



Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC

Josineide R. Costa¹, Edivânio R. Araújo², Walter F. Becker³, Marisa A.S.V. Ferreira² & Alice Maria Quezado-Duval⁴

¹Faculdade Anhanguera de Brasília/JK, 71950-550, Brasília, DF, Brasil; ²Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, 70910-900, Brasília, DF, Brasil; ³Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Estação Experimental de Caçador, 89500-000 Caçador, SC, Brasil; ⁴Embrapa Hortaliças, 70359-970, Brasília, DF, Brasil

Autor para correspondência: Alice Maria Quezado-Duval, e-mail: alice@cnph.embrapa.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar isolados de *Xanthomonas* causadores da mancha bacteriana do tomateiro para consumo *in natura*, provenientes da região do Alto Vale do Rio do Peixe, SC, Brasil, bem como caracterizá-los quanto à sensibilidade *in vitro* ao cobre. As espécies foram determinadas por similaridades de perfis genômicos gerados por BOX-PCR e a sensibilidade ao cobre foi estabelecida utilizando-se o meio CYE suplementado com sulfato de cobre nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL. Do total de 44 isolados, 80% foram identificados como *X. gardneri*, 11% como *X. perforans* e 9% como *X. vesicatoria*. De acordo com a reação ao cobre, os isolados foram agrupados em quatro classes (S, sensíveis; MS, moderadamente sensíveis; MI, moderadamente insensíveis; I, insensíveis). Quanto à sensibilidade ao cobre, 98% de todos os isolados foram sensíveis a 200 µg/mL, sugerindo que aparentemente, a dosagem recomendada de produtos à base de cobre em campo, 10 vezes maior que a dosagem limítrofe utilizada nos testes *in vitro*, ainda é eficiente para as diferentes espécies da bactéria.

Palavras-chave: *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*, *X. vesicatoria*, BOX-PCR, cobre, controle químico.

ABSTRACT

Occurrence and characterization of the species complex causing tomato bacterial spot in “Alto Vale do Rio do Peixe”, SC, Brazil

The aim of this study was to identify at the species level *Xanthomonas* strains causing tomato bacterial spot in the region of “Alto Vale do Rio do Peixe”, state of Santa Catarina, Brazil, as well as to determine their *in vitro* sensitivity to copper. Species were determined by similarity analysis of genomic profiles generated by BOX-PCR and sensitivity to copper was established using the CYE medium supplemented with copper sulfate at concentrations of 50, 100 and 200 µg/mL. Of the 44 isolates, 80% were identified as *X. gardneri*, 11% as *X. perforans* and 9% as *X. vesicatoria*. According to the response to copper, the isolates were divided into four classes (S, sensitive; MS, moderately sensitive; MI, moderately insensitive; I, insensitive). Regarding the sensitivity to copper, 98% of all isolates were sensitive at 200 µg/mL, suggesting that the recommended dosage of copper-based products registered for the crop may still provide effective control of the different bacterial species.

Key words: *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*, *X. vesicatoria*, BOX-PCR, chemical control, copper.

Em Santa Catarina, o pólo produtor de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se concentra na região do Alto Vale do Rio do Peixe (AVRP). Os municípios de Caçador, Lebon Régis, Rio das Antas e Macieira, que compõem essa região, são responsáveis por 49,14% da área cultivada no Estado. Segundo levantamento realizado pela Epagri/Cepa (2011), Santa Catarina é atualmente o sétimo maior produtor nacional. Toda a produção do Estado destina-se ao consumo *in natura* (Camargo & Camargo Filho, 2008).

O município de Caçador possui a maior área cultivada (1.000 ha). A produtividade de suas lavouras é de 85.000 kg/ha, o que torna sua produção equivalente a 45,5% da safra estadual (Epagri/Cepa, 2011). O desenvolvimento da cultura do tomate neste município se deve à condição

climática vigente e gera renda para mais de 560 famílias de agricultores. Em função da altitude média (em torno de 1000 m), o verão se caracteriza como ameno. Assim, é possível colher tomate em janeiro, fevereiro e março, meses em que as regiões produtoras tradicionais dessa hortaliça enfrentam problemas advindos do calor excessivo do verão. Com isso, a maior parte do tomate comercializado no Brasil nesses meses é oriunda de Caçador (Kreuz et al., 2004).

A mancha bacteriana tem como agentes causais um complexo de espécies pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, a saber, *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (Jones et al., 2004). Na região amostrada no presente estudo, a doença é endêmica e prevalente, ocorrendo com maior intensidade nos anos chuvosos (Marcuzzo et al., 2009).

Apesar dos danos severos frequentemente observados nas lavouras, não foram encontrados relatos quantificando as perdas decorrentes da doença para o segmento de tomate para consumo *in natura* no Brasil. Sabe-se, no entanto, que em condições experimentais de campo, a doença pode causar perdas de até 52% na produção de tomate rasteiro (Quezado-Soares et al., 1998).

A diferenciação das espécies que formam o complexo da mancha bacteriana pode ser realizada através de ensaios bioquímicos (atividade amilolítica), patogenicidade em tomate e pimentão, mas com maior eficiência e rapidez por meio de técnicas moleculares, rep-PCR ou PCR com iniciadores específicos (Louws et al., 1995; Bouzar et al., 1999; Cuppels et al., 2006; Koenraadt et al., 2009; Pereira et al., 2011). A técnica de rep-PCR com o iniciador BOX apresenta vantagens por ser rápida, de fácil execução e altamente discriminatória para espécies de *Xanthomonas*. Segundo Rademaker et al. (2000), métodos que geram *fingerprintings*, como rep-PCR, apresentam elevada correlação com a homologia DNA-DNA, reafirmando a especificidade e eficiência dessa técnica na identificação de espécies bacterianas.

Apesar de amplamente empregados em lavouras de tomate no Brasil, fungicidas cúpricos registrados para uso agrícola nem sempre resultam em controle eficiente das bacterioses que afetam a cultura. O aparecimento de estirpes resistentes aos princípios ativos pode ser uma das causas dessa baixa eficiência (Quezado-Duval et al., 2003). Na região do AVRP, o controle químico da mancha bacteriana é efetuado por meio de produtos cúpricos e associações destes com mancozebe, já na primeira semana do transplante, com frequência semanal, o que representa 32% das aplicações de agrotóxicos no ciclo da cultura (Becker et al., 2011).

Este trabalho objetivou identificar, em nível específico, os isolados de *Xanthomonas* causadores da mancha bacteriana do tomateiro provenientes da região de Caçador-SC, bem como avaliar a sensibilidade *in vitro* desses isolados ao cobre.

Para constatar a ocorrência relativa de espécies do gênero *Xanthomonas*, coletou-se folhas com sintomas de mancha bacteriana em lavouras de tomate de mesa na região de Caçador em quatro propriedades, compreendendo nove diferentes campos de produção. Os isolados que apresentaram colônias características do gênero foram transferidos para o meio Nutriente Ágar (NA) e incubados por 48 horas a 28°C, procedendo-se então à preservação dos mesmos em tampão fosfato (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 pH 7,0), segundo Schaad et al. (2001).

Suspensões bacterianas para os diferentes testes foram preparadas em sulfato de magnésio (10 mM/L), na concentração aproximada de 5×10^8 UFC/mL ajustada em espectrofotômetro ($OD_{600} = 0,3$). Realizaram-se testes de hipersensibilidade em plantas de fumo, avaliando as reações às 24 e 36 horas após a inoculação. Os isolados também foram inoculados em plantas de tomate da

variedade suscetível Yuba (CNPH 851) para verificação de patogenicidade.

ODNA genômico foi extraído utilizando-se o método CTAB de Wilson (1999) com modificações. Para as reações de BOX-PCR utilizou-se iniciador BOX 1AR (5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3') correspondente à sequência repetitiva BOX (Versalovic et al., 1991). A reação foi composta de: Tampão 1X; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada um dos dNTPs; 2 μ M do iniciador; 1,26 U de *Taq* DNA polimerase; aproximadamente 50 ng de DNA; e água milliQ para um volume final de 12 μ L. As amostras foram amplificadas em termociclador My Cycler™ (BIO RAD). O programa utilizado para amplificação foi 95°C por 7 min., seguido de 30 ciclos de: 94°C por 1 min. para a desnaturação, 53°C por 1 min. para anelamento e 65°C por 8 min. para a extensão. A extensão final foi realizada a 65°C por 15 min. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose (1,5%) em tampão TBE 0,5X, por eletroforese conduzida a 100 V durante 3 horas. Para cada isolado, cada reação foi repetida pelo menos duas vezes.

O dendrograma foi gerado pelo programa GelCompar II versão 5.10 (Applied Maths, EUA), utilizando-se o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*).

Para os testes de sensibilidade *in vitro* ao cobre, ajustou-se a concentração da suspensão bacteriana em espectrofotômetro para aproximadamente 5×10^8 UFC/mL. Em seguida, depositaram-se alíquotas de 10 μ L em triplicatas, em placas contendo meio CYE (casitone-yeast extract) (Zevenhuizen et al., 1979), contendo 1,7 g/L de casitona; 0,35 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de glicerol e 15 g/L de ágar, suplementado com sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, Merck) nas concentrações de 50, 100 e 200 ppm (μ g/mL). Estas concentrações correspondem a 0,2; 0,4 e 0,8 mM de $CuSO_4$, respectivamente. Alíquotas de todos os isolados avaliados foram depositadas em meio CYE sem suplementação de cobre como controle comparativo para determinação do crescimento conflente. As placas foram incubadas por 72 horas a 28°C, para posterior avaliação de reação de sensibilidade dos isolados. Foram atribuídas classes para as diferentes reações dos isolados ao cobre. Isolados sensíveis (S) foram aqueles que não cresceram na concentração de 50 μ g/mL de sulfato de cobre; moderadamente sensíveis (MS) cresceram a 50 μ g/mL, mas não a 100 μ g/mL; moderadamente insensíveis (MI) cresceram a 100 μ g/mL, mas não a 200 μ g/mL; e isolados insensíveis (I) cresceram a 200 μ g/mL de sulfato de cobre.

Colônias bacterianas características em meio NA, confirmação de reações de hipersensibilidade em fumo e reprodução de sintomas típicos de mancha bacteriana em tomate, caracterizaram os isolados como pertencentes ao gênero *Xanthomonas*.

Oitenta por cento dos isolados foram identificados, segundo perfil genômico gerado por BOX-PCR, como *X. gardneri*, formando um clado com similaridade entre

59,5 e 82,4% com o isolado de referência IBSBF 2373 da espécie (Figura 1). Assim, constatou-se a predominância

desta espécie na região. Epidemias ocasionadas por *X. gardneri* já foram relatadas no país em campos de tomate

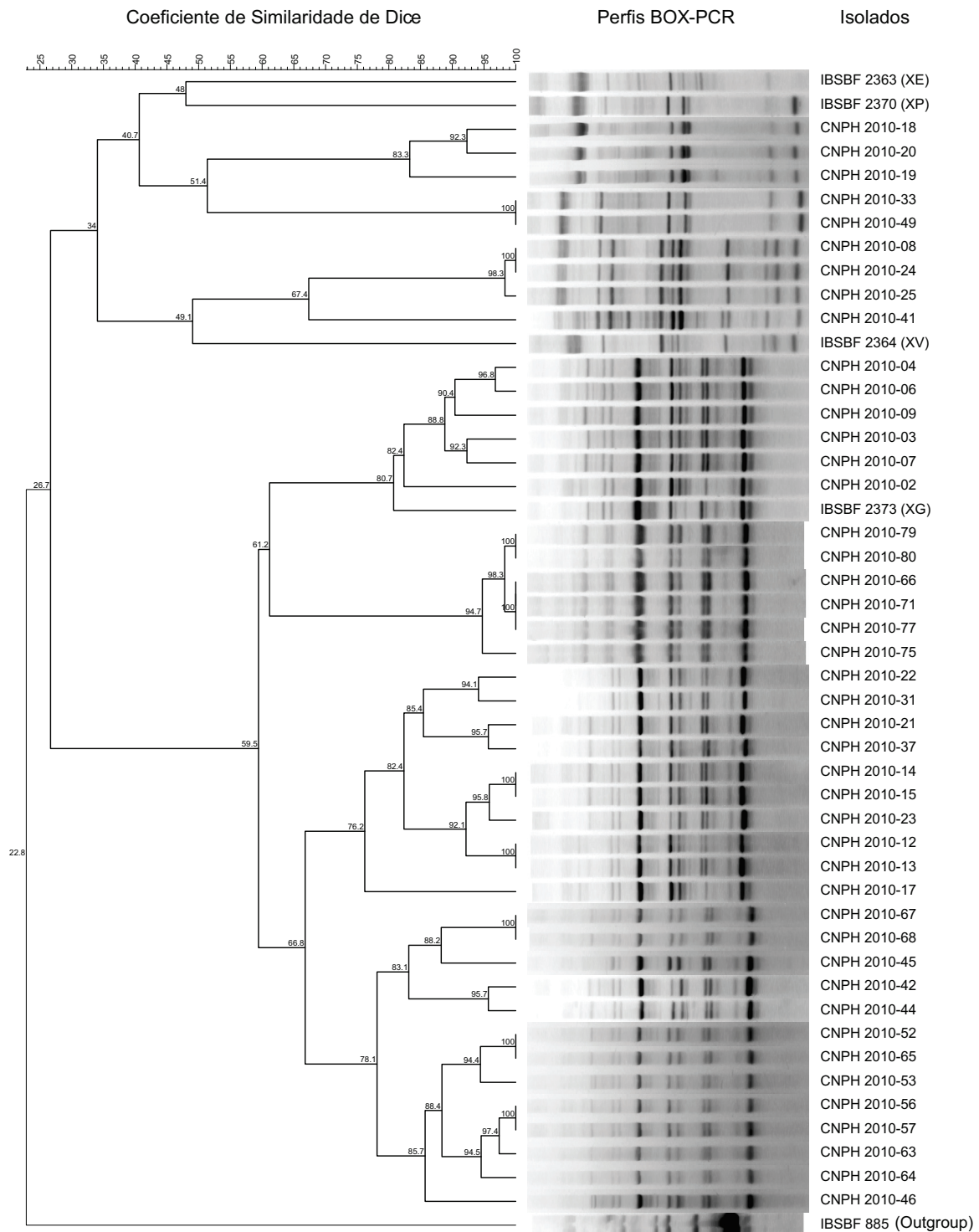


FIGURA 1 - Dendrograma gerado a partir da comparação dos perfis genômicos obtidos por BOX-PCR de 44 isolados de *Xanthomonas* causadores da mancha bacteriana do tomateiro e isolados de referência IBSBF. A análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA e o coeficiente de Dice usado para cálculo de similaridade. Isolado IBSBF 885 de *X. campestris* pv. *aberrans* foi utilizado como *outgroup*. XE = *Xanthomonas euvesicatoria*; XV = *X. vesicatoria*; XP = *X. perforans*; XG = *X. gardneri*.

indústria no estado de Goiás (Quezado-Duval et al., 2004). Em estudo realizado por Pereira et al. (2011), abrangendo algumas regiões produtoras de tomate para mesa, isolados provenientes da região sul do país, em sua totalidade, foram identificados como *X. gardneri*.

Cinco isolados (11%) apresentaram perfis semelhantes (40,7% de similaridade) aos isolados de referência IBSBF 2370 (*X. perforans*) e IBSBF 2363 (*X. euvesicatoria*), que são espécies geneticamente próximas (Hamza et al., 2010). Estes isolados foram identificados como *X. perforans*. Três amplificaram um fragmento de 654 pb contendo o gene *avrXv3*, característico de *X. perforans* e os outros dois foram confirmados com iniciadores específicos para essa espécie. Todos os isolados do presente estudo também tiveram confirmação de suas espécies com seus respectivos iniciadores específicos (Koenraadt et al., 2009), ainda em fase de validação na Embrapa Hortaliças em parceria com a Universidade de Brasília (dados não publicados).

Os demais isolados (9%) foram identificados como *X. vesicatoria*, com similaridade de 49,1 a 67,4% com o isolado de referência da espécie (IBSBF 2364). Já foi relatada alta diversidade dentro do grupo B de *Xanthomonas* causador da mancha bacteriana, aqui tratado como *X. vesicatoria*, a partir de perfis gerados por rep-PCR (Louws et al., 1995). Nenhum isolado foi identificado como *X. euvesicatoria*. Não foi observada nenhuma relação entre variedade de tomate e prevalência de espécies.

É interessante salientar a presença de mais de uma espécie ocorrendo concomitantemente no mesmo campo (Tabela 1), fato ainda não observado nos levantamentos realizados no país, considerando a presença de um complexo de espécies associadas à mancha bacteriana do tomateiro.

Com relação aos testes *in vitro*, 89% dos isolados agruparam-se na classe MI, ou seja, cresceram a 100 µg/mL, mas não a 200 µg/mL de sulfato de cobre. Analisando as respostas por espécies, constatou-se que, dos isolados caracterizados como *X. gardneri*, 86% foram classificados como MI, 11% como MS e 3% como S. Já para os isolados identificados como *X. perforans*, 40% foram S e 60% MI. Apesar do reduzido número de isolados, nota-se que *X. perforans* apresenta maior sensibilidade às menores concentrações de cobre. Os isolados de *X. vesicatoria* agruparam-se da seguinte maneira: 75% MI e 25% I (Figura 2). Apenas um isolado (CNPH 2010-41), caracterizado quanto ao perfil BOX-PCR como *X. vesicatoria*, apresentou insensibilidade ao sulfato de cobre na maior concentração (200 µg/mL). Os demais isolados foram sensíveis a esta concentração. Estes resultados corroboram os trabalhos realizados por Quezado-Duval et al. (2003), em que a totalidade dos isolados avaliados foram sensíveis à concentração de 200 µg/mL. Esta dosagem de aplicação de produtos cúpricos no controle da mancha bacteriana é 10 vezes menor que a recomendada em campo segundo Andrei (2005), indicando que esta concentração ainda é eficiente no manejo da doença. Porém, a constatação da alta incidência de isolados moderadamente insensíveis

TABELA 1 - Identificação de espécie e procedência de campo dos isolados de *Xanthomonas* causadores da mancha bacteriana do tomateiro, provenientes da região de Caçador-SC

Isolado	Campo	Variedade de Tomate	Espécie de <i>Xanthomonas</i>
CNPH 2010-02	1	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-03	1	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-04	1	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-06	1	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-07	1	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-08	1	Paron	<i>X. vesicatoria</i>
CNPH 2010-09	1	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-12	1	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-13	1	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-14	1	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-15	1	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-17	1	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-31	1	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-33	1	Paron	<i>X. perforans</i>
CNPH 2010-18	2	Alambra	<i>X. perforans</i>
CNPH 2010-19	2	Alambra	<i>X. perforans</i>
CNPH 2010-20	2	Paron	<i>X. perforans</i>
CNPH 2010-21	2	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-22	3	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-23	3	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-37	3	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-56	3	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-24	4	Netuno	<i>X. vesicatoria</i>
CNPH 2010-25	4	Netuno	<i>X. vesicatoria</i>
CNPH 2010-41	5	Paron	<i>X. vesicatoria</i>
CNPH 2010-42	5	Netuno	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-57	5	Paron	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-44	6	Mistura varietal	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-45	6	Mistura varietal	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-46	6	Netuno	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-49	7	Paron	<i>X. perforans</i>
CNPH 2010-52	8	Netuno	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-53	8	Netuno	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-63	9	Verona	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-64	9	Vero na	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-65	9	Verona	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-66	9	Verona	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-67	9	Verona	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-68	9	Verona	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-71	9	Verona	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-75	9	Verona	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-77	9	Verona	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-79	9	Verona	<i>X. gardneri</i>
CNPH 2010-80	9	Verona	<i>X. gardneri</i>

(100 µg/mL), pode ser considerada um alerta para o uso mais racional do princípio ativo, de maneira a preservar a eficiência dessa importante ferramenta de controle ao longo do tempo.

A partir da análise dos perfis genômicos gerados por BOX-PCR, observou-se diversidade interespecífica dos isolados associados à mancha bacteriana do tomateiro,

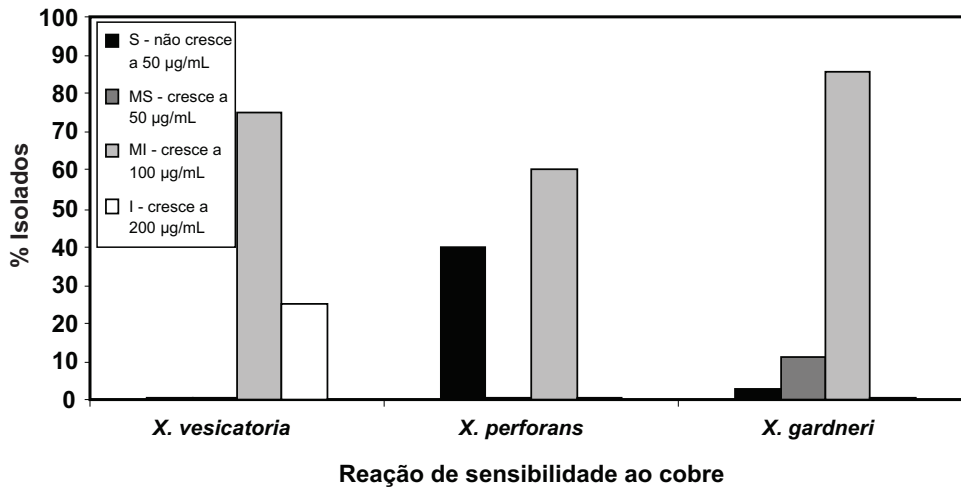


FIGURA 2 - Reação ao cobre de isolados de *Xanthomonas vesicatoria* (n = 4), *X. perforans* (n = 5) e *X. gardneri* (n = 35) causadores da mancha bacteriana do tomateiro. Sensibilidade foi determinada pelo crescimento confluyente em meio CYE suplementado com 50; 100 e 200 µg/mL de sulfato de cobre. S: sensível; MS: moderadamente sensível; MI: moderadamente insensível; I: insensível.

distinguindo claramente a espécie *X. gardneri* das demais, apesar da similaridade dentro desse grupo não ter sido muito elevada. No levantamento anterior feito em lavouras de tomate indústria, no período de 1995 a 2000, a diversidade de *X. gardneri* e de *X. perforans* foi, por sua vez, considerada baixa. Esse fato sugere que essas espécies, aparentemente de introdução mais recente (Quezado-Duval et al., 2004, 2005), estejam se adaptando às condições de cultivo do tomateiro no país.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo suporte financeiro (CNPq Processo 578775/2008-5) e pela bolsa concedida à primeira autora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrei E (2005) Compêndio de Defensivos Agrícolas. 7 ed. São Paulo SP. Andrei Editora.
- Becker WF, Mueller S, Santos JP, Wamser AF, Suzuki A, Marcuzzo LL (2011) Viability of a prediction system for tomato late blight in the integrated production of tomato in Caçador, Brazil. *Horticultura Brasileira* 29:520-525.
- Bouzar H, Jones JB, Stall RE, Louws FJ, Schneider M, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, Jackson LE (1999) Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. *Phytopathology* 89:328-335.
- Camargo FP, Camargo Filho WP (2008) Produção de tomate de mesa no Brasil, 1990-2006: contribuição da área e da produtividade. *Horticultura Brasileira* 26:1018-1021.
- Cuppels DA, Louws FJ, Ainsworth T (2006) Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck

and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Disease* 4:451-458.

Epagri/Cepa (2011) Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2010-2011. Florianópolis SC. Epagri.

Hamza AA, Robene-Soustrade I, Jouen E, Gagnevin L, Lefeuvre P, Chiroleu F, Pruvost O (2010) Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. *Plant Disease* 94:993-999.

Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27:755-762.

Koenraadt H, van Betteray B, Germain R, Hiddink G, Jones JB, Oosterhof J, Rijlaarsdam A, Roorda P, Wouldt B (2009) Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *Acta Horticulturae* 808:99-102.

Kreuz CL, Souza A, Cunha SK, Carvalho Junior LC (2004) Análise de estratégias para os tomaticultores da região de Caçador-SC. Anais. XVII Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural. Cuiabá MT. Sober.

Louws FJ, Fullbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ (1995) Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85:528-536.

Marcuzzo LL, Becker WF, Fernandes JMC (2009) Avaliação de um sistema de previsão para a mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp) do tomateiro. *Agropecuária Catarinense* 22:87-89.

Pereira RC, Araújo ER, Ferreira MASV, Quezado-Duval AM (2011) Ocorrência de *Xanthomonas* species causing bacterial spot in fresh market tomato fields in Brazil. *Acta Horticulturae* 914:61-64.

Quezado-Duval AM, Gazzoto Filho A, Leite Junior RP, Camargo LEA (2003) Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira* 21:672-677.

Quezado-Duval AM, Leite Junior RP, Truffi D, Camargo LEA (2004) Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central-west Brazil. *Plant Disease* 88:157-161.

Quezado-Duval AM, Lopes CA, Leite Junior RP, Lima MF, Camargo LEA (2005) Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. *Acta Horticulturae* 695:101-108.

Quezado-Soares AM, Silva VL, Giordano LB, Lopes CA (1998) Redução na produtividade de tomateiro para processamento industrial devido à mancha bacteriana. *Horticultura Brasileira* 16(Supl.):266. (Resumo).

Rademaker JLW, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, de Bruijin FJ (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology

studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:665-677.

Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St Paul MN. APS Press.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19:6823-6831.

Wilson K (1999) Preparation of genomic bacteria. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Eds.) *Short Protocols in Molecular Biology*. New York NY. John Wiley & Sons Inc. pp.2-14.

Zevenhuizen LPTM, Dolfing J, Eshuis EJ, Scholtern-Koerselman J (1979) Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbial Ecology* 5:139-146.

TPP 339 - Recebido 16 Junho 2011 - Aceito 12 Março 2012
Editor de Seção: Bernardo A. Halfeld-Vieira