIAS DO FILOPLANO

5.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos de biocontrole da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (*Xap*) originadas dos estados de Roraima (*Xap*-RR), São Paulo (*Xap*-SP) e Pará (*Xap*-PA). Foram utilizadas dez bactérias residentes de filoplano de maracujazeiro, sendo cinco antagonistas oriundos do estado de Roraima (RR-14, RR-29, RR-46, RR-98, RR-133) e cinco provenientes de São Paulo (SP-11, SP-18, SP-22, SP-28 e SP-48). Foram submetidos a ensaios com fontes únicas de carbono para verificação de sobreposição de nicho, antibiose por difusão em meio de cultura, produção de sideróforos e influencia na atividade da enzima peroxidase na planta. Os resultados demonstraram que os isolados RR-98 e RR-113 foram capazes de competir por nicho somente contra *Xap*-RR através da sobreposição de nicho. Na antibiose, por difusão em meio de cultura o isolado RR-29, foi capaz de controlar três isolados de *Xap*, provenientes de RR, SP, PA e o isolado SP-28 controlou apenas as duas últimas. A produção de sideróforos foi observada somente pelos isolados RR-29 e SP-28. Nenhum antagonista foi capaz de influenciar no aumento da atividade da peroxidase nas plantas, o que indica que nenhum deles induziu resistência no maracujazeiro. A incapacidade de se destacar como os demais antagonistas atuam no controle da doença reforça a tese de que a seleção baseada em teste *in vitro* pode promover o descarte de antagonistas eficientes.

Palavras-chave: antibiose. fontes de carbono. indução de resistência. peroxidase. sideróforos.

5.3 INTRODUÇÃO

A caracterização de agentes de biocontrole para elucidar o modo de antagonismo exercido é primordial para uma melhor compreensão de como é exercido o controle biológico e para o desenvolvimento de produtos biológicos (ANDREWS, 1992; BARRA, et al., 2008). Apesar de nem todos os mecanismos de ação de residentes do filoplano serem elucidados, existem evidências de atuarem, por competição, pela produção e liberação de substâncias antimicrobianas ou por induzirem resistência no hospedeiro (BAKER; COOK, 1974; HALFELD-VIEIRA, 2006b; ROMEIRO, 2007 apud, OCAMPOS, 2010).

Embora seja um mecanismo amplamente reportado para rizobactérias (ARAUJO, et al., 2009; BERNARDES et al., 2010; MÜLLER, et al., 2011), a indução de resistência a partir de bactérias, na parte aérea de plantas, já foi relatada como mediada por bactérias autóctones capazes de desencadear este processo (BARGABUS et al., 2002; HALFELD-VIEIRA, 2005; HALFELD-VIEIRA et al., 2006a). No controle de doenças bacterianas, a atividade da enzima peroxidase é um dos mais comuns componentes de resposta inicial da defesa de plantas (TUZUN, 2001; ANDRADE et al., 2013), isso ocorre porque a peroxidase junto com outra enzima a polifeloxidase, são responsáveis pela degradação oxidativa de compostos fenólicos próximos ao local da descompartimentalização celular provocada por patógenos (BARROS et al., 2010). Entretanto, para algumas bactérias que colonizam a parte aérea de plantas, o mais comum é o envolvimento de algumas moléculas que inibem o desenvolvimento do patógeno sendo, a antibiose, o mecanismo envolvido.

Um exemplo que podemos citar é o trabalho realizado com um isolado selecionado de *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* produtor de fenazinas que são substâncias que apresentam atividade antibiótica (SPAEPEN et al., 2009), em que se mostrou que, após três meses da colonização das plantas esta bactéria foi capaz de ser detectada em baixa população, com cerca de $8,1 \text{ ufc.g}^{-1}$ de amostras de tecido do caule (RAIO et al., 2011). Apesar de pequena a população estabelecida, os autores verificaram que a capacidade de biocontrole de doenças fúngicas foi mantida, inferindo-se que a concentração de fenazinas produzidas pela população do antagonista, foi suficiente para exercer o controle. MELHORAR

Em relação a enfermidades de etiologia bacteriana, a antibiose também vem sendo reportada como um mecanismo importante em outros patossistemas.

Podemos citar o trabalho de Oliveira et al., (2011) onde este mecanismo foi considerado responsável pelo controle biológico do cancro-cítrico por um isolado de *Pseudomonas sp.*

Em outra situação, Lanna Filho et al., (2010) verificaram que dois isolados de *Paenibacillus macerans* e *Bacillus pumilus*, residentes de filoplano de tomateiro foram capazes de reduzir a severidade da mancha-bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) e da pinta-preta (*Alternaria solani*), por antibiose.

Outro mecanismo que pode explicar a capacidade de antagonismo de um agente de controle é a competição por nutrientes. Neste contexto, a competição por ferro é o principal fator estudado, bem como a utilização de fontes de carbono (PELZER et al., 2011).

A utilização de fontes de carbono em comum permite que se verifique qual a capacidade de sobreposição de nicho entre patógeno e agente de biocontrole e é determinada pelo número de fontes de carbono utilizadas em comum pelo antagonista e pelo patógeno (CAVAGLIERI et al., 2004). Esses exemplos citados ilustram as diferentes estratégias que envolvem a prospecção de agentes de biocontrole e do seu potencial de inserção dentro do manejo integrado de doenças.

Porém, a seleção baseada em ensaios *in vivo* permite que não haja o direcionamento do processo pelos mecanismos envolvidos, mas sim pela eficácia do agente de biocontrole.

Por isso, a investigação dos mecanismos de controle é realizada como uma etapa posterior ao processo de seleção, conforme descrito no capítulo 1. Neste capítulo procuramos determinar quais mecanismos explicam a capacidade de controle de bactérias do filoplano selecionadas para o controle biológico da mancha-bacteriana do maracujazeiro.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Capacidade de Metabolizar Diferentes Fontes de Carbono

Para avaliar a capacidade da utilização de diferentes fontes de carbono dos antagonistas e das bactérias fitopatogênicas. Foi usado o kit Biolog[®] GN2 para bactérias Gram-negativas, que é constituído por uma microplaca contendo 95 fontes distintas de carbono, em que o cloreto de trifetil tetrazólio promove a mudança de coloração se houver crescimento bacteriano na cavidade. Foram preparadas suspensões de cada bactéria do filoplano oriundas de Roraima e São Paulo em solução salina estéril (0,85% de NaCl), após 72 h de crescimento à 30 °C em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), ajustando-se a concentração à $Abs_{540} = 0,120$, seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, foram adicionados 150 μ L da suspensão bacteriana em cada cavidade, com auxílio de um pipetador multicanal, sendo cada placa utilizada para uma única bactéria. Em seguida, as placas foram mantidas a 25 °C em BOD, com fotoperíodo de 12 h durante 3 dias, em seguida avaliados o crescimento bacteriano por meio de leitora de microplacas ELISA, no comprimento de onda de 492 nm. A absorbância registrada na cavidade com ausência de fontes de carbono foi usada como controle negativo (PELZER et al., 2011).

A determinação do número de fontes de carbono utilizadas em comum pelo antagonista e pelo patógeno (CAVAGLIERE et al., 2004) foi calculada pela equação.

$NOI = NFC \times NTFCP$, onde:

NOI: índice de sobreposição de nicho.

NCF: número de fontes de carbono utilizadas em comum pelo patógeno e antagonista.

NTFCP: número total de fontes de carbono utilizadas pelo patógeno.

Para $NOI > 0,9$ ambos os organismos apresentam competência para ocuparem o mesmo nicho e $NOI < 0,9$ representa a ocupação de nichos distintos.

5.4.2 Produção de Sideróforos

Para a detecção de sideróforos produzidos pelos isolados antagônicos, toda a vidraria utilizada foi previamente imersa em solução sulfocrômica por 48h e enxaguada várias vezes em água destilada. A metodologia utilizada foi baseada na descrita por Schwyn; Neilands (1987).

Para o preparo da solução de Cromo Azurol S (CAS), misturou-se 6 mL de solução de hexadecil-trimetilamônio (HDTMA) a 10 mM e 30 mL de água, em um balão volumétrico de 100 mL. Foram acrescentados, sob agitação, 1,5 mL de solução férrica ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM preparada em Ácido clorídrico - HCl 0,01N) e 7,5 mL de solução de cromo azurol S a 2 mM. Separadamente, foram dissolvidos 4,307 g de piperazina anidra em 20 mL de água ajustando o pH= 5,6 e em seguida foi adicionado 6,25 mL de 10 mM HCl. A solução resultante foi adicionada ao restante dos componentes anteriormente preparados, e completado o volume para 100 mL, com água destilada e autoclavada.

Os antagonistas foram cultivados, por 48 horas sob contínua agitação em Shaker, em meio líquido B de King (KING et al., 1954). Como controle negativo as bactérias, foram cultivadas no mesmo meio acrescido de $2 \mu\text{M}$ de $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{mL}^{-1}$ preparado a partir de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e esterilizado por autoclavagem.

Posteriormente, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 10.000 g por 20 min e adicionados 800 μL do sobrenadante a 800 μL da solução indicadora de CAS.

Como controle adicional, para comparação, foi verificado a coloração adquirida nos mesmos meios sem o cultivo de bactérias.

A constatação da produção de sideróforos pelas bactérias foi demonstrada pela mudança de coloração da mistura de azul para amarelo-alaranjado, em um período de até 15 minutos.

5.4.2.1 Detecção de Pioverdinas

Para a detecção de pigmentos fluorescentes (pioverdinas) produzidos pelos isolados antagônicos, os mesmos foram depositados em pontos distintos do meio B de King (KING et al., 1954), contido em placas de Petri de 9 cm, sendo posteriormente levados para BOD onde foram mantidos a 25 °C, com fotoperíodo

de 12 h durante 3 dias; em seguida, foram visualizados sob luz ultra-violeta a 375 nm.

5.4.3 Antibiose em Meio de Cultura

Para verificação da antibiose produzida pelos isolados antagônicos, células dos antagonistas foram cultivadas por 72 h em meio de cultura 523 e posteriormente foram semeadas com o auxílio da alça de repicagem em um ponto do meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970), vertidos em placas de Petri. Após quatro dias, foi pipetado 1 mL de clorofórmio no interior das placas de Petri, mantendo-se por um período de 2h, após esse período deixaram-se as placas abertas por 4 h para sua volatilização.

Uma sobrecamada de 15 mL do mesmo meio foi vertida, contendo 1 mL de suspensão de células de *X. a. pv. passiflorae* que foram cultivada por 48 h, sob contínua agitação em Shaker. Após cinco dias foram feitas as medições dos halos de inibição. Para verificação da amplitude da capacidade de inibição a diferentes isolados de *X. a. pv. passiflorae*, foram utilizados três isolados distintos, sendo dois oriundos de SP e RR e outro do estado do PA.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e 5 repetições, sendo os diâmetros dos halos de inibição foram analisados por meio do proc GLM do software SAS versão 9 e do teste de Tukey a 5% de significância.

5.4.4 Efeito das Bactérias do Filoplano na Atividade da Peroxidase em Plantas Maracujazeiro

Para quantificação da atividade da enzima peroxidase para inferir sobre a indução de resistência da planta ao patógeno, adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com os seguintes tratamentos: quatro plantas pulverizadas somente com água (controle absoluto), quatro plantas pulverizada com uma das bactérias antagonistas, quatro plantas pulverizada com uma das bactérias antagonistas e inoculadas com *X. a. pv. passiflorae* e quatro plantas pulverizadas com água e inoculadas com *X. a. pv. passiflorae*. Cada tratamento foi constituído por quatro repetições em que uma planta representou uma repetição. Sendo os últimos

dois tratamentos inoculados quatro dias após os tratamentos com antagonista ou água.

Sete dias após o início da observação de sintomas nas plantas inoculadas com a *X. a. pv. passiflorae*, folhas das plantas foram coletadas para preparação dos extratos a serem utilizados nos ensaios para determinação das concentrações de peroxidases (PO).

5.4.4.1 Obtenção dos Extratos

Para preparação dos extratos vegetais, triturou-se um grama de cada amostra de tecido vegetal em nitrogênio líquido, utilizando-se almofariz e pistilo, adicionando-se ao macerado uma solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, polivinilpirrolidona 1% (p/v) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM, na proporção de 5 mL do tampão de extração para cada grama de amostra. O preparado foi centrifugado a 20.000 g por 20 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados e mantidos em gelo durante os ensaios enzimáticos (BARACAT-PEREIRA et al., 2001).

5.4.4.2 Determinação da Atividade de Peroxidases (PO)

As atividades de peroxidases foram determinadas pelo método espectrofotométrico a 470 nm (HAMMERSCHMIDT et al., 1982) em que o guaiacol participa como doador de hidrogênio (HAMMERSCHMIDT et al., 1982; MARTINEZ et al., 1998), formando tetraguaiacol. Em um tubo de ensaio adicionou-se 400 µL de solução tampão fosfato a 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5), seguido de 400 µL de guaiacol a 15,0 mmol L⁻¹ e de 400 µL de peróxido de hidrogênio a 3 mmol L⁻¹. Após a homogeneização dessa solução, acrescentou-se 20 µL do sobrenadante dos extratos. A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 30°C, realizando-se leituras de absorbância em comprimento de onda de 470 nm, de 10 em 10 segundos até completarem 240 segundos (4 min.) após a adição do sobrenadante. (ZERAIK et al., 2008).

Os resultados foram expressos em unidades de PO. 100 mg⁻¹ tecido.min⁻¹, admitindo-se que uma unidade de PO equivale ao incremento de absorbância de 0,001. min⁻¹.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e cada tratamento foi composto por quatro repetições em que cada amostra de folhas de plantas diferentes utilizada para obtenção do extrato utilizado no ensaio constituiu uma repetição, os resultados foram analisados por meio do proc GLM do software SAS versão 9 e do teste de Tukey a 5% de significância.

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Capacidade de Metabolizar Diferentes Fontes de Carbono

Para o metabolismo de diferentes fontes de carbono, observou-se que os isolados fitopatogênicos usaram as seguintes fontes carbono em comum, N-Acetyl-D-Glucosamine, N-Acetyl-D-Glucosamine, D-Cellobiose, D-Fructose, D-Galactose, D-Glucose, D-Mannose, Sucrose, D-Trehalose. A *Xap*-RR utilizou 18,1% e a *Xap*-SP se destacou com a metabolização de 25,2%, das fontes de carbono. Para os antagonistas oriundos de São Paulo, observou-se que os isolados SP-11; SP-18; SP-22; SP-28 e SP-48 usaram 51,5; 46,4; 28,2; 54,5; 54,5% das fontes de carbono, respectivamente. Entre estas apenas, as fontes D-Fructose, D-Glucose Pyruvic, Acid Methyl Ester, L-Glutamic Acid, foram utilizadas em comum. Já para os antagonistas originados de Roraima, observou-se que não houve ocorrência da utilização de fontes de carbono em comum. Os isolados RR-14; RR-29 RR-46; RR-98 e RR-133 metabolizaram 29,2; 16,1; 12,1; 42,4; 33,3% das fontes de carbono disponíveis no Kit Biolog, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 cont.

Fontes de carbono	Bactéria de filo plano										Bactéria patogênica	
	RR-29	RR-14	RR-46	RR-98	RR-133	SP-11	SP-18	SP-22	28-SP	48-SP	Xap-RR	Xap-SP
Cis-Aconitic Acid	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Citric Acid	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
Formic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactonic Acid Lactone	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
D-Galacturonic Acid	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
D-Gluconic Acid	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Glucosaminic Acid	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
D-Glucuronic Acid	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Hydroxybutyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydroxybutyric Acid	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Hydroxybutyric Acid	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Hydroxy Phenylacetic Acid	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Itaconic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Keto Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Keto Glutaric Acid	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
-Keto Valeric Acid	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D,L-Lactic Acid	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Malonic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Propionic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Quinic Acid	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
D-Saccharic Acid	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Sebacic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Succinic Acid	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Bromosuccinic Acid	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Succinamic Acid	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Glucuronamide	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
L-Alaninamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Alanine	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
L-Alanine	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
L-Alanyl-Glycine	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
L-Asparagine	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L-Aspartic Acid	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
L-Glutamic Acid	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Glycyl-L-Aspartic Acid	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
Glycyl-L-Glutamic Acid	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
L-Histidine	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-

Tabela 1 cont.

Fontes de carbono	Bactéria de filoplano										Bactéria patogênica	
	RR-29	RR-14	RR-46	RR-98	RR-133	SP-11	SP-18	SP-22	28-SP	48-SP	Xap-RR	Xap-SP
Hydroxy-L- Proline	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
L-Leucine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ornithine	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
L- Phenylalanine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L-Proline	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
L-Pyroglutamic Acid	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
D-Serine	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
L-Serine	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
L-Threonine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
D,L-Carnitine	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
-Amino Butyric Acid	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Urocanic Acid	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Inosine	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Uridine	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Thymidine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Phenyethyl- Amine	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Putrescine	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
2-Aminoethanol	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
2,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
D,L- -Glycerol Phosphate	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
-D-Glucose- 1-Phosphate	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
D-Glucose- 6-Phosphate	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-

(+) utilização da fonte de carbono (-) não utilização da fonte de carbono.

Já para os índices de sobreposições de nicho (NOI), os isolados bacterianos residentes de filoplano, SP-11, SP-18, SP-22, SP-28, SP-48, RR-29, RR-14 e RR-46, não apresentaram sobreposição de nicho sobre as *Xap-RR* e *Xap-SP* de acordo com o critério de Cavaglieri et al. (2004). Porém entre esses isolados o SP-28 apresentou valores constantes de NOI, com valores de 0,72 e 0,70, sob as *Xap-RR* (Apêndice A) e *Xap-SP* (Apêndice B). Apenas os isolados, RR-98 e RR-133 apresentaram indicação de sobreposição de nicho para o isolado de *Xanthomonas* para qual foram selecionados *in vivo* (*Xap-RR*) com resultados próximos, à 0,9 (Tabela 2).

Tabela 2 - Índices de sobreposição de nicho (NOI) dos isolados oriundos de São Paulo e Roraima sob as *Xap-RR* e *Xap-SP*

Patógeno	<i>Xap-RR</i>	<i>Xap-SP</i>
Isolados	(NOI)	
SP-11	0,61	0,68
SP-18	0,61	0,57
SP-22	0,33	0,35
SP-28	0,72	0,57
SP-48	0,72	0,70
RR-14	0,22	0,44
RR-29	0,22	0,28
RR-46	0,39	0,16
RR-98	0,89	0,64
RR-133	0,83	0,44

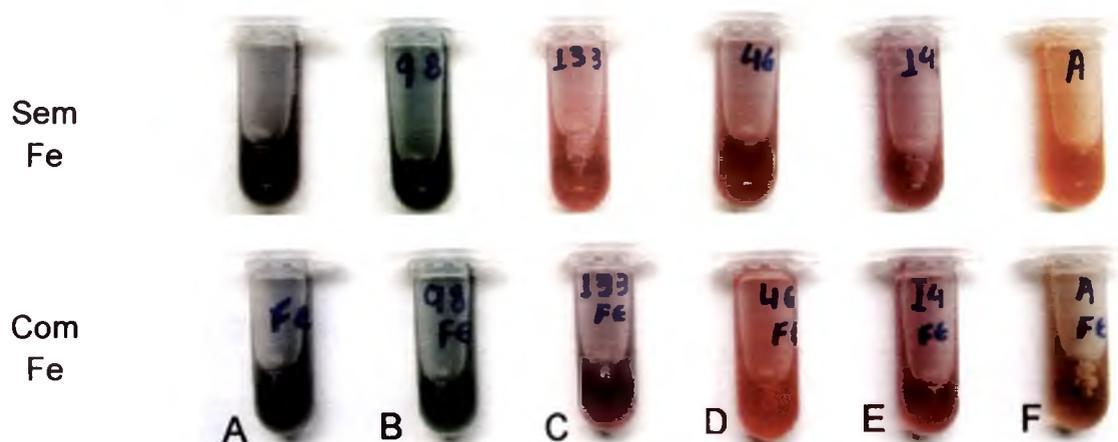
(NOI) < 0,9 não representa competição entre as espécies pelo mesmo nicho.

(NOI) > 0,9 representa competição entre as espécies pelo mesmo nicho.

5.5.2 Produção de Sideróforos

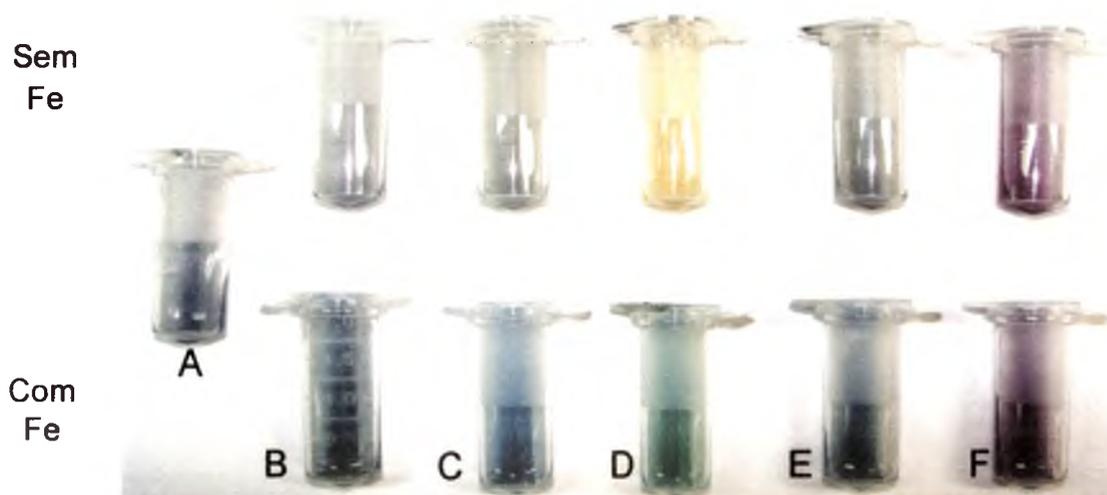
Para os isolados provenientes de Roraima, apenas o isolado RR-29 produziu sideróforos, ou seja, foi capaz de competir por ions ferro, sendo caracterizado pela coloração alaranjada, diferentemente da coloração da testemunha composta pelo meio B de King acrescido com CAS (Figura 1).

Figura 1 - Microtubos contendo meio B de King líquido, mostrando a produção de sideróforos. Testemunha(A), RR-98 (B), RR-133(C), RR-46 (D), RR-14(E) e RR-29(F), os microtubos localizados acima correspondem ao meio sem suplementação e os localizados abaixo com suplementação de $2 \mu\text{M}$ de $\text{Fe}^{2+} \text{mL}^{-1}$.



Para os isolados oriundos de São Paulo, a produção de sideróforo foi detectada somente para o isolado SP-28, o qual demonstrou capacidade em indisponibilizar o íon ferro, quando crescido em meio de cultura sem a suplementação desse íon. Tal fato foi evidenciado pela coloração amarelada, quando adicionado o CAS (Figura 2).

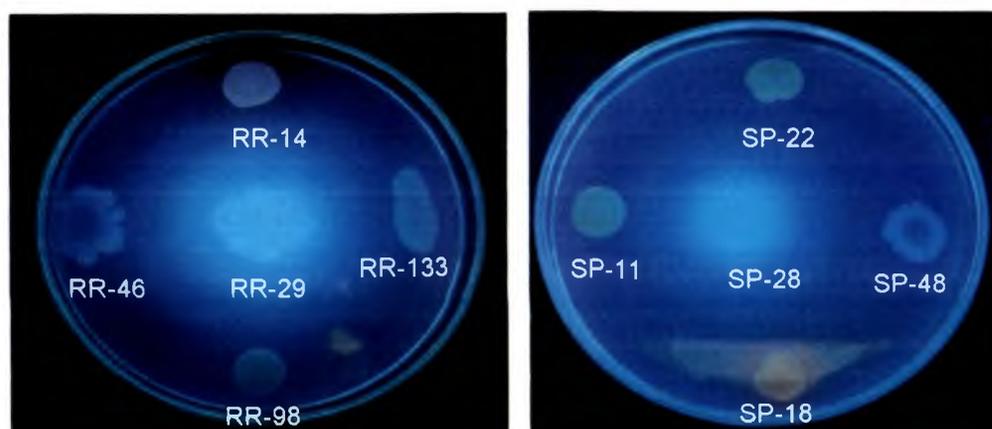
Figura 2 - Microtubos contendo meio B de King líquido, mostrando a produção de sideróforos. Testemunha sem ferro (A), SP-11 (B), SP-18(C), SP-28 (D), SP-22(E) e SP-48 (F), os microtubos localizados acima correspondem ao meio sem suplementação e os localizados abaixo com suplementação de $2 \mu\text{M}$ de $\text{Fe}^{2+} \text{mL}^{-1}$.



5.5.2.1 Detecção de Pioverdina

Para os residentes de floplano oriundos de Roraima e São Paulo não houveram detecção da produção do pigmento fluorescente pioverdina para os isolados RR-14, RR-46, RR-98, RR-133, SP-11, SP-18, SP-22 e SP-38. Sendo detectada somente para os isolado RR-29 e SP-28, quando exposto a luz ultra-violeta em câmara escura (Figura 3).

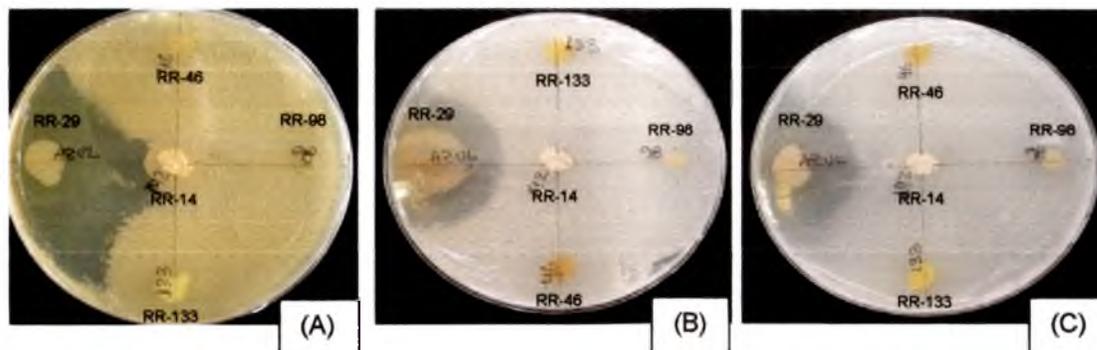
Figura 3 - Residentes de floplano de maracujazeiro selecionados RR-14, RR-29, RR-46, RR-98 e RR-133, oriundos de Roraima (A) e SP-11, SP-18, SP-22, SP-28 e SP-48, oriundos de São Paulo (B), expostos à luz ultra-violeta.



5.5.3 Antibiose em Meio de Cultura

A produção de antibiose para o controle das bactérias fitopatogênicas *Xap*-RR, *Xap*-SP e *Xap*-PA não foi observada para os isolado RR-14; RR-46; RR-98; RR-133; SP-11; SP-18; SP-22 e SP-48. O isolado RR-29 inibiu o crescimento das *Xap*-RR, *Xap*-SP e *Xap*-PA com média de 2 cm de halo de inibição (Figura 4). O isolado SP-28 promoveu antibiose para as *Xap*-SP e *Xap*-PA, com halos de inibição com diâmetro médio de 1,9 e 1,0 cm, respectivamente.

Figura 4 - Antibiose dos isolados RR-14, RR-29, RR-46, RR-98 e RR-133 contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* provenientes de Roraima (A), São Paulo (B) e Pará (C).



5.5.4 Efeito das Bactérias do Filoplano na Atividade da Peroxidase em Plantas de Maracujazeiro

As atividades de peroxidases foram estatisticamente iguais quando as plantas de maracujazeiro foram pulverizadas com água, colonizadas com os isolados RR-14, RR-29, RR-46, RR-98 e RR-133, inoculadas somente com a *Xap*-RR e simultaneamente colonizadas e inoculadas com o antagonista e o patógeno. Isso indica que não houve indução de resistência pelos agentes de biocontrole (Figura 5). Quando as plantas de maracujazeiro foram colonizadas com os isolados SP-11, SP-18, SP-22, SP-28 e SP-48, seguida da inoculação com a *Xap*-SP, também não ocorreu aumento na atividade da peroxidase em comparação com os demais tratamentos, evidenciando que não houve indução de resistência pelo agente de biocontrole já que nenhum tratamento diferiu estatisticamente (Figura 6).

Figura 5 - Atividade de peroxidases (PO) em folhas de maracujazeiro submetidas aos tratamentos: água (A), colonizadas (C) com os isolados (A) RR-14, (B) RR-29, (C) RR-46, (D) RR-98 e (E) RR-133, inoculadas (I) com a *Xap-RR* e colonizadas e inoculadas (CI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. As barras representam o erro padrão das médias.

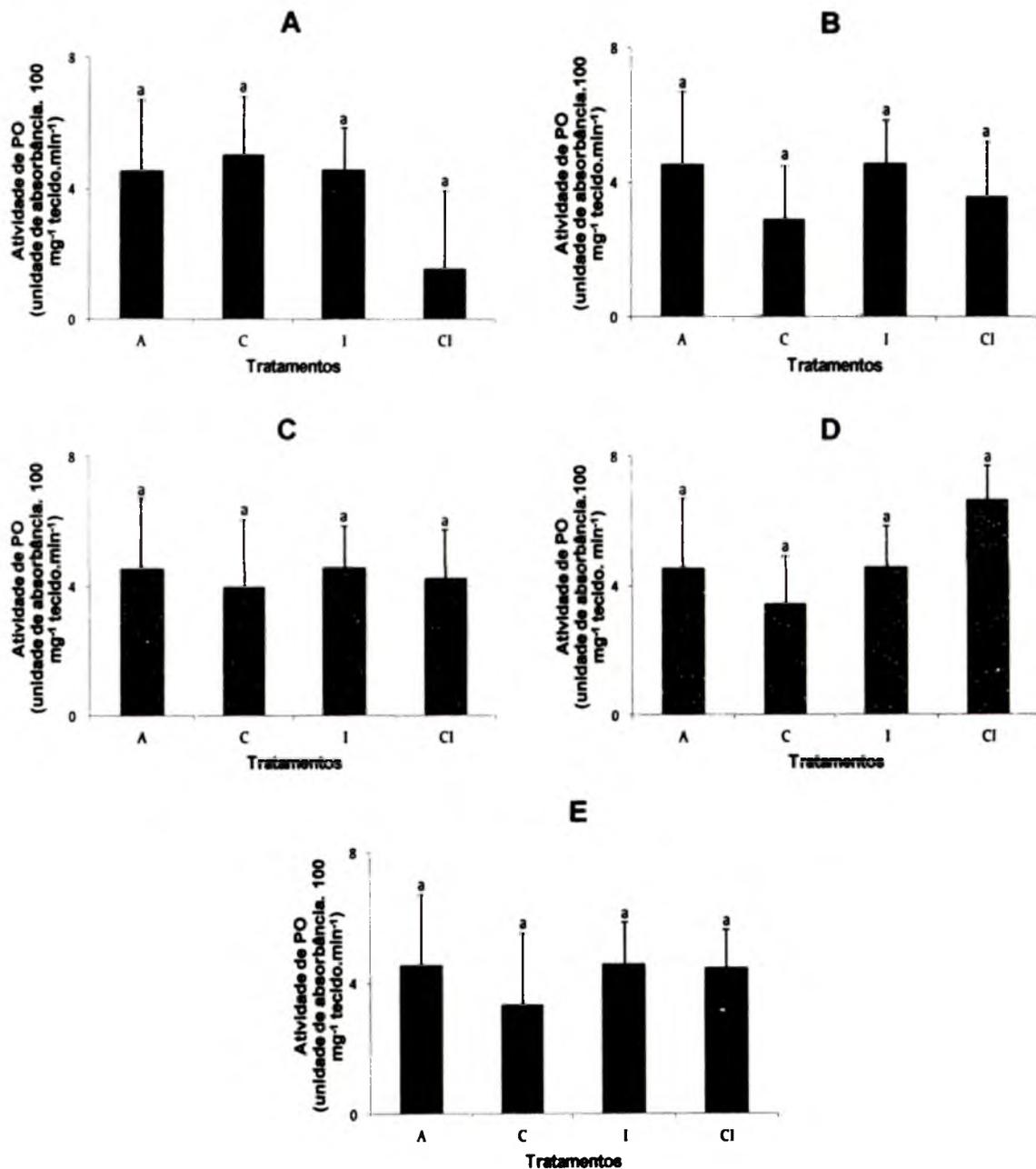
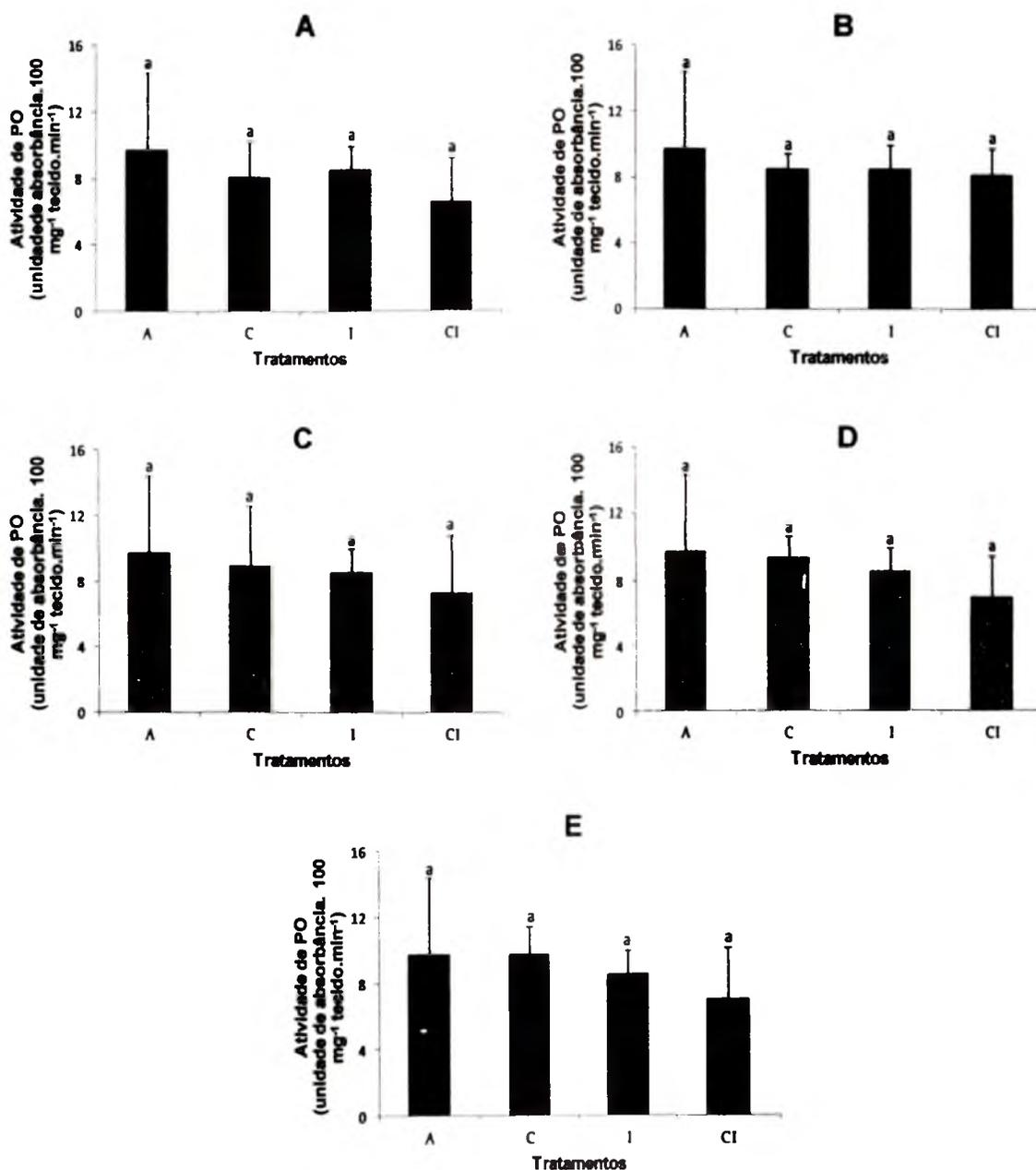


Figura 6 - Atividade de peroxidases (PO) em folhas de maracujazeiro submetidas aos tratamentos: água (A), colonizadas (C) com os isolados (A) SP-11, (B) SP-18, (C) SP-22, (D) SP-28 e (F) SP-48, inoculadas (I) com a *Xap-SP* e colonizadas e inoculadas (CI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. As barras representam o erro padrão das médias.



6. DISCUSSÃO

A capacidade dos residentes de filoplano em metabolizar diversas fontes de carbono é objetivo de discussão como fator importante no processo de seleção de isolados para o biocontrole de doenças. Isso ocorre, pois considera-se que o nível de coexistência de bactérias epífitas na filosfera seja inversamente correlacionado com similaridade ecológica entre eles (LEE; MAGAN, 1999), conforme demonstrado por Wilson; Lindow (1994) para *Pseudomonas syringae* em feijoeiro. Segundo essa premissa, bactérias que utilizem diversas fontes podem obter vantagens na competição por nichos específicos (WILSON; LINDOW, 1994; CAVAGLIERE et al., 2004; PELZER, 2010) e a disponibilidade de diferentes nutrientes nas folhas constituiria como fator determinante para colonização epifítica (LINDOW; BRANDL, 2003). Deste modo, tanto a composição dos exsudados produzidos por uma espécie de plantas como a utilização de fontes de carbono por um antagonista poderiam determinar se bactérias no filoplano teriam maior ou menor capacidade de competição por nicho contra patógenos.

No entanto, Dianese et al. (2003) verificaram que similaridades nutricionais não estão correlacionadas à redução da população do patógeno, nem com a redução da severidade da mancha-bacteriana em tomateiro, por meio de bactérias epifíticas, sugerindo que, neste caso, *X. campestris* pv. *vesicatoria* tem uma fase de pré-penetração pouco dependente de nutrientes no filoplano, ao contrário do que ocorre para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

No presente trabalho, as bactérias selecionadas *in vivo* não apresentaram valores de NOI considerados altos, com exceção dos antagonistas RR-98 e RR-133 com valores de NOI de 0,89 e 0,83 próximos a 0,9.

Isso demonstra que, assim como ocorre em *X. campestris* pv. *vesicatoria* em tomateiro, as exigências nutricionais para colonização de nichos em pré-penetração para *Xap* talvez não configure um aspecto determinante para o processo infectivo.

Por outro lado, a competição por ferro indica ser um fator de importância. Este íon é essencial e importante na nutrição dos microrganismos e a sua baixa disponibilidade pode ser um fator limitante para o crescimento, tanto para bactérias antagonistas como para fitopatogênicas. A competição por íons ferro é mais importante em ambientes onde o elemento encontra-se em baixa disponibilidade ou quando o elemento químico está em sua forma reduzida (OCAMPOS, 2010).

Conforme os resultados encontrados nos ensaios para detecção de sideróforos os isolados RR-29 e SP-28 foram capazes de competir pelo íon ferro o que pode lhes ter conferido interferência no processo infectivo do patógeno (SHARMA; JOHRI, 2003).

Em outros trabalhos, visando o controle de doenças causadas por bactérias do gênero *Xanthomonas* por meio de residentes de filoplano, antagonistas produtores de sideróforos também foram selecionados, tendo sido este atributo considerado importante como mecanismo de biocontrole. Neste aspecto, podemos citar como exemplos os trabalhos com residentes de filoplano envolvendo os patossistemas, feijoeiro x *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (VIEIRA JÚNIOR, 2005) e couve x *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (OCAMPOS, 2010).

Do mesmo modo, a capacidade de controle por antibiose foi observada somente para o antagonista RR-29, que foi capaz de restringir os crescimentos de três isolados procedências distintas (*Xap-RR*, *Xap-SP* e *Xap-PA*), sendo esta uma característica aditiva ao antagonista RR-29, à sua capacidade de produzir sideróforo.

A síntese de substâncias antimicrobianas é importante para alguns microrganismos que atuam no controle biológico sendo a antibiose considerado o principal mecanismo nesses casos (BOTELHO et al., 2006; BARRA et al., 2008; LANNA FILHO, 2008; SPAEPEN et al., 2009; OCAMPOS, 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Por outro lado, não foi encontrada relação entre a indução de resistência e capacidade de controle da mancha-bacteriana do maracujazeiro, pois nenhum dos residentes de filoplano do maracujazeiro foi capaz de influenciar no significativo aumento da atividade da peroxidase em plantas de maracujazeiro.

Portanto, entre os mecanismos de controle elucidados, podemos inferir que a sobreposição de nicho pode ser um dos fatores do biocontrole apresentados pelos isolados RR-98 e RR-133 e que o isolado RR-29 atua por competição por ferro e por antibiose. Já o isolado SP-28 também é capaz de competir por ferro.

Porém, o fato de não ter sido detectado nenhum mecanismo que explicasse a capacidade de controle da mancha-bacteriana *in vivo* dos demais antagonistas reforça a premissa de que a seleção de antagonistas baseada em atributos detectáveis em ensaios em laboratório podem levar ao descarte de bons antagonistas (HALFELD-VIEIRA et al., 2003)

Também deve-se refletir que podemos desconhecer outros mecanismos de ação ainda não conhecidos ou bem explorados que possam vir a serem descobertos a partir destes antagonistas sem mecanismo de controle elucidado.

Um exemplo recente seria o quorum-quenching como mecanismo de biocontrole de bactérias que vem sendo cada vez mais estudado (CHRISTIAEN et al., 2011; MOROHOSHI et al., 2009) e pode ser aplicado como modo de interferir no processo infectivo de bactérias do gênero *Xanthomonas* (VON BODMAN et al., 2003; ZHAO et al., 2011).

7. CONCLUSÕES

A sobreposição de nicho, competição por ferro e/ou antibiose são fatores que podem explicar a capacidade de controle da mancha-bacteriana para os seguintes isolados: RR-98 e RR-133, RR-29 e SP-28;

Nenhum dos antagonistas estudados é capaz de incitar o aumento da atividade da peroxidase em plantas de maracujazeiro, não havendo evidências de que induzem resistência.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; SILVEIRA, P. R.; RIOS, J. A.; OLIVEIRA, J. R.; MARIANO, R. L. R. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, v.38, n.1, p.28-34, 2013.

BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v.26, n.2, p.231-239, 2010.

BERNARDES, F. S.; PATRÍCIO, F. R. A.; SANTOS, A. S.; FREITAS, S. D. S. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. **Summa Phytopathologica**, v.36, n. 2, p.115-121, 2010.

ARAUJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil) **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.169-172, 2009.

ANDREWS, J. H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.603-635, 1992.

ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. Nova Iorque: Springer-Verlag, 501 p., 1991.

ARÊDES, A. F.; PEREIRA, M. W. G.; GOMES, M. F. M.; RUFINO, J. L. S. Análise econômica da irrigação na cultura do maracujá. **Revista de Economia da Universidade Estadual de Goiás**, v.5, n.1, p.66-86, 2009.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. São Francisco: W.H. Freeman, 1974.

BAKER, R.; COOK, J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco. W. H. Freeman, 1974.

BARACAT-PEREIRA, M.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; SANTORO, M.M. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: presence of soluble and membrane-bound forms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, n.2, p.91-98, 2001.

BARGABUS, R.L.; ZIDACK, N.K.; SHERWOOD, J.E.; JACOBSEN, B.J. Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.61, p.289-298, 2002.

BARRA, R. R.; FERRAZ, H. M. F., MACAGNAN, D.; SILVA, H. S.; MOURA, A. B. HALFELD-VIEIRA, B. A.; VIEIRA JÚNIOR, J. R. Potencialidade antagonística detectada em alguns procariontes agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.121-126, 2008.

BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. "The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves". In: **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p.145-172, 1995.

BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v.89, p.353-359, 1999.

BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.5, p.59-97. 1997.

BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Reviews Phytopathology**, v.30, p.167-192, 1982.

BOTELHO, G. R.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. A importância de antibióticos produzidos por *Pseudomonas fluorescentes* na supressão de doenças de plantas. **Documentos, Seropédica, Embrapa Agrobiologia**, n. 211, 31p. , 2006.

BRIGNANI NETO, F. Produção Integrada de Maracujá, **O Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.195-197, jul/dez, 2002.

BULTREYS, A. Siderotyping, a tool to characterize, classify and identify fluorescent *Pseudomonads*. In: VARMA, A.; CHINCHOLKAR, S. B. **Microbial Siderophores**, Berlin: Springer-Verlag, v.12, p.67-89, 2007.

CAVAGLIERI, L.; PASSONE A.; ETCHEVERRY, M.; Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. **Research in Microbiology**, v.155, p.747-754, 2004.

CHRISTIAEN, S. E. A.; BRACKMAN, G.; NELIS, H.J.; COENYE, T. Isolation and identification of quorum quenching bacteria from environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.87, n.2, p.213-219, 2011.

COLATTO, U. L. D. **Reação de progênies de maracujazeiro azedo à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), à verrugose (*Cladosporium herbarum*) e à (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*)**. Brasília, 2010, 97f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de Brasília.

DIANESE, A.C.; JI P.; WILSON, M. Nutritional Similarity between Leaf-Associated Nonpathogenic Bacteria and the Pathogen Is Not Predictive of Efficacy in Biological Control of Bacterial Spot of Tomato. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.6, p.3484-3491, 2003.

ERENO, D. Proteção ao maracujá: novo kit diagnostica precocemente bactéria que devasta pomares. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=4471&bd=1&pg=1&lg=> > Acesso em: 26 de julho de 2011.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro - Desafios da Pesquisa. In: FALEIRO F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.187-209, 2005.

FRANCO, M. M.; TAKATSU, A. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* a cobre. **Bioscience Journal**, v.2, n.2, p.207-210, mai/ago, 2004.

FUHRMANN, E. **Reação de híbridos interespecíficos de maracujazeiro à bacteriose e características físico-químicas de frutos**. Brasília, 2011. 95f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

GARCIA, F. A. O. **Efetividade de formulações de procariontes residentes de filoplano no controle biológico de doenças do tomateiro**. Viçosa, 2004. 42f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.

GARCIA, F.A.O. **Biocaracterização de procariontes como agentes de biocontrole de enfermidades e como promotores de crescimento em feijoeiro**. Viçosa, 2008, 146f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trend in Biotechnology**. v.20, n.8, p.338-343, 2002.

GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* utilizando-se sondas de DNA e "primers" específicos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.20-27, 2002.

GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. Genotypic characterization of *Xanthomonas* stains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.811-821, 2000.

GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINOOR, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology**. v.92, n.9, p.976-985, 2002.

HALFELD-VIEIRA, B. A. **Bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura.** Viçosa, 2002. 98f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; MATTIONI, J. A. M. Doenças do maracujá no estado de Roraima. **Documentos**, Embrapa Roraima, n. 01, 21p. , 2007.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K.L. Ocorrência da mancha - bacteriana do maracujazeiro em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.214, 2006 a.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Evidências da inadequação de testes de antibiose como critério para a seleção de bactérias do filoplano como agentes de controle biológico. In: **XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2003, p. 1-4.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.6, p. 638-643, 2004.

HALFELD-VIEIRA, B. de A. **Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura.** Viçosa. 2002. 98f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.

HALFELD-VIEIRA, B.A. Bactérias residentes de filoplano e seu potencial na indução de resistência em plantas a patógenos. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S.. (Org.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. 1 ed. Piracicaba: FEALQ, 2005. P.183-193.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; VIEIRA JÚNIOR, J.R.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H.S.A.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p. 1247-1252, 2006 b.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.73-80, 1982.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p.624-653, 2000.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Dados demográficos e produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro, 2010. 387p.

JACOBS, J. L.; SUNDIN, G. W. Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.5488 - 5496, 2001.

JUNQUEIRA, K. P. **Resistência genética e métodos alternativos de controle da bacteriose do maracujazeiro causado por *Xanthomonas axopodis* pv. *passiflorae***. Brasília. 2010. 172f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**, Planaltina: Embrapa Cerrados, p.81-106, 2005.

KADO, C.I.; HESKETT M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p .969-979, 1970.

KINKEL, L. L. Microbial population dynamics on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.327-347, 1997.

KINKEL, L. L.; WILSON, M. ; LINDOW, S. E. Utility of microcosm studies for predicting phylloplane bacterium population sizes in the field. **Applied and Environmental Microbiology**, v 62, p.3413-3423, 1996.

KOLATTUKUDY, P.E.; MOHAN, R.; BAJAR, M.A.; SHERF, B.A. Plant peroxidase gene expression and function. **Biochemical Society Transactions**, v.20, p.333 - 337, 1992.

KONG, G. A., K., K. J. & BROWN, J. F. Phylloplane bacteria antagonistic to the sunflower pathogen *Alternaria helianthi*. **Australasian plant Pathology**, v. 26, p.85 - 97, 1997.

KUHN, O. J.; PORTZ, R. L.; STANGARLIN, J. R.; DEL ÁGUILA, R. M.; SCHWAN ESTRADA, K. R. F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n.1, p.13-20, jan/mar, 2006.

LAMARI, L. Assess 2.0: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification. St. Paul: APS, 1998.

LANNA FILHO, R.; ROMEIRO, R.S.; ALVES, E. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.12, p.1381-1387, 2010.

LAST, F. T. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. **Transactions of the British Mycological society**, v.48, p.221-229, 1955.

LAST, F. T.; DEIGHTON, F. C. The non-parasitic microflora on the surfaces of living leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v.48, p.83 - 99, 1965.

LEBEN, C. Relative-humidity and the survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants. **Phytopathology**, v.78, p.179-185, 1988.

LEBEN, C. "Introductory remarks: Biological control strategies in the phylloplane". In: WINDELS, C.E.; LINDOW, S.E. **Biological control on the phylloplane**. St. Paul: APS press, 1985. 169p.

LEBEN, C. How plant pathogenic survive. **Plant Disease**, v.65, p.633-637, 1981.

LEE, H. B.; MAGAN, N. Environmental factors and nutritional utilization patterns affect niche overlap indices between *Aspergillus ochraceus* and other spoilage fungi, **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.300-304, 1999.

LEITE JÚNIOR., R.P. Bacteriose do maracujazeiro e estratégias para seu controle. In: Reunião técnica de pesquisa em maracujazeiro, 3., 2002, Viçosa. **Anais**, Viçosa: UFV, p.97-98, 2002.

LIBERATO, J. R. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em maracujazeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. (Ed). **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: Suprema, v. 2. p.699-825, 2002.

LIBERATO, J. R.; COSTA, H. Doenças fúngicas, bacterianas e fitonematóides. In: BRUCKNER, C. H.; PIKANÇO, M. C. (Ed). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco continentes, 2001, p. 243-276.

LIMA, A. A. **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica (Frutas do Brasil, 15) 103p. 2002.

LINDOW, S.E.; LEVEAU, J. H. J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.238-243, 2002.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.4, p. 1875-1873, 2003.

LUIZON, R., A.; **Sequenciamento parcial do vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit Green spot vírus-PFGSV), desenvolvimento de métodos para a sua detecção e estudos sobre sua variabilidade genética**. Piracicaba, 2009, 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MACAGNAN, D. **Bactérias endosporogênicas e actinomicetos residentes de fruto de cacaueteiro como agente de biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da prodridação parda (*Phytophthora ssp.*)**. Viçosa, 2005, 102f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.

MACAGNAN, D. **Seleção de procariotas residentes de filo plano visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao* L.) incitada por *Crinipellis pernicioso* (STAHLE) SINGER.** Viçosa 2001, 57f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.

MANICA I. **Maracujá-doce: Tecnologia de produção, pós-colheita, mercado.** Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005, 200p.

MAPA. AGROFIT: sistema de agrotóxicos fissanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 5 de janeiro de 2013.

MARIANO, R.L.R.; McCARTER, S.M. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato and weeds species. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, p.86-92, 1991

MARTINEZ, C.; MONTILLET, J. L.; BRESSON, E.; AGNEL, J. P.; DAI, G. H.; DANIEL, J. F.; GEIGER, J. P.; NICOLEM, M. Apoplastic Peroxidase Generates Superoxide Anions in Cells of Cotton Cotyledons Undergoing the Hypersensitive Reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* Race 18. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, n.11, p.1038-1047, 1998.

MELETTI, L. M. M.; BRUNCKNER, C. H. Melhoramento genético. In: BRUNCKNER, C. H.; PIKANÇO, M. C. (Ed). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, Mercado.** Porto Alegre: Cinco continentes, 2001. P. 345-385.

MERCIER, J.; LINDOW, S. E.; Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. . **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.1 p.369-374, 2000.

MIRANDA, J. F. **Reação de variedades de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) a bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.** Piracicaba, 2004, 48 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**. v.162, p.491- 498, 2002.

MONTEIRO, M. **Transformação de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. Piracicaba, 2005. 134 F. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MOROHOSHI, T.; SOMEYA, N.; IKEDA, T. Novel N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n.9, p.2124-2127, 2009.

MÜLLER, S. F.; STANGARLIN, J. R.; MEINERZ, C. C. A indução de resistência e seus efeitos em feijoeiro sob cultivo agroecológico. **Cadernos de Agroecologia-ISSN 2236-7934**, v., n.2, p.1-6, 2011.

NAKATANI, A. K.; LOPES, R.; CAMARGO, L. E. A. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, n. 35, v. 2 p. 116-120, abr/jun, 2009.

OCAMPOS, C. J. G. **Bactérias isoladas do filoplano no biocontrole da altemariose e da podridão negra da couve**. Viçosa, 2010, 50f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.

OLIVEIRA, A.G.; MURATE, L.S.; SPAGO, F.R.; LOPES, L.P.; BERANGER, J.P.O.; SAN MARTIN, J.A.B.; NOGUEIRA, M.A.; MELLO, J.C.P.; ANDRADE, C.G.T.J.; ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, v.56, n.2, p.125-131, 2011.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIEIRO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro PAULA JÚNIOR, T. J. ; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 1998. p. 375-433.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIEIRO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. **Anais do Simpósio Brasileiro sobre a Cultura do Maracujá**, Jaboticabal, p.291-310, 1998.

PELZER, G. Q.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; SOUZA, G. R.; ZILLI, J. E.; PERIN, L. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 95-103, 2011.

PELZER, G. Q. **Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias.** Boa Vista, 2010, 78f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Roraima.

PEREIRA, A. L. G. Uma nova doença bacteriana do maracujá (*Passiflora edulis* Sims) causada por *Xanthomonas passiflorae* n. sp. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.36, p.163-174, 1969.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JUNIOR, R. P.; and CAMARGO, L. E. A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas spp.* associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.4, 2003.

RAIO, A.; PUOPOLO, G.; CIMMINO, A.; DANTI, R.; DELLA ROCCA, G.; EVIDENTE, A. Biocontrol of cypress canker by the phenazine producer *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* strain M71. **Biological Control**, v.58, n.2, p.133-138, 2011.

RIKKEN, G. B.; KROON, A. G. M., VAN GINKEL, C. G. Transformation of (per)chlorate into chloride by a newly isolated bacterium: reduction and dismutation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p.420-426, 1996.

ROLLEMBERG, C. L. **Mancha das folhas da macieira: caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes de filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas.** Curitiba, 2008, 124f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de enfermidades de plantas - Fundamentos.** Viçosa: Editora UFV, 269 p. 2007.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Residentes de filoplano como agentes de controle biológico de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica**, v.33, p. 143-147, 2007.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas.** Viçosa: UFV, 2001. 279 p.

SANTOS FILHO, H.P.; LARANJEIRA, F.F.; SANTOS, C.C.F.; BARBOSA, C.J. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A. A; CUNHA, M. A. P. (Ed). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 239-280.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987.

SHARMA, A.; JOHRI, B. N. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays L.*) under iron limiting conditions, **Microbiological research**, v. 158, n. 3, p. 243-248, 2003.

SILVEIRA, E.B. Bacterias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S.; BARROS, R. (Eds). *Proteção de plantas na agricultura sustentável*. Recife: UFRPE. p.71-100, 2001.

SONG, Y.; LOGAN, B. E. Inhibition of aerobic respiration and dissimilatory perchlorate reduction using cyanide. **FEMS Microbiology Letters**, v.239, p.229-234, 2004.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, j.; OKON, O. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. **Advances in Botanical Research**, v.51, p.283-320, 2009.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.235-270, 1997.

SUTIC', D.D.; SINCLAIR, J.B. **Anatomy and Physiology of Diseased Plants**. Boston, CRC Press. 1991, 232 p.

TERUMI ITAKO, A.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Efeito de produtos químicos sobre a mancha - bacteriana (*Xanthomonas perforans*) e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro. **Idesia [online]** v.30, n.2, p.85-92. 2012.

TUZUN, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.1, p.85-93, 2001.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIERTERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453 - 483, 1998.

VAN TOOR, R. F.; PAY, J. M.; JASPERS, M. V.; STEWART, A. Evaluation of phylloplano microorganisms for biological control of camellia flower blight. **Australian Plant Pathology**, v.34, p. 525-531, 2005.

VARMA, A.; CHINCHOLKAR, S. B. **Microbial Siderophores**, Berlin: Springer-Verlag, v.12, p.67-89, 2007.

VIANA, C. A. S. **Resistência de genótipos de maracujá-azedo à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) e a virose do endurecimento do fruto (Cowpea aphid-borne mosaic vírus)**. Brasília, 2007, 210f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília.

VIEIRA JÚNIOR, J. R. **Procariontes residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. Viçosa, 2005, 146f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.

VILLANOVA, A. C. C.; SILVA, D. G. P. da; CASTIGLIONI, G. L.; JUNQUEIRA, L. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; SANTOS, E. C.; SOBRAL, L.; LIMA, C. A. de. Índice de transmissão via sementes da virose do endurecimento do fruto do maracujazeiro e da bacteriose do maracujazeiro. Disponível em: http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/maracujap&d/resumos/1_30.pdf> Acesso em: 10 de janeiro de 2013.

VON BODMAN, S.B.; BAUER, W.D.; COPLIN, D.L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria, **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p.455-482, 2003.

WELLER, D. M.; SAETTLER, A. W. Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* pv. *fuscans* in field-grown navy beans. **Phytopathology**, v.70, p.500-506, 1980.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rizosphere. **Journal of Experimental Botany**. v.52, special issue, p.487-511, 2001.

WILSON, M.; HIRANO, S. S.; LINDOW, S. E. Location and survival of leaf associate bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1435-1443, 1999.

WILSON, M.; LINDOW, S. E. Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (ICE+) *Pseudomonas syringae* strains and a non-ice-nucleating (ICE-) biological control agents. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p. 3128-3137, 1994.

YUEH, M.F.; NGUYEN, N.; FAMOURZADEH, M.; STRASSBURG, C.P.; ODA, Y.; GUENGERICH, F.P.; TUKEY, R.H. The contribution of UDP-glucuronosyltransferase 1A9 on CYP1A2-mediated genotoxicity by aromatic and heterocyclic amines. **Carcinogenesis (Oxford)**, v. 22, n. 6 p. 943-950, 2001.

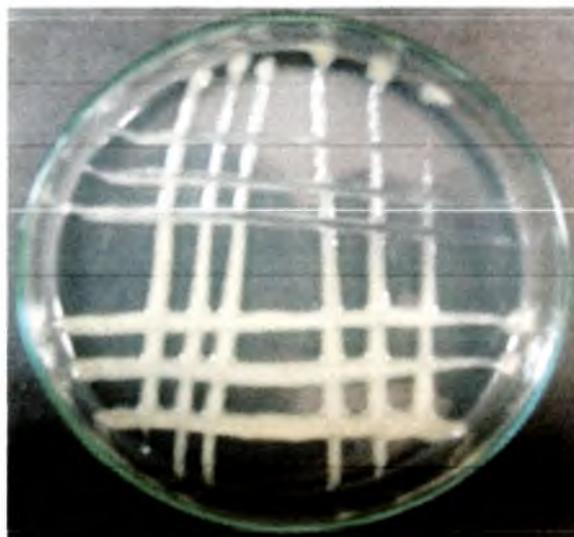
ZHAO, Y.; QIAN, G.; YIN, F.; FAN, J.; ZHAI, Z.; LIU, C.; HU, B.; LIU, F. Proteomic analysis of the regulatory function of DSF-dependent quorum sensing in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **Microbial Pathogenesis**, v.50, n.1, p.48-55, 2011.

ZERAIK, A. E.; SANT'ANA DE SOUZA, F.; FATIBELLO-FILHO, O.; LEITE, O. D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v.31, n.4, p.731-734, 2008.

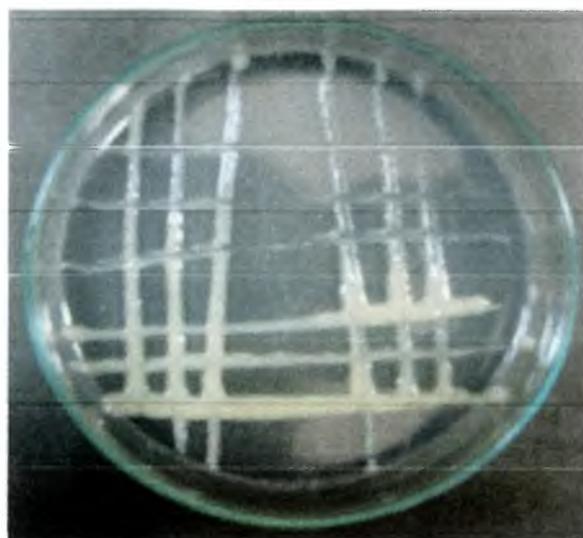
ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.3 p.459-471, jun/Jul, 2010.

APÊNDICES

Apêndice A - Colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* proveniente de Roraima, crescidas em placas de Petri contendo meio 523 (KADO; HESKETT, 1970).



Apêndice B - Colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* proveniente de São Paulo, crescidas em placas de Petri contendo meio 523 (KADO; HESKETT, 1970).



ANEXOS

Anexo A - Análise de variância da terceira etapa de seleção com 27 residentes de filoplano do maracujazeiro, oriundo de Roraima.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	28	949.16	33.89	3.56 **
Resíduo	145	1378.74	9.50	-
Total	173	2327.90	-	-
CV	12.71	-	-	-

Dados transformados para severidade +20

Anexo B - Análise de variância da quarta etapa de seleção com 5 residentes de filoplano do maracujazeiro, oriundos de Roraima.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	821.99123	136.99	10.92 **
Resíduo	133	1667.07253	12.53	-
Total	139	2489.06376	-	-
CV	14.96	-	-	-

Dados transformados para severidade +20

Anexo C - Análise de variância da terceira etapa de seleção com 5 residentes de filoplano do maracujazeiro, oriundos de São Paulo.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	1275.58	212.59	9.68 **
Resíduo	133	2922.10	21.97	-
Total	139	4197.71	-	-
CV	18.55	-	-	-

Dados transformados para severidade +20

Anexo D - Análise de variância da terceira etapa de seleção com 4 residentes de filoplano do maracujazeiro, oriundos do Pará.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	62.88	12.57	0.25 ns
Resíduo	102	5012.46	49.14	-
Total	107	5075.34	-	-
CV	24.45	-	-	-

Dados transformados para severidade +20

Anexo E - Análise de variância da atividade de peroxidase de folhas de maracujazeiro tratadas com água, colonizadas com o isolado RR-14, inoculadas com a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* proveniente de Roraima e colonizadas com o antagonista e inoculadas com o patógeno

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	30.75	10.24	2.66 ns
Resíduo	12	40.06	3.83	-
Total	15	70.81	-	-
CV	50.16	-	-	-

Anexo F - Análise de variância da atividade de peroxidase de folhas de maracujazeiro tratadas com água, colonizadas com o isolado RR-29, inoculadas com a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* proveniente de Roraima e colonizadas com o antagonista e inoculadas com o patógeno

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	7.91	2.63	0.90 ns
Resíduo	12	34.97	2.91	-
Total	15	42.88	-	-
CV	43.92	-	-	-

Anexo G - Análise de variância da atividade de peroxidase de folhas de maracujazeiro tratadas com água, colonizadas com o isolado RR-46, inoculadas com a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* proveniente de Roraima e colonizadas com o antagonista e inoculadas com o patógeno

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	0.95	0.31	0.09 ns
Resíduo	12	39.20	3.26	-
Total	15	40.15	-	-
CV	41.87	-	-	-

Anexo H - Análise de variância da atividade de peroxidase de folhas de maracujazeiro tratadas com água, colonizadas com o isolado RR-98, inoculadas com a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* proveniente de Roraima e colonizadas com o antagonista e inoculadas com o patógeno

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	21.73	7.24	2.95 ns
Resíduo	12	29.46	2.45	-
Total	15	51.19	-	-
CV	32.72	-	-	-

Anexo I - Análise de variância da atividade de peroxidase de folhas de maracujazeiro tratadas com água, colonizadas com o isolado RR-133, inoculadas com a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* proveniente de Roraima e colonizadas com o antagonista e inoculadas com o patógeno

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	4.25	1.41	0.45 ns
Resíduo	12	37.82	3.15	-
Total	15	42.07	-	-
CV	42.11	-	-	-

Anexo J - Análise de variância da atividade de peroxidase de folhas de maracujazeiro tratadas com água, colonizadas com o isolado SP-11, inoculadas com a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* proveniente de São Paulo e colonizadas com o antagonista e inoculadas com o patógeno

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	19.90	6.63	0.73 ns
Resíduo	12	108.74	9.05	-
Total	15	128.54	-	-
CV	36.45	-	-	-

Anexo L - Análise de variância da atividade de peroxidases de folhas de maracujazeiro tratadas com água, colonizadas com o isolado SP-18, inoculadas com a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* proveniente de São Paulo e colonizadas com o antagonista e inoculadas com o patógeno

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	5.54	1.84	0.26 ns
Resíduo	12	82.45	6.87	-
Total	15	87.99	-	-
CV	34.54	-	-	-

Anexo M - Análise de variância da atividade de peroxidases de folhas de maracujazeiro tratadas com água, colonizadas com o isolado SP-22, inoculadas com a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* proveniente de São Paulo e colonizadas com o antagonista e inoculadas com o patógeno

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	12.36	4.12	0.33 ns
Resíduo	12	146.80	12.23	-
Total	15	159.16	-	-
CV	40.72	-	-	-

Anexo N - Análise de variância da atividade de peroxidase de folhas de maracujazeiro tratadas com água, colonizadas com o isolado SP-28, inoculadas com a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* proveniente de São Paulo e colonizadas com o antagonista e inoculadas com o patógeno

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	18.25	6.08	0.75 ns
Resíduo	12	96.19	8.01	-
Total	15	114.44	-	-
CV	32.83	-	-	-

Anexo O - Análise de variância da atividade de peroxidase de folhas de maracujazeiro tratadas com água, colonizadas com o isolado SP-48, inoculadas com a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* proveniente de São Paulo e colonizadas com o antagonista e inoculadas com o patógeno

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	20.13	6.71	0.73
Resíduo	12	109.32	9.11	-
Total	15	129.48	-	-
CV	21.33	-	-	-