**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Xanthomonas campestris* pv.
passiflorae E SENSIBILIDADE A PRODUTOS QUÍMICOS**

ANDREIA KAZUMI NAKATANI

Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Maio - 2001

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Nakatani, Andreia Kazumi

Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* e sensibilidade a produtos químicos / Andreia Nakatani. - - Piracicaba, 2001.
61 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Bactéria fitopatogênica 2. Controle químico 3. Diversidade genética 4. Mancha-bacteriana 5. Maracujá-amarelo I. Título

CDD 634.425

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

Aos meus pais Yoshihiro e
Hiroko e as minhas irmãs
Márcia e Katia, dedico

Agradecimentos

Ao professor Luis Eduardo Aranha Camargo pela orientação, pela amizade e incentivo nos momentos difíceis, exemplo de dedicação, integridade e profissionalismo;

Ao Dr. Rui Pereira Leite Jr. pela minha introdução à Fitopatologia e pelas constantes sugestões e orientações durante o decorrer deste trabalho;

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes, do Departamento de Genética, pelas preciosas sugestões e auxílio durante todo o trabalho;

Ao Professor Dr. Hiroshi Kimati, pelas preciosas sugestões, pelos ensinamentos transmitidos e principalmente pela amizade;

Ao Ricardo Lopes pelo auxílio nas análises estatísticas e pela discussão do trabalho;

Aos colegas do laboratório de Genética Molecular, pela troca de experiências, permitindo um aprendizado e pelo convívio sempre tão agradável;

À Célia pela amizade, que em momentos difíceis, soube dizer palavras confortantes e incentivar a cada etapa do trabalho;

À minha querida irmã Márcia, que com seu auxílio, parte desse trabalho foi possível, meu eterno obrigado;

Ao querido Edeimar, que desde o início dessa caminhada esteve ao meu lado, sempre apoiando, incentivando e compartilhando os momentos felizes e tristes, sempre tão paciente;

Ao CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A cultura do maracujazeiro.....	3
2.2 Mancha bacteriana do maracujazeiro.....	4
2.3 Resistência de bactérias fitopatogênicas a produtos químicos	6
2.4 Variabilidade genética de fitobactérias.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Obtenção e caracterização de isolados de <i>Xanthomonas</i>	
<i>campestris</i> pv. <i>passiflorae</i>	12
3.1.1 Coleta das folhas.....	12
3.1.2 Isolamento da bactéria.....	13
3.1.3 Teste de patogenicidade	13
3.1.4 Caracterização espectrofotométrica do pigmento	
xanthomonadina.....	14
3.2 Avaliação da variabilidade genética de <i>Xanthomonas</i>	
<i>campestris</i> pv. <i>passiflorae</i>	15
3.2.1 Extração de DNA genômico bacteriano.....	15
3.2.2 Genotipagem de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv.	
<i>passiflorae</i> com marcadores RAPD.....	16
3.2.3 Análise da variabilidade genética.....	17
3.3 Avaliação da agressividade dos isolados de <i>Xanthomonas</i>	
<i>campestris</i> pv. <i>passiflorae</i>	17

3.4 Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> a cobre e antibiótico.....	18
3.4.1 Determinação de sensibilidade a cobre.....	18
3.4.2.Determinação da sensibilidade a antibiótico (estreptomicina e oxitetraciclina).....	19
4 RESULTADOS.....	21
4.1 Obtenção e caracterização de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i>	21
4.2 Avaliação da variabilidade genética de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i>	23
4.3 Avaliação da agressividade de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i>	27
4.4 Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> a cobre e antibiótico.....	30
4.4.1 Avaliação da sensibilidade ao cobre.....	30
4.4.2 Avaliação da sensibilidade a antibiótico.....	35
5 DISCUSSÃO.....	39
5.1 Variabilidade genética e patogênica de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i>	39
5.2 Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> a cobre e antibióticos.....	42
6 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
APÊNDICES.....	59

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Espectro de absorção de extrato de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> . A seta indica o pico de absorbância do pigmento xanthomonadina	23
2	Fragmentos de RAPDS gerados a partir da amplificação do DNA genômico de 50 isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> com o oligonucleotídeo OPAA12.....	25
3	Dendrograma gerado a partir da análise de similaridade entre 50 isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> . Calculado com base em fragmentos de RAPD.....	26
4	Agressividade dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> em plantas de maracujá azedo, avaliada no experimento 1 (A) e 2 (B) a partir da área foliar média lesionada, 20 dias após a inoculação. Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.....	29
5	Redução em crescimento de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> nas concentrações 25 ppm (A), 50 ppm (B) e 100 ppm (C) de cobre no experimento 1. Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.....	32

	Página
6 Redução em crescimento de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> nas concentrações 25 ppm (A), 50 ppm (B) e 100 ppm (C) de cobre no experimento 2. Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.....	34
7 Curva de crescimento de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> quando submetidas a várias concentrações de cobre.....	35
8 Redução em crescimento de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> nas concentrações 1.200 ppm (A), 2.400 ppm (B) e 3.600 ppm (C) de antibiótico. Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.....	37
9 Curva de crescimento de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> quando submetidas a várias concentrações de antibiótico.....	38

LISTA DE TABELAS

		Página
1	Município e hospedeiro de origem dos isolados.....	21
2	Número total de fragmentos e de fragmentos polimórficos gerados por 15 oligonucleotídeos.....	24
3	Análise de variância para agressividade de seis isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> (Dados transformados $\sqrt{x+0,5}$).....	27
4	Agressividade média de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> avaliada pela área foliar lesionada em 2 experimentos.....	28
5	Análise de variância da densidade óptica de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> cultivados em meio líquido em três concentrações diferentes de cobre. Primeiro experimento.....	30
6	Análise de variância da densidade óptica de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> em três concentrações de cobre. Segundo experimento.....	33
7	Análise de variância da densidade óptica de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> em três concentrações antibióticos.....	36

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* E SENSIBILIDADE A PRODUTOS QUÍMICOS

Autora: ANDREIA KAZUMI NAKATANI

Orientador: Prof. Dr. LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO

RESUMO

A mancha bacteriana, doença causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, apresenta-se como uma das mais importantes doenças do maracujazeiro, podendo limitar a produção dessa frutífera em algumas regiões do País. O uso de resistência genética e controle químico, juntamente com o emprego de medidas de exclusão, são as práticas de controle da doença mais recomendadas.

Cinquenta isolados patogênicos de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, coletados em áreas produtoras de maracujá, foram genotipados com marcadores do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) afim de se estabelecer o grau de similaridade genética entre eles. Os resultados indicaram que todos os isolados diferiram entre si. Não foi encontrado nenhum isolado idêntico. A análise de agrupamento separou os isolados em 11 diferentes grupos, considerando 90% como valor limite de similaridade genética. Houve um alto grau de variabilidade genética entre os isolados, com valores de 82 a 95%, não havendo contudo correlação aparente entre origens geográficas e similaridade genética. Isso pode ser uma indicativa de que populações de *X. c.* pv. *passiflorae* são compostas por um mosaico de genótipos. Em adição, isolados geneticamente distintos foram isolados de uma mesma planta, indicando a possibilidade de infecções múltiplas.

Com base no dendrograma, os cinco isolados mais divergentes foram selecionados para ensaios de inoculação em plantas de maracujá. Os resultados indicaram a existência de variação em níveis de agressividade entre isolados, verificado pela variação significativa da porcentagem de área lesionada, que

variou de 3,086 a 31,825 cm². Este é o primeiro relato da variação de patogenicidade desta espécie de *Xantomonas* e esses resultados mostraram a importância de se considerar o genótipo bacteriano na seleção de variedades resistentes.

Doze isolados foram testados quanto a sua sensibilidade *in vitro* a cobre e aos antibióticos streptomina e oxitetraciclina. Os isolados de *X. c. pv. passiflorae* apresentaram pouca variação em relação a sensibilidade a cobre quando cultivadas na presença de 100ppm deste elemento. Apesar disto, todos os isolados tiveram seu crescimento reduzido acima de 80% nesta concentração. Nenhuma correlação foi encontrada entre as diferenças na sensibilidade e a origem geográfica dos isolados. Em geral, os mesmos resultados foram encontrados no teste com antibióticos. Algumas diferenças foram encontradas a 1.200 ppm e 2.400 ppm do produto comercial Agrimicina, todos os isolados tiveram seu crescimento reduzido a níveis de 96% a 1.200 ppm e acima de 98% a 2.400. Estes resultados indicam níveis de sensibilidade normal dos isolados coletados e reforçam a importância desses produtos como agentes de controle de *X. c. pv. passiflorae*.

GENETIC DIVERSITY OF *Xanthomonas campestris* pv *passiflorae* and SENSITIVITY TO CHEMICAL PRODUCTS

Author: Andreia Kazumi Nakatani

Adviser: Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo

SUMMARY

The disease bacterial spot, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, is one of the most important disease of passion-fruit, which can limit its production in some regions of Brazil. The use of genetic resistance and chemical control, as well as the adoption of exclusion measures are the more recommended practices for the control of this disease.

Fifty pathogenic isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, collected from production areas, were genotyped with RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA) in order to establish the degree of their genetic similarities. The results indicated that all the isolates differed from each other, i.e., no identical isolates were found. Clustering analysis grouped the isolates in 11 clusters considering 90% of similarity as the threshold value. There was a high degree of genetic variability among isolates, which varied from 82 to 95%, and no apparent correlation between their geographical origin and their clustering pattern, indicating that populations of *Xanthomonas campestris* pv *passiflora* are composed of a mosaic of genotypes. In addition, distinct isolates were found in the same plant, indicating the possibility of multiple infection.

Based on the dendrogram, the five more divergent isolates were selected for inoculation trials in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* plants. The results showed a variation in the aggressiveness, as indicated by significant variation in the percentage of lesioned area, which ranged from 3,086 to 31,825 cm². This is the first report of variation in pathogenicity in *X. c. passiflora* and the results highlights the

importance of considering the genotype of the bacterium during the selection of resistant varieties.

Five isolates were tested for their *in vitro* sensitivity to copper and the antibiotics streptomycin and oxytetracyclin. *X. c. pv. passiflorae* isolates varied slightly regarding their sensitivity to copper when grown in the presence of 100 ppm of this element. Notwithstanding, all isolates had their growth reduced to levels above 80% at this concentration. No correlation was found between the differences in sensitivity and the geographic origin of the isolates. In general, the same results were found in the screening with antibiotics. Albeit some differences were found at 1.200 and 2.400 ppm of the commercial product Agrimicin, all isolates had their growth reduced to levels above 96% at 1.200 ppm and above 98% at 2.400. These results indicate normal sensitivity levels of the bacterium collected from these areas and reinforce the importance of these chemicals as control agents of *X. c. pv. passiflorae*.

1 INTRODUÇÃO

O maracujazeiro é uma planta tropical de sabor exótico e rico em suas propriedades alimentícias, ornamentais e medicinais e cujo cultivo no Brasil, considerado um dos maiores produtores mundiais, está em expansão. As principais espécies cultivadas comercialmente são *Passiflora edulis* (maracujá-roxo), *Passiflora edulis f. flavicarpa* (maracujá-amarelo ou maracujá-azedo) e *Passiflora alata* (maracujá-doce). Dentre os fatores limitantes para produção encontra-se a má qualidade dos frutos, decorrente da presença de patógenos de pré e pós colheita. Neste sentido, a bacteriose do maracujazeiro, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, tem causado danos severos e demonstrado ser fator limitante em algumas regiões produtoras. Juntamente com o emprego de medidas de exclusão, o uso de variedades resistentes e o controle químico são as medidas mais recomendáveis para o controle desta bactéria.

A obtenção de resultados imediatos favorece o uso contínuo de produtos à base de cobre e antibióticos para controlar esta bactéria. Isto, por sua vez, pode resultar na seleção de linhagens resistentes. Devido ao alto custo do controle químico, a resistência do hospedeiro tem tradicionalmente sido utilizada concomitantemente para o controle de doenças de plantas. A diversidade genética do patógeno, no entanto, é um complicador ao desenvolvimento de resistência durável do hospedeiro. Portanto, o estudo da variabilidade genética é um pré-requisito fundamental para qualquer programa de melhoramento (Birch et al., 1997), pois utilizar isolados mais agressivos possibilita uma clara distinção entre genótipos com diferentes graus de

resistência (Mello et al., 1996). Para que seja possível explorar de forma racional e eficiente a resistência genética de *Passiflora* à *Xanthomonas passiflorae* visando obter genótipos com resistência de amplo espectro e duradoura é necessário o conhecimento da variabilidade da agressividade na população do patógeno. A seleção dos isolados a serem utilizados nos teste de agressividade pode ser orientada a partir do estudo da variabilidade genética do patógeno, procurando dessa maneira, representar a população do patógeno utilizando os isolados geneticamente mais divergentes. Gonçalves & Rosato (2000), utilizando marcadores do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), estudaram diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* entre isolados de diferentes estados brasileiros, no entanto, esse é o único relato do estudo da variabilidade genética nesse patógeno encontrado na literatura.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a variabilidade genética e patogênica de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* isolada de regiões produtoras de maracujá e avaliar a sensibilidade destes isolados quanto ao cobre e aos antibióticos oxitetraciclina e estreptomicina combinados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do maracujazeiro

As passifloraceas são bastante cultivadas comercialmente pelo seu valor ornamental e medicinal e principalmente pela qualidade de seus frutos. Os frutos, além de consumidos *in natura*, são utilizados na fabricação de sucos, doces, refrescos e sorvetes. O uso medicinal baseia-se nas propriedades calmantes da passiflorina, sedativo natural encontrado nos frutos e nas folhas (Melletti & Maia, 1999). O valor nutritivo do maracujá, calculado por 100g, corresponde a 30mg de vitamina C, cerca de 700 U.I de vitamina A, 1,63 mg de vitaminas do complexo B, 13 mg de cálcio, 17 mg de fósforo, 1,6 mg de ferro, 2,2g de proteínas e 21,2g de carboidratos (Chitarra & Chitarra, 1990).

O maracujazeiro é uma planta tropical. As espécies cultivadas comercialmente são *Passiflora edulis* (maracujá-roxo), *Passiflora edulis f. flavicarpa* (maracujá-amarelo ou maracujá-azedo) e *Passiflora alata* (maracujá-doce). O maracujá-roxo caracteriza-se por frutos globosos de casca verde antes da maturação, que torna-se posteriormente púrpura, podendo ser consumido na forma de fruta fresca ou ser utilizado para sucos. O maracujá-azedo apresenta formato arredondado e coloração amarela. É mais amplamente cultivado no Brasil e consumido principalmente na forma de suco, representando pelo menos 90% do mercado consumidor. O maracujá-doce possui frutos ovais, de coloração alaranjada e polpa adocicada. Esta variedade ainda apresenta sua comercialização limitada no Brasil pela falta de hábito de consumo,

desconhecida pela maioria da população, sendo consumida exclusivamente como fruta fresca (Bliska et al., 1994).

A cultura do maracujá está em franca expansão no Brasil, com uma área cultivada de aproximadamente 33 mil hectares. As maiores regiões produtoras encontram-se nos Estados de Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, São Paulo e Sergipe (Ribeiro & Mariano, 1997). De acordo com dados do Agrianual (2001), a produção brasileira em 1998 foi de 298 mil toneladas, tendo como líderes na produção os Estados de São Paulo, Bahia, Sergipe e Pará. O Brasil limita-se à exportação do suco da fruta, pois a perecibilidade dos frutos limita a sua exportação (Agrianual, 1998).

No Estado de São Paulo há, atualmente, dois pólos regionais de produção: o tradicional Vale do Ribeira e, mais recentemente, o Planalto Paulista, com concentração de produtores na região de Marília (Rizzi et al., 1998). A estrutura da produção de maracujá em São Paulo revela-se dispersa por vários estabelecimentos, com predominância de pequenos pomares. Dados do Censo Agropecuário 1995/1996 indicaram que, de um total de 482 estabelecimentos, cerca de 70% corresponderam a pomares com menos de 10 hectares. Os pomares entre 100 e 1000 hectares, que representaram apenas 2% do total, participaram com 14% da produção total de maracujá (Melleti & Maia, 1999).

2.2 Mancha bacteriana do maracujazeiro

A mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, tem se destacado como uma das mais importantes doenças, podendo tornar-se fator limitante da produção dessa frutífera em algumas regiões do país. Foi relatada pela primeira vez por Pereira (1968), no Estado de São Paulo. A bactéria, inicialmente denominada de *Xanthomonas passiflorae*, é baciliforme, gram negativa, possui flagelo polar e não forma esporos nem

cápsulas. É aeróbia estrita e apresenta colônias com aspecto mucoso, circulares, convexas, translúcidas, brilhantes de coloração amarelo-cera com bordos regulares. Mais tarde foi reclassificada por Dye et al. (1980), passando a ser denominada *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, classificação atualmente em uso por vários autores (Takatsu, 2000).

A doença tem como sintoma mais evidente manchas foliares verde-escuras e aquosas, de aspecto oleoso e translúcidas, bem delimitadas, levemente angulares. Posteriormente tornam-se mais deprimidas, principalmente na página inferior, ocasionando a seca e desintegração da área do limbo foliar. Nos frutos são observados pequenas áreas verde-escuras e aquosas, que evoluem para áreas circulares irregulares, oleosas de cor pardacenta, superficiais, necróticas, com margens bem definidas, e que tornam o fruto impróprio para o comércio (Teixeira, 1994). Oliveira et al. (1988) também relataram plantas com bacteriose com intensa necrose vascular nas raízes. Em maracujá doce, sintomas como deterioração do albedo, caracterizada por uma podridão mole com anasarca e descoloração seguidos de separação da casca, foram recentemente relatados (Malavolta et al., 1999). A infecção ocorre com maior frequência através dos hidatódios. Posteriormente, ocorre o enegrescimento dos vasos das nervuras a partir do bordo, caracterizando uma forma típica de infecção vascular (Dias & Takatsu, 1987).

A transmissão da bactéria pode dar-se através de mudas contaminadas, caixas de colheita, trabalhadores, máquinas, tratos culturais e, principalmente, sementes contaminadas. Como a bactéria é facilmente transmitida pelas sementes (Ribeiro & Mariano, 1997), seu aparecimento no campo é quase inevitável quando não se dispõem de técnicas eficientes para detecção do patógeno como, por exemplo, métodos baseados na reação em cadeia por polimerase (Leite et al., 1995).

Juntamente com o emprego de medidas de exclusão, o uso de variedades resistentes é a medida de controle mais recomendável. No Brasil, no entanto, existem poucos estudos nesta área (Romeiro, 1995). Kuroda (1981)

observou que *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (maracujá-amarelo) é medianamente resistente, ao passo que *Passiflora alata* (maracujá-doce) é suscetível a mancha bacteriana.

Na cultura do maracujá, os principais defensivos agrícolas com ação contra fitobactérias são os cúpricos e os antibióticos. Torres Filho & Ponte (1994) recomendam formulações de cobre em combinação com mancozeb e estreptomicina. Os cúpricos são recomendados quinzenalmente de maneira preventiva em períodos secos. Já o controle curativo com antibiótico é recomendado em situações críticas, quando a incidência da doença for elevada e as condições climáticas forem favoráveis a bactéria (Rizzi et al., 1998).

2.3 Resistência de bactérias fitopatogênicas a produtos químicos

O uso de produtos químicos constitui-se no principal método de controle de doenças de plantas. A obtenção de resultados imediatos estimula o uso contínuo desses produtos, favorecendo desta forma a seleção de estirpes resistentes. Essa resistência é definida como uma alteração herdável e estável num patógeno em resposta à aplicação de um fungicida resultando numa redução da sensibilidade ao produto (European, 1988), resistência esta caracterizada por um aumento na tolerância de 10 a 50 vezes ao ingrediente ativo (Marco & Stall, 1983). A grande diversidade genética das populações de microrganismos e sua elevada capacidade de multiplicação fornecem uma ampla oportunidade para seleção de linhagens resistentes. Numa população de bactérias sensível a um determinado produto, células com menor sensibilidade ao produto surgem devido à mutação ou outro mecanismo de variabilidade. O produto age favorecendo as linhagens naturalmente resistentes em sua competição com as sensíveis e não como agente mutagênico (Ghini & Kimati, 2000).

Bactericidas têm sido utilizados para o controle de bactérias de plantas há várias décadas, mas o estudo da resistência a esses produtos foi relatado somente em meados de 1980 (Cooksey, 1990). Resistência ao cobre foi constatada pela baixa eficiência do controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* na Flórida (Marco & Stall, 1983), no México (Adaskaveg & Hine, 1985), na Geórgia (Gitaitis et al., 1985), em Oklahoma (Bender & Cooksey, 1990) e na Itália (Buonaurio et al., 1994). No Brasil, Maringoni et al. (1986) não obtiveram resultados satisfatórios no controle da mancha bacteriana em tomateiro causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* com o emprego de bactericidas cúpricos.

Com o uso contínuo de antibióticos como estreptomicina e oxitetraciclina entre 1954 e 1957, também notaram-se falhas no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* em tomate e pimentão (Thayer & Stall, 1961) e de *Erwinia amylovora* em maçã e pêra (Bennet & Billing, 1975; Schroth et al., 1979; Coyier & Covey, 1975; Henkels et al., 1989). Em *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e pv. *papulans*, a resistência à estreptomicina foi observada na década de 80, onde estirpes apresentaram resistência a 100 µg/ml do produto (Spotts & Cervantes, 1995; Burr et al., 1988). Na Flórida, *Xanthomonas dieffenbachiae* mostrou-se resistente a 200-400 ppm de estreptomicina (Knauss, 1972). No Brasil, Leite Jr. & Mohan (1985) verificaram isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes *in vitro* à estreptomicina. No Estado de Goiás, Silva & Lopes (1995) observaram resistência à estreptomicina e oxitetraciclina na concentração de 1000 ppm e 50 ppm, respectivamente. Stall & Thayer (1962) mostraram que a proporção de isolados de bactérias resistentes aumentou rapidamente após sucessivas pulverizações com estreptomicina e oxitetraciclina. Estudos feitos em isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* da Carolina do Norte indicaram que 30% dos isolados foram resistentes a antibiótico e todos esses resistentes também ao cobre (Ritchie & Dittapongpitch, 1991). No México, a maioria das estirpes

testadas foram resistentes ao cobre e estreptomicina (Bouzar et al., 1996; O'Garro, 1998).

Resistência tanto a antibióticos como a cobre pode ser observada *in vitro* através do crescimento de colônias bacterianas em meio suplementados com diferentes níveis destes compostos (Silva & Lopes, 1995). Minsavage et al. (1990) considera nível baixo de resistência bactérias que se desenvolvem em 400 ppm do antibiótico e nível alto em concentrações superiores a 800 ppm. Ritchie & Dittapongpitch (1991), entretanto, consideram resistentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* que se desenvolvem em meio nutriente ágar (NA) suplementados com mais de 20 ppm de sulfato de estreptomicina.

A técnica do disco de papel de filtro imerso em diferentes concentrações do produto e depositado sobre o meio de cultura sólido, acrescido com uma suspensão bacteriana padrão, é amplamente utilizada para avaliar a resistência de um microrganismo, considerando-se isolados resistentes aqueles que não são inibidos pelos discos com bactericidas (Burr et al., 1988). Outra técnica que, de acordo com Gitaitis (1985), melhor possibilita-se a detecção de estirpes resistentes ao bactericida quando comparado ao ensaio com ágar são ensaios em meio líquido suplementados com diferentes concentrações do produto.

A resistência é devido a diferentes mecanismos de resistência a drogas em bactérias. Em *Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae*, Tetaz & Luke (1983) e Mill et al. (1993) verificaram que o cobre é excluído do citoplasma por proteínas que o sequestram. De outro modo, a ação bacteriana pode alterar o estado reduzido do cobre para uma forma mais oxidada e solúvel desta forma menos tóxica (Summers & Silver, 1978).

Os mecanismos envolvidos na resistência à estreptomicina em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* desenvolvem-se de duas maneiras em nível celular: 1) por alteração na afinidade da proteína ribossomal para o antibiótico através da mutação gênica ou 2) destruição dos antibióticos por enzimas periplasmáticas comumente codificadas por genes localizados em

plasmídeos (Minsavage et al., 1990; Stall et al., 1986; Cooksey, 1987; Cooksey et al., 1990; Bender & Cooksey, 1986; Tetaz, 1983). No caso de *Erwinia amylovora*, os dois mecanismos foram descritos (Schroth et al., 1979; Chiou & Jones, 1991).

Na cultura do maracujazeiro, Mello & Oliveira (1987) não obtiveram sucesso no controle da bacteriose com produtos a base de cobre. Romeiro et al. (1998) relataram isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* resistentes a vários antibióticos. No entanto, os mecanismos de resistência desta bactéria a estes agentes químicos permanecem desconhecidos.

2.4 Variabilidade genética de fitobactérias

Devido ao custo do controle químico, a resistência do hospedeiro tem tradicionalmente sido usada para o controle de doenças de plantas apesar da existência de variabilidade na agressividade do patógeno (Balardin et al., 1997). A alteração no grau de agressividade em uma população do patógeno pode ser resultado de mudança genética para uma raça virulenta através de mutação ou recombinação, seguido de seleção ou ainda de introdução de uma nova raça de outra área geográfica através de migração. A diversidade genética do patógeno é um complicador ao desenvolvimento de resistência durável do hospedeiro. Portanto, o estudo da variabilidade genética é um pré-requisito fundamental para qualquer programa de melhoramento (Birch et al., 1997), pois utilizar isolados mais agressivos possibilita uma clara distinção entre genótipos com diferentes graus de resistência (Mello et al., 1996). O desenvolvimento e a implementação de um programa de manejo integrado de doenças pode incluir também o uso de variedades resistentes específicas para diferentes regiões. Assim, a obtenção de variedades resistentes dependerá de um detalhado entendimento da diversidade genética do patógeno na área (Bouzar et al., 1999).

Há vários exemplos na literatura onde informações sobre a diversidade genética e patogênica são necessárias para obtenção de germoplasma resistente. A diferenciação regional de isolados de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* na Ásia, por exemplo sugere que estratégias de melhoramento regionais e desenvolvimento de genes de resistência são necessários, permitindo assim um manejo mais efetivo dos genes de resistência (Adhikari et al., 1995; Nelson et al., 1994). Segundo Raymundo et al. (1999), a diversidade genética de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* foi elevada entre bem como dentro de populações. Através da inoculação de estirpes representando cada haplótipo em diversos cultivares de arroz, foram obtidos grupos de variedades que variaram quanto a reação à doença, mas não houve correlação entre patógenos definidos pelo agrupamento e reação no hospedeiro obtido através do teste de inoculação.

Técnicas moleculares como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Rragment Length Polymorphism), REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic-Polymerase Chain Reaction), amplificação de sequências de rDNA e análise de plasmídeos têm sido amplamente utilizadas com o propósito de avaliar a estrutura genética de populações de patógenos (Adhikari et al., 1995). Quando combinados com dados de virulência e ou agressividade, estes marcadores podem fornecer importantes informações sobre a estrutura genética e evolucionária dos fitopatógenos (Balardin et al., 1997). Análises com enzimas de restrição têm sido usada para várias espécies de bactérias, entre elas *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hartung & Civerolo, 1987), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Raymundo et al., 1999) e *Erwinia* (Darasse et al., 1994). O uso de elementos repetitivos de DNA permite a detecção de elevados níveis de diversidade e avaliação da evolução de estirpes e patótipos (Leach et al., 1992).

Williams et al. (1990) descrevem o RAPD como um processo simples, baseado na amplificação do DNA genômico com um “primer” de sequência arbitrária. Estes “primers” detectam polimorfismos genômicos que podem ser

usados como marcadores genéticos. O RAPD tem sido adaptado tanto para identificação de organismos como para resolução de grupos taxonômicos (Ferreira et al., 1997). Esta técnica mostrou-se mais sensível quando comparada a outros métodos, permitindo a detecção de diferenças entre isolados muito similares (Ferreira et al., 1997; Birch et al., 1997; Wang et al., 1993).

Segundo Jaunet & Wang (1999), quarenta estirpes de *Ralstonia solanacearum* representando um haplótipo principal, foram inoculadas em cultivares de tomate que diferem quanto à resistência à bactéria. Grupos diferiram em níveis de agressividade e especificidade de cultivares foram detectados. Embora a população de *Ralstonia solanacearum* seja altamente diversa quanto ao genótipo e à agressividade, nenhuma associação foi encontrada entre marcadores e agressividade. A falta de associação entre essas duas características e a presença de interação específica de cultivares indica que a análise da população baseada somente em marcadores neutros não é suficiente para entender a diversidade da população do patógeno. Em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, Restrepo & Verdier (1997) encontraram estirpes com diferentes níveis de agressividade, mas nenhuma correlação foi observada entre variação de virulência e polimorfismo de DNA. Adhikari et al. (1999), Balardin et al. (1997), Malvick & Percich (1998) encontraram uma baixa correlação entre haplótipos moleculares e fenótipos de virulência. Essa não associação pode ser explicada pelo fato de haplótipos moleculares serem obtidos através de marcadores neutros sob condições controladas e a virulência ser função do genótipo do hospedeiro e amplamente influenciada pelo meio; a taxa de mutação do patógeno também é muito variável e a interação com cultivar específica não é a única forma de evolução do patógeno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e caracterização de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*

3.1.1 Coleta de folhas

Amostras de folhas infectadas foram coletadas em 3 propriedades produtoras e uma não produtora de maracujá azedo e doce e trazidas para o Laboratório de Genética Molecular da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), onde procedeu-se o isolamento do patógeno.

As propriedades de coletas estão localizadas em Vera Cruz (VC), Holambra (HOL) II (Paranapanema), São Miguel Arcanjo (SMA) e São Pedro (SP) (propriedade não produtora), todas no Estado de São Paulo. De cada propriedade foram obtidos 10 isolados de folhas de maracujá azedo, com exceção de São Miguel Arcanjo, onde foram coletados 10 isolados de folhas de maracujá azedo e 10 de maracujá doce. Também nesta propriedade foram coletadas diferentes folhas com sintomas de uma mesma planta. Estas propriedades diferem pelo modo de condução da cultura e pelo tratamento químico utilizado para o controle da bacteriose. Vera Cruz apresenta ciclo curto (dois anos) e tratamento químico a base de antibiótico (estreptomicina e oxitetraciclina) e de cúpricos; São Miguel Arcanjo apresenta ciclo longo (três anos) e tratamento químico a base de cúpricos; Holambra apresenta ciclo curto

e tratamento químico a base de cúpricos; São Pedro constitui-se em área não comercial e não realiza tratamento químico.

3.1.2 Isolamento da bactéria

Para o isolamento da bactéria, fragmentos foliares de aproximadamente 1cm da região de transição entre a área sadia e doente foram cortados, submetidos a desinfestação superficial com álcool etílico 50% por trinta segundos e transferidos para uma solução comercial de hipoclorito de sódio diluída a 2%, permanecendo por um minuto nesta solução. Os fragmentos foram lavados em água destilada esterilizada, colocados sobre uma lâmina em presença de uma gota de água esterilizada e observados sob microscópio óptico para a presença de fluxo bacteriano. Havendo fluxo bacteriano, os fragmentos foliares foram colocados em tubo de ensaio contendo água esterilizada para a diluição do mesmo. A partir da suspensão bacteriana foi retirada uma gota e realizado o plaqueamento em meio nutriente ágar (NA) (3 g extrato de carne, 8 g de peptona, 15 g de ágar e 1000 ml de água destilada, pH 7,0). As placas foram incubadas por 48 horas à 28 °C. Após a incubação, colônias amarelas individualizadas foram repicadas para placas de Petri contendo meio NA.

3.1.3 Teste de patogenicidade

A patogenicidade dos isolados foi testada por meio de inoculações artificiais com suspensões bacterianas obtidas a partir de colônias puras cultivadas em meio NA durante 48 horas. As colônias foram lavadas com água esterilizada e a suspensão bacteriana padronizada em espectrofotômetro (Hitachi U- 2000) a $OD_{600}=0,3$, o que representa uma concentração aproximada

de 10^8 unidades formadoras de colônias/ml (u.f.c/ml). Foram utilizadas plantas de maracujá azedo com 90 dias de idade, cultivadas em vasos e mantidas em casa de vegetação. O método utilizado foi o do corte com tesoura previamente imersa em suspensão bacteriana (Kaufman et al., 1973). Para cada isolado, foram inoculadas duas plantas e, no caso da testemunha, o inóculo foi substituído por água. Após a inoculação, as plantas foram submetidas à câmara úmida por 48 horas. Os sintomas foram avaliados 10 dias após a inoculação com base na presença ou ausência de lesões típicas.

3.1.4 Caracterização espectrofotométrica do pigmento xanthomonadina

Esta etapa do trabalho foi realizada com a finalidade de certificar se os isolados coletados pertencem ao gênero *Xanthomonas* por meio de detecção do pigmento xanthomonadina, pigmento este produzido por todos os membros deste gênero (Starr et al., 1977; Maringoni et al., 1988). A extração do pigmento foi feita de acordo com Maringoni et al. (1988), onde os isolados foram cultivados em meio nutriente ágar acrescido de glicerol (3 g extrato de carne, 8 g de peptona, 10 ml de glicerol, 15 g de ágar e 1000 ml de água destilada, pH 7,0), durante 96 horas a 28°C. As colônias bacterianas foram suspensas em solução salina esterilizada (NaCl a 0,85%) e a concentração padronizada por colorimetria a $OD_{600}=3\%$ de transmitância e centrifugadas a 6.050g, durante 20 minutos. O precipitado foi suspenso em 1.5 ml de metanol para cada 10 ml de cada suspensão. As células bacterianas suspensas foram aquecidas a 90 °C durante 5 minutos, resfriadas e centrifugadas a 3.700g durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram submetidos à leitura em espectrofotômetro (Hitachi U-2000), em comprimentos de onda de 300 a 600 nm, para observação de pico máximo de absorbância entre 442 e 446 nm.

3.2 Avaliação da variabilidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*

3.2.1 Extração de DNA genômico bacteriano

Colônias puras de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* crescidas em nutriente ágar foram raspadas com auxílio de uma ponteira estéril, transferidas para nutriente líquido e incubadas durante 12 horas sob agitação. A extração de DNA foi feita segundo protocolo de Ausubel et al. (1992). Uma alíquota de 1,5 ml da suspensão bacteriana ajustada para uma concentração de $OD_{600}=0,3$ foi centrifugada por 2 minutos a 17.100g, descartando o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensionado em 1 ml de água destilada e novamente centrifugado a 17.100g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 567 µl de tampão Tris-EDTA (10mM Tris –HCL; 1mM EDTA pH 8,0), 30 µl de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 10% e 3 µl de proteinase K (20 mg/ml) e incubado por 1,5 h a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 100 µl de NaCl 5M e misturou-se intensamente. Para complexar os polissacarídeos e proteínas residuais, foram acrescentados 80 µl de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio)/NaCl (4,1G NaCl e 10,0 g de CTAB em 10 ml) a cada tubo e estes incubados por 10 minutos a 65 °C. Para extração dos resíduos, adicionou-se 780 µl de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1) seguido de agitação e centrifugação por 5 minutos em velocidade máxima. O sobrenadante aquoso foi removido para novo tubo, adicionando-se igual volume de fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1). Este foi agitado intensamente e posteriormente centrifugado a 17.100g. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e a estes adicionado isopropanol (0,6x o volume do sobrenadante). Após a incubação por 10 minutos a –70 °C, o tubo foi centrifugado por 20-25 minutos a 17.100g. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 10 minutos em velocidade máxima. O sobrenadante foi

removido cuidadosamente e em seguida o precipitado foi ressuspenso em 100 µl de tampão TE. Em seguida o DNA de cada isolado foi quantificado com auxílio de fluorômetro (DyNA Quant 200, Hoefer). Alíquotas de 1 µl foram retiradas da amostra original e diluídas em 1 ml de tampão de leitura (0,1 % bis-benzimida; 10x TNE), obtendo-se o valor da concentração em ng/µl. Para verificar a integridade das amostras de DNA, alíquotas de 5µl foram retiradas dos estoques e analisadas em gel de agarose 0,8 %.

3.2.2 Genotipagem de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* com marcadores RAPD

Após a extração do DNA dos 50 isolados, estes foram submetidos a amplificações de PCR com os oligonucleotídeos OPAA (1, 4, 6, 9, 17, 16, 7, 12, 2, 3, 15) e OPAB (1, 14, 17, 05) produzidos pela Operon Technologies Inc. (Alameda, CA, EUA) em termociclador PTC-100 (MJ. Research, Alameda, CA, EUA), com adaptações às condições descritas por Gomes et al. (1995). As amostras foram submetidas a desnaturação inicial a 92 °C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos a 92 °C por 1 minuto, 37 °C por 2 minutos e 72 °C por 2 minutos. Ao final, seguiu-se uma extensão de 72 °C por 3 minutos. As reações foram realizadas em volume final de 20 µl, contendo 30 ng de iniciador, 1U de Taq DNA polimerase (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), 2,5 µl de 10x de tampão e 0,2 mM de mistura de dNTP. As concentrações finais de DNA e MgCl₂ foram estabelecidas posteriormente após otimização da reação. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em tampão TBE 1X em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo na concentração de 5µg/ml à 70 volts. Após a corrida, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta, com o auxílio de um transiluminador UV e fotografados com aparelho fotodocumentador Pharmacia Biotech Image Master VDS (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EUA).

3.2.3 Análise da variabilidade genética

Uma matriz binária foi construída a partir da leitura dos géis, onde foram considerados somente fragmentos intensos que foram identificados como 1 quando presentes e zero quando ausentes em determinado isolado. Nesta matriz, isolados estão em linhas e fragmentos de RAPD colunas. Os dados binários foram utilizados para calcular a distância genética entre pares de isolados segundo o coeficiente de Dice, $F = 2 n_{ab} / (n_a + n_b)$, onde n_{ab} é presença de bandas nos isolados a e b; n_a presença de bandas no isolado a e não no isolado b; n_b presença de bandas no isolado b e não no isolado a. Esse coeficiente não considera a ausência de bandas (Sneath & Sokal, 1973). Os isolados foram agrupados através do método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average), para construção do dendrograma com auxílio do programa NTSYS-pc versão 1.70 (Applied Biostatistics, 1992)

3.3 Avaliação da agressividade dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*

Neste estudo, os isolados mais geneticamente divergentes entre si, segundo os resultados da análise por RAPD, foram utilizados em ensaios de agressividade. Para tanto, foram utilizadas plantas com 90 dias de idade de maracujá azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) cultivar Sul Brasil, cultivadas em vasos e mantidas em casa de vegetação. Placas de Petri com colônias crescidas por 72 horas foram lavadas com água destilada com auxílio de alça de Drigalsky, resultando numa suspensão que foi calibrada em espectrofotômetro (Hitachi U- 2000) a $OD_{600}=0.3$ (10^8 UFC/ml). O método de inoculação utilizado foi o do corte com tesoura previamente imersa em suspensão bacteriana (Kaufman et al., 1973). No caso das testemunhas, o

inóculo foi substituído por água. Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida por 48 horas. A distribuição dos vasos foi aleatorizada num delineamento estatístico em blocos ao acaso com 5 repetições, sendo cada parcela constituída por um vaso contendo duas plantas. O experimento foi repetido duas vezes.

Vinte dias após a inoculação, as folhas inoculadas foram removidas e a área da lesão desenhada em folha plástica transparente e medida usando-se um medidor de área foliar Li-cor (Li-3100, Nebraska, EUA). A variável área foliar lesionada (AFL), medida em cm^2 , foi usada para os testes estatísticos.

3.4 Avaliação *in vitro* da sensibilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* a cobre e antibiótico

3.4.1 Determinação da sensibilidade a cobre

Doze isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* foram testados para sensibilidade ao cobre através do cultivo em meio nutriente líquido contendo diferentes concentrações deste fungicida. Cinco isolados de Vera Cruz, cinco de Holambra e dois de São Pedro foram cultivados em 30 ml de nutriente líquido sob agitação constante durante 12 horas a 28 °C. A suspensão bacteriana foi padronizada em espectrofotômetro (Hitachi U- 2000) a uma densidade óptica de 0.3 (10^8 u.f.c/ml). Retirou-se uma alíquota de 1 ml da suspensão bacteriana de cada isolado e acrescentou-se 3 ml de nutriente líquido e alíquotas de oxicleto de cobre para se obter as concentrações finais de 25, 50, 100 ppm, num tubo de 15 ml. Para o preparo do oxicleto de cobre, este foi dissolvido em água estéril e seu pH ajustado a 7,0 com ácido clorídrico 1M em pHmetro (DM 20, Digimed, São Paulo, Brasil).

Foi realizada uma primeira leitura em espectrofotômetro a 600 nm da suspensão dos tubos com a finalidade de observar a interferência do fungicida

na colorimetria. Os tubos foram incubados a 28 °C sob agitação constante durante 24 horas. Cada tratamento foi repetido quatro vezes e o experimento foi repetido duas vezes. A avaliação da sensibilidade bacteriana ao cobre foi feita através da segunda leitura da densidade óptica (O.D.) do conteúdo dos tubos em espectrofotômetro a 600nm e a redução de crescimento foi obtida através da multiplicação da leitura das densidades ópticas de cada amostra por 100 e dividida pela densidade óptica da testemunha. As O.D.s extremas foram diluídas em série e plaqueadas quando então procedeu-se a contagem do número de colônias.

3.4.2 Determinação da sensibilidade a antibiótico (estreptomicina e oxitetraciclina)

A determinação da sensibilidade ao antibiótico foi realizada *in vitro* através do cultivo da bactéria em meio nutriente líquido contendo diferentes concentrações do antibiótico. Os mesmos cinco isolados usados no ensaio anterior foram cultivados em 30 ml de nutriente líquido e incubados a 28 °C durante 12 horas sob agitação. Essas suspensões bacterianas foram ajustadas a $OD_{600}=0,3$, através de leitura em espectrofotômetro (Hitachi U- 2000). Uma alíquota de 1 ml da suspensão bacteriana de cada isolado foi retirada e acrescentada à respectiva concentração de antibiótico e completadas para um volume de 5 ml de caldo nutriente. No preparo do antibiótico, Agrimicina (estreptomicina e a oxitetraciclina) foi dissolvida em água estéril e esterilizada por filtração com filtro millipore 0,2 μm (Schleicher & Schuell). O pH foi ajustado a 7,0 com ácido clorídrico 1M. As concentrações finais de antibióticos utilizadas foram 0; 1.200 ppm (1,09g ia estreptomicina; 0,109g ia oxitetraciclina); 2.400 ppm (2,18g ia estreptomicina; 0,218g ia oxitetraciclina) e 3.600 ppm (3,272g ia de estreptomicina; 0,327g ia de oxitetraciclina) do produto comercial. Foi realizada uma primeira leitura da densidade óptica do conteúdo

dos tubos em espectrofotômetro a 600 nm, com o objetivo de observar a interferência da cor do produto na avaliação para, em seguida, incubá-los a 28°C sob agitação constante durante 24 horas. Cada tratamento foi repetido quatro vezes.

A avaliação da sensibilidade bacteriana ao antibiótico foi feita através da segunda leitura da densidade óptica do conteúdo dos tubos em espectrofotômetro a 600nm. A redução de crescimento foi obtida através da multiplicação da leitura das densidades ópticas de cada amostra por 100 e dividida pela densidade óptica da testemunha. As O.D.s extremas foram diluídas em série e plaqueadas, quando então procedeu-se a contagem do número de colônias.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção e caracterização de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*

Cinquenta isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* foram coletados nas quatro propriedades (Tabela 1). Alguns isolados foram coletados na mesma planta e identificados pelo mesmo número acrescido de uma letra. Estes isolados foram inoculados artificialmente em plantas de maracujá azedo (*Passiflora edulis*). Todas as plantas inoculadas desenvolveram sintomas típicos da doença, demonstrando a patogenicidade dos isolados (dados não apresentados).

TABELA 1. Município e hospedeiro de origem dos isolados.

Isolado	Origem	Hospedeiro ^{1/}
1	Vera Cruz	MA
2	Vera Cruz	MA
3	Vera Cruz	MA
4	Vera Cruz	MA
5	Vera Cruz	MA
6	Vera Cruz	MA
7	Vera Cruz	MA
8	Vera Cruz	MA
9	Vera Cruz	MA
10	Vera Cruz	MA
15b	São Miguel Arcanjo	MA
16a	São Miguel Arcanjo	MA
17b	São Miguel Arcanjo	MA
18l	São Miguel Arcanjo	MA

Continua

Continuação

Isolado	Origem	Hospedeiro ^{1/}
18b	São Miguel Arcanjo	MA
19a	São Miguel Arcanjo	MA
19c	São Miguel Arcanjo	MA
20a	São Miguel Arcanjo	MA
19b	São Miguel Arcanjo	MA
21a	São Miguel Arcanjo	MA
57	São Miguel Arcanjo	MD
46	São Miguel Arcanjo	MD
52	São Miguel Arcanjo	MD
18a	São Miguel Arcanjo	MD
13a	São Miguel Arcanjo	MD
47	São Miguel Arcanjo	MD
40	São Miguel Arcanjo	MD
50	São Miguel Arcanjo	MD
43	São Miguel Arcanjo	MD
42	São Miguel Arcanjo	MD
79	Holambra	MA
78	Holambra	MA
73	Holambra	MA
72	Holambra	MA
85	Holambra	MA
86	Holambra	MA
82	Holambra	MA
89	Holambra	MA
76	Holambra	MA
83	Holambra	MA
Xy	São Pedro	MA
Z	São Pedro	MA
W	São Pedro	MA
Ww	São Pedro	MA
119	São Pedro	MA
110	São Pedro	MA
116	São Pedro	MA
X	São Pedro	MA
122	São Pedro	MA
115	São Pedro	MA

^{1/} MA: Maracujá azedo e MD: Maracujá doce.

Os isolados foram posteriormente analisados quanto à presença do pigmento xanthomonadina. No gênero *Xanthomonas*, este pigmento apresenta pico máximo de absorbância entre 442 e 446 nm (Starr et al., 1977) (Figura 1). Os resultados demonstraram que todos os isolados pertencem ao gênero *Xanthomonas*.

FIGURA 1. Espectro de absorção de extrato de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. A seta indica o pico de absorbância do pigmento xanthomonadina.

4.2 Avaliação da variabilidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*

A amplificação do DNA gênomico dos 50 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, com quinze oligonucleotídeos gerou 113 fragmentos, dos quais 71 foram polimórficos (Tabela 2; Figura 2). Os isolados foram genotipados para os 113 marcadores levando-se em conta a presença/ausência de fragmentos e os genótipos usados para construção de um dendrograma (Figura 3).

Através do dendrograma foi possível agrupar os isolados em 11 grupos (I-XI), considerando-se um valor limite de 0,9 de similaridade (Figura 3), onde foram observados três agrupamentos maiores. No grupo I prevaleceram os isolados de Vera Cruz e de maracujá azedo de São Miguel Arcanjo, com exceção do isolado VC 9 que agrupou com o grupo IX. No segundo agrupamento ficou a maioria dos isolados de maracujá doce de São Miguel Arcanjo e alguns isolados coletados de maracujá azedo. Os isolados 19a, 19b e 19c, coletados na mesma planta se agruparam separadamente. No terceiro, quarto e quinto agrupamentos foi possível observar uma mistura de isolados incluindo isolados de São Miguel Arcanjo, Holambra e São Pedro (Figura 3).

TABELA 2. Número total de fragmentos e de fragmentos polimórficos gerados por 15 oligonucleotídeos.

Oligonucleotídeo	Número total de fragmentos	Número de fragmentos polimórficos
OPAA 1	5	5
OPAA 2	10	3
OPAA 3	11	4
OPAA 4	5	5
OPAA 6	5	5
OPAA 7	7	5
OPAA 9	6	6
OPAA 12	9	3
OPAA 16	6	6
OPAA 17	7	4
OPAB 1	14	7
OPAB 14	5	1
OPAA15	11	8
OPAB 17	6	6
OPAB 5	6	3
TOTAL	113	71

Com base nestes resultados, os isolados VC 1, SMA 18b, SMA 57, HOL 89 e SP 122 foram selecionados para o teste de agressividade.

FIGURA 2. Fragmentos de RAPDs gerados a partir da amplificação do DNA genômico de 50 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* com o oligonucleotídeo OPAA12.

FIGURA 3. Dendrograma gerado a partir da análise de similaridade entre 50 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. Calculado com base em fragmentos de RAPD.

4.3 Avaliação da agressividade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*

Os resultados obtidos a partir da ANOVA mostraram diferenças significativas em agressividade entre isolados (Tabela 3).

TABELA 3. Análise de variância para agressividade de seis isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. (Dados transformados $\sqrt{x+0,5}$).

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Tratamentos (Isolados)	5	27.8046	47.497*
Experimento	1	0.7842	1.340
Isolado x Experimento	5	5.8453	9.985*
Erro	48	0.5853	
C.V.	23.267		

* Significativo em nível de 5% pelo teste F

Na Tabela 4 observa-se uma alteração na ordem da agressividade do isolado VC1 que, no segundo experimento, passa a ser o quarto isolado mais agressivo. Apesar da alteração no *ranking* de agressividade foi possível detectar variabilidade dos isolados em relação à agressividade.

TABELA 4. Agressividade média de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* avaliada pela área foliar lesionada em dois experimentos.

Isolados	Experimento 1 ^{1/}	Experimento 2 ^{1/}
Testemunha	0.000 c	0.000 d
VC 1	30.850 a	11.451 bc
SMA. 18b	31.825 a	24.677 a
SMA 57	3.086 bc	7.354 c
Hol 89	5.064 bc	17.347 ab
SP 122	13,196 b	18.335 a

^{1/} Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O comportamento dos cinco isolados de *X. campestris* pv. *passiflorae* (VC 1, SMA. 18b, SMA 57, Hol 89, SP 122), quanto a agressividade em plantas de maracujá azedo nos experimentos 1 e 2 são apresentados nas Figuras 4 A e 4 B, respectivamente. No experimento um (Figura 4A), os isolados SMA 18b e VC 1 diferiram significativamente dos demais isolados, ao passo que o isolado SP 122 diferiu estatisticamente dos isolados SMA 18b e VC 1 e da testemunha.

O isolado SMA 18b mostrou-se mais agressivo nos dois experimentos. No experimento dois (Figura 4B), os isolados SMA 18b e SP 122 diferiram estatisticamente dos isolados SMA 57 e VC 1. O isolado SMA 57 diferiu significativamente dos isolados SP 122 e SMA 18b.

FIGURA 4. Agressividade dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em plantas de maracujá azedo, avaliada no experimento 1 (A) e 2 (B) a partir da área foliar média lesionada, 20 dias após a inoculação. Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

4.4 Avaliação *in vitro* da sensibilidade dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* a cobre e antibióticos

4.4.1 Avaliação da sensibilidade ao cobre

Os resultados obtidos a partir da ANOVA no primeiro experimento (Tabela 5), mostraram resultados significativos para isolados, concentrações de cobre e interação entre essas duas variáveis. Dessa maneira, o comportamento dos diferentes isolados foi estudado para cada concentração separadamente.

TABELA 5. Análise de variância da densidade óptica de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* cultivados em meio líquido em três concentrações diferentes de cobre. Primeiro experimento.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Isolados	11	330.6816	3.766*
Concentrações de Cobre	2	840.5175	9.571*
Isolados X Concentração de cobre	22	268.3167	3.055*
Erro	108	87.8185	
C.V.	10.015		

* Significativo em nível de 5% pelo teste F

Observa-se na Figura 5A que a maioria dos isolados apresentou 100% de redução no crescimento na concentração de 25 ppm, com exceção dos

isolados HOL 78 e HOL 82 que diferiram estatisticamente entre si e em relação aos demais isolados.

Na Figura 5B, observa-se que somente o isolado VC 7 diferenciou-se dos demais isolados na concentração de 50 ppm.

Na Figura 5C todos os isolados apresentaram o mesmo comportamento, não diferindo estatisticamente entre si em relação à redução do crescimento.

Os resultados obtidos a partir da ANOVA do segundo experimento (Tabela 6), mostraram resultados significativos para isolados, concentrações de cobre e interação isolado e concentração de cobre. Devido a interação, o comportamento dos isolados para cada concentração foi analisado separadamente.

Através do teste de médias para cada concentração de cobre foi possível analisar o comportamento dos doze isolados em relação às 3 concentrações. De acordo com a Figura 6A, notou-se comportamento diferenciado dos isolados quando submetidos à concentração de 25 ppm do produto. Os isolados VC 3 e VC 5 não diferiram entre si, mas diferiram estatisticamente dos demais isolados. O mesmo comportamento foi observado entre VC 1 e HOL 83. O isolado HOL 82 diferiu estatisticamente dos isolados VC1, VC3, VC5, VC 7, VC 9, HOL 72, HOL 78, HOL83, SP 115, SPW.

Quando os isolados foram submetidos à 50 ppm do produto, observou-se que o isolado VC5 diferiu estatisticamente dos isolados VC7, VC9, HOL72, HOL 78, HOL 86, HOL83, HOL82, SP115 e SP W, embora não tenha diferido estatisticamente dos isolados VC1 e VC3 (Figura 6B). Na concentração de 100 ppm somente o isolado HOL 83 diferiu estatisticamente dos isolados VC1, VC7 e HOL 72, mas seu comportamento não diferiu dos demais isolados (Figura 6C).

FIGURA 5. Redução em crescimento de isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* nas concentrações 25 ppm (A), 50 ppm (B) e 100 ppm (C) de cobre no experimento 1. Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

TABELA 6. Análise de variância da densidade óptica de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em três concentrações de cobre. Segundo experimento.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Isolados	11	3287.336	39.772*
Concentrações de Cobre	2	8711.307	105.394*
Isolados X Concentração de cobre	22	1457.581	17.635*
Erro	108	82.6543	
C.V.	10.695		

* Significativo em nível de 5% pelo teste F

Através das leituras de densidade óptica dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* tratadas com cobre, seguidas das diluições em série, plaqueamento e contagem, foi possível construir uma curva de calibração (Figura7), para servir de parâmetro para se calcular, através da densidade óptica, o número de unidades formadoras de colônias (ufc/ml).

FIGURA 6. Redução em crescimento de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* nas concentrações 25 ppm (A), 50 ppm (B) e 100 ppm (C) de cobre no experimento 2. Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Figura 7. Curva de crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* quando submetidas a várias concentrações de cobre.

4.4.2 Avaliação da sensibilidade a antibióticos

Os resultados obtidos a partir da ANOVA (Tabela 7) mostraram resultados significativos para isolados, concentrações de antibióticos. Dessa maneira, o comportamento dos diferentes isolados foi estudado para cada concentração separadamente.

TABELA 7. Análise de variância da densidade óptica de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em três concentrações de antibióticos.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Isolados	11	9.4946	6.287*
Concentração de antibiótico	2	9.4380	6.250*
Isolados x Concentração de antibiótico	22	2.1478	1.44
Erro	108	1.5102	
C.V.	1.245		

* Significativo em nível de 5% pelo teste F

Através do teste de médias para cada concentração de antibiótico foi possível avaliar o comportamento dos doze isolados em relação às três concentrações separadamente. De acordo com a Figura 8A observa-se que os isolados não diferiram estatisticamente entre si. Quando esses isolados foram submetidos à 2.400 ppm, os isolados HOL 82 diferiu significativamente dos isolados VC 1, VC 9, HOL 72, HOL 86. O isolado SPW diferiu estatisticamente somente do isolado VC 9 (Figura 8B). Na Figura 8C todos os isolados apresentaram comportamento semelhante, com redução de crescimento próximo a 100%, não diferindo estatisticamente entre si.

Figura 8. Redução em crescimento de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* nas concentrações 1.200 ppm (A), 2.400 ppm (B) e 3.600 ppm (C) de antibiótico. Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Através das leituras de densidade óptica dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* tratadas com antibiótico, seguidas das diluições em séries, plaqueamento e contagem, foi possível construir uma curva de calibração (Figura 9) para servir de parâmetro para se calcular através da densidade óptica o número de unidades formadoras de colônias (ufc/ml).

Figura 9. Curva de crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* quando submetidas à várias concentrações de antibiótico.

5 DISCUSSÃO

5.1 Variabilidade genética e patogênica de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*

O desenvolvimento de variedades resistentes de maracujazeiro tornou-se fator fundamental para o desenvolvimento da cultura em decorrência do aumento na demanda de consumo do suco da fruta. Tal aumento foi verificado a partir da década de 80 em resposta a estímulo da indústria (www.maracuja.com.br) e resultou na expansão da cultura no Estado de São Paulo como uma alternativa ao plantio do cafeeiro em pequenas propriedades. No mercado, existem apenas três híbridos de maracujá amarelo desenvolvidos pelo Instituto Agronômico de Campinas (híbridos da série IAC 270) que, no entanto, não apresentam satisfatório nível de resistência a *X. c. pv. passiflorae*.

Qualquer programa de seleção visando a resistência exige um conhecimento prévio da variabilidade genética do patógeno. Na literatura, no entanto, existe apenas um trabalho sobre variabilidade de *X. c. pv. passiflora*. Gonçalves & Rosato (2000) mostraram a existência de elevado grau de polimorfismo entre isolados da bactéria coletados de sete estados brasileiros por meio de marcadores RAPDs e outros marcadores. Foram encontrados níveis de similaridade variando de 35% a 85%. Os autores encontraram também uma correlação entre região de origem dos isolados e o agrupamento obtido por meio da análise dos marcadores RAPDs, demonstrando que isolados

de uma região são mais geneticamente semelhantes entre si do que quando comparados a de outras regiões.

O presente trabalho, ao contrário de Gonçalves & Rosato (2000), revelou uma maior homogeneidade genética entre os 50 isolados estudados, com valores de similaridade variando entre 82-95%. Tal fato pode ser decorrente da amostragem usada. No presente trabalho só foram comparados isolados provenientes do Estado de São Paulo. Considerando que a variabilidade genética em nível de patovar, na maioria das vezes, é resultado de isolamento geográfico (Norman et al., 1999; Mehta et al., 2000), então quanto menor a região geográfica amostrada, maiores serão os níveis de similaridade genética. Em todo caso, os dois trabalhos são consoantes com relação ao fato de que nenhum identificou isolados geneticamente idênticos, o que permite concluir que populações de *X. c. pv. passiflora* são compostas por um mosaico de genótipos. Isto, por sua vez, pode ser devido ao fato de a América do Sul ser o centro de origem e de diversidade genética do gênero *Passiflora* (Dias, 1990), uma vez que os centros de diversidade da hospedeira também são centros de diversidade do patógeno (Leppik, 1970).

A análise do dendrograma não revelou correlação entre agrupamentos, definidos em nível de 90% de similaridade, e origem dos isolados, ao contrário do trabalho de Gonçalves & Rosato (2000). De mesmo modo, isolados coletados de maracujá doce em São Miguel Arcanjo não constituíram um agrupamento homogêneo, indicando ausência de elevado grau de diferenciação genética entre isolados que infectam maracujá doce e azedo. Isto também pode ser considerado reflexo da diferença da amplitude geográfica amostrada entre os dois trabalhos conforme discutido acima. Considerando que quanto menor a região amostrada maior será a chance de fluxo gênico entre populações, conseqüentemente menor será a variabilidade genética entre indivíduos de populações diferentes. O fluxo gênico, no caso de plantios do Estado de São Paulo, certamente ainda pode ter sido facilitado pela troca de materiais vegetais (mudas e sementes) entre as regiões produtoras. No início dos plantios de

maracujá na região de São Miguel Arcanjo, por exemplo, produtores dessa região buscavam sementes de áreas produtoras como Vera Cruz ou, ainda, obtinham sementes a partir de frutos comercializados (Y. Nakatani, comunicação pessoal). Intensificação de fluxo gênico por meio de trânsito de sementes contaminadas é possível no caso de *X. c. pv. passiflorae*, a exemplo de outras espécies do gênero que sabidamente são disseminadas por esta via, tal como *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* (Leite Jr. et al., 1995) e *Xanthomonas campestris* pv. *cerealis*. Segundo Dias (1990), a incidência de *X. c. pv. passiflorae* em sementes, pode chegar a 1,8%.

A análise de isolados coletados de uma mesma planta por meio de RAPD permitiu identificar casos de infecção mista, caracterizados pela infecção por mais de um haplótipo. Tal fato ilustra o conhecido comportamento infeccioso da bactéria na cultura.

A análise com RAPDs serviu de base para selecionar isolados geneticamente divergentes que foram usados nos ensaios de patogenicidade, numa tentativa de maximizar as chances de detectar variações em agressividade em *X. c. pv. passiflorae*. A comparação de médias mostrou diferenças significativas em agressividade, avaliada pela área foliar lesionada, entre os cinco isolados testados. Embora o ordenamento dos demais isolados não foi o mesmo nos dois experimentos, não houve diferença significativa entre experimentos. No entanto, o fator isolado x experimento foi significativo, o que limita a discussão dos testes de comparação de médias. Assim, comparando-se apenas as agressividades médias entre experimentos dos isolados extremos, nota-se uma diferença dramática; a média do menos agressivo (SMA 57) foi 81% inferior a do isolado mais agressivo (SMA 18b). É interessante salientar que ambos isolados foram coletados no mesmo local (São Miguel Arcanjo), evidenciando que, a exemplo do elevado grau de variabilidade genética detectado por RAPDs, também se nota elevada variabilidade em agressividade em *X. c. pv. passiflorae*. Este é o primeiro relato de variabilidade em agressividade deste patógeno em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Em seu

trabalho, Gonçalves & Rosato (2000) fizeram testes de patogenicidade em folhas destacadas de *P. alata*, mas não encontraram variabilidade. Do ponto de vista prático, este resultado salienta a necessidade de levar em conta os genótipos dos isolados bacterianos que vierem a ser utilizados em programas de seleção. O uso de isolados mais agressivos é desejável por proporcionar mais rigor na seleção. Por outro lado, possibilita também um melhor discernimento entre materiais resistentes e suscetíveis.

Variações em agressividade ocorrem aparentemente em todas as bactérias fitopatogênicas como *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Alves & Takatsu, 1984), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Henz et al., 1988) e *Pseudomonas solanacearum* (Morgado et al., 1992). No caso do maracujá, a variabilidade em agressividade aqui relatada pode explicar informações contraditórias na literatura sobre a resistência de espécies de *Passiflora*. Rodrigues Neto et al. (1984) relataram uma maior suscetibilidade de *P. alata* em relação a *Passiflorae edulis* f. *flavicarpa*, ao passo que Oliveira et al. (1980) verificaram o contrário. Considerando que existem mais de três centenas de espécies de passifloráceas, é possível que existam até mesmo outros patovares de *Xanthomonas campestris* afetando passifloráceas. Em contrapartida, considerando que a América do Sul é o centro de origem do maracujá, é razoável supor que deve existir grande variabilidade para resistência a *X. c.* pv. *passiflorae* em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Tais aspectos, no entanto, são importantes temas a serem abordados em trabalhos futuros e devem contribuir sobremaneira para o desenvolvimento da cultura.

5.2 Avaliação *in vitro* da sensibilidade dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* a cobre e antibióticos

O controle químico representa um dos principais métodos de controle de doenças de plantas. Os resultados imediatos obtidos pelo seu emprego promovem o uso contínuo de defensivos o que, por sua vez favorece a seleção

de estirpes resistentes. No caso de defensivos a base de cobre, os isolados resistentes podem persistir no campo por longos períodos (Sundin et al., 1989). O surgimento de isolados resistentes representa um impacto negativo na produção. Dessa forma, o monitoramento do nível de sensibilidade do patógeno ao produto químico é de grande importância para o manejo da doença. No caso do maracujazeiro, existem poucos estudos sobre a sensibilidade de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* a cobre e antibióticos.

No presente estudo, a avaliação da sensibilidade de doze isolados de *X. c. pv. passiflorae* ao cobre revelou a existência de variações entre isolados, entre concentrações de cobre e entre experimentos. A variação entre experimentos, que pode ser evidenciada principalmente comparando-se os comportamentos dos isolados na concentração de 25 ppm, pode ter sido decorrência de erro experimental. No entanto, optou-se pela não repetição dos mesmos pois os resultados a 100 ppm, que permite distinguir isolados com graus contrastantes de sensibilidade, foram semelhantes. De modo geral, notou-se pequenas diferenças entre isolados em ambos experimentos, mas todos os isolados apresentaram taxas de redução de crescimento superiores a 80% a 100 ppm. Pequenas variações são naturalmente encontradas e resultam da variabilidade genética inerente a qualquer população de microorganismo. A literatura considera o crescimento em concentrações de no mínimo 200 ppm como indicativo de baixa sensibilidade ao produto (Trevors, 1987; Ritchie & Dittapongpitch, 1991). Não foi observada nenhuma correlação entre local de origem e diferenças em sensibilidade.

Os resultados do ensaio com antibióticos, de maneira semelhante ao ensaio com cobre, evidenciaram discretas diferenças no nível de sensibilidade entre isolados nas concentrações de 1.200 ppm, que corresponde àquela usada em campo, e 2.400 ppm. Não houve correlação entre origem do isolado e diferenças em sensibilidade.

Portanto, considerando os resultados obtidos e também a ausência de histórico pregresso de resistência a cobre e aos antibióticos em questão nas

áreas amostradas, pode-se concluir que o tratamento com estes agentes químicos permanece como meio efetivo de controle da bactéria nas regiões amostradas.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir:

1. A genotipagem dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* através de marcadores RAPD, permitiu detectar variabilidade genética nessa bactéria. Foi também possível detectar, através de inoculações artificiais, isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* com diferentes níveis de agressividade. Essas informações podem contribuir para programas de melhoramento que visem resistência a essa doença.
2. Isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* apresentaram discretas diferenças no nível de sensibilidade tanto a cobre quanto ao antibiótico.
3. Não houve nenhuma correlação entre local de origem e diferenças em sensibilidade aos produtos químicos.
4. Dado a ausência de histórico progresso de resistência a cobre e aos antibióticos em questão nas áreas amostradas, conclui-se que o tratamento com estes agentes químicos permanece como um meio efetivo de controle da bactéria nas regiões amostradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASKAVEG, J.E.; HINE, R.B. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. **Plant Disease**, v.69, n.11, p.993-996, 1985.
- ADHIKARI, T.B.; MEW, T.W.; LEACH, J.E. Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. **Phytopathology**, v.89, n.7, p.687-694, 1999.
- ADHIKARI, T.B.; VERA CRUZ, C.M.; ZHANG, Q.; NELSON, R.J.; SKINNER, D.Z.; MEW, T.W.; LEACH, J.E. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.3, p.966-971, 1995.
- ALVES, M.L.B.; TAKATSU, A. Variabilidade em *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.485-499, 1984.
- AUSUBEL, F.M. BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-interscience, v.1, 1992.

- BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central, and North America. **Phytopathology**, v.87, n.12, p.1184-1191, 1997.
- BENDER, C.L.; COOKSEY, D.A. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. **Journal of Bacteriology**, v.165, n.2, p.534-541, 1986.
- BENDER, C.L.; COOKSEY, D.A. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Journal of Bacteriology**, v.169, n.2, p.470-474, 1990.
- BENNETT, R.A.; BILLING, E. Development and properties of streptomycin resistant cultures of *Erwinia amylovora* derived from english isolates. **Journal Applied Bacteriology**, v.39, p.307-315, 1975.
- BIRCH, P.R.J.; HYMAN, L.J.; TAYLOR, R.; OPIO, A.F.; BRAGARD, C.; TOTH, I.K. RAPD PCR-based differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.809-814, 1997.
- BLISKA, F.M.M.; GARCIA, A.E.B.; LEITE, R.S.S.F. Mercado internacional de maracujá: característica e perspectivas. In: SÃO JOSÉ, A.R. **Maracujá, produção e mercado**. Vitória da conquista: UESB, 1994. p. 235-240.
- BOUZAR, H. JONES, J.B.; STALL, R.E.; LOUWS, F.J.; SCHNEIDER, M.; RADEMAKER, J.L.W.; BRUIJN, F.J.; JACKSON, L.E. Multiphasic analysis of *Xanthomonads* causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: Evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology**, v.89, n.4, p.328-335, 1999.

- BOUZAR, H.; JONES, J.B.; SOMODI, G.C.; STALL, R.E.; DAOUZLI, N.; LAMBE, R.C.; FELIZ GASTELUM, R.; TRINDAD-CORREA, R. Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.18, p.75-77, 1996.
- BUONAURIO, R.; STRAVATO, V.M.; SCORTICHINI, M. Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from *Capsicum annum* L. in Italy. **Plant Disease**, v.78, n.3, p.296-299, 1994.
- BURR, T.J.; NORELLI, J.L.; KATZ, B.; WILCOX, W.F.; HOYING, S.A. streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in apple orchards and its association with a conjugative plasmid. **Phytopathology**, v.78, n.4, p.410-413, 1988.
- CHIOU, C.S.; JONES, A.L. The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, v.81, p.710-714, 1991.
- CHITARRA, M.I.F. & CHITARRA, A.B. Pós colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320p.
- COOKSEY, D.A. Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.454-456, 1987.
- COOKSEY, D.A. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v.28, p.201-219, 1990.
- COYIER, D.L.; COVEY, R.P. Tolerance of *Erwinia amylovora* to streptomycin sulfate in Oregon and Washington. **Plant Disease**, v.59, p.849-852, 1975.

- DARASSE, A.; PRIOU, A.; KOTOUJANSKY, A.; BERTHEAU, Y. PCR and restriction fragment length polymorphism as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. **Applied Environmental Microbiology**, v.60, p.1437-1443, 1994.
- DIAS, S.C. & TAKATSU, A. Ocorrência de bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* Sp) causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.2, p.140, 1987.
- DIAS, S.C. Morte prematura do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) causada por patógenos que afetam a parte área da planta. Brasília, 1990. 137p. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Brasília.
- DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C.; LELLIOT, R.A.; SOHRO, M.N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. **Review of Plant Pathology**, v.59, n.4, p.153-168, 1980.
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. **Fungicide resistance: definitions and use of terms**. Bulletin OEPP/EPPO, v.18, n.4, p.569-571, 1988.
- FERREIRA, H.; BERIAM, L.O.S.; GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. Characterization of brazilian isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by ribotyping and RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.2, p.178-185, 1997.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Agriannual-1998. São paulo, 1998. p.287-293: Mercado & Perspectivas.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Agrianual-2001. São paulo, 1999. p.368-379: Maracujá.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de Fungos a Fungicidas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.

GITAITIS, R.D.; McINNES, T.B.; JONES, J.B. A survey of Georgia and Florida for the presence of copper tolerant phytopathogenic bacteria. **Phytopathology**, v.75, n.11, p.1288, 1985.

GOMES, L.H.; ARGUESO, J.L.; DUARTE, K.M.R.; TAVARES, F.C.A. RAPD para identificação de leveduras industriais. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 20., Piracicaba 1995. **Anais**. p.154.

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

HARTUNG, J.S.; CIVEROLO, E.L. Genomic fingerprints of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America, and Florida. **Phytopathology**, v.77, p.282-285, 1987.

HENKELS, M.D.; LOPER, J.E.; ROBERTS, R.G. Evaluation of tetracycline copper and streptomycin resistance of *Erwinia amylovora* strains from pear orchards in Washington State. **Phytopathology**, v.79, n.8, p.909, 1989.

HENZ, G.P.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Avaliação de métodos de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* para detecção de

fontes de resistência em brássicas. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, n.3, p.207-210. 1988.

JAUNET, T.X.; WANG, J.F. Variation in genotype and agressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. **Phytopathology**, v.89, n.4, p.320-327, 1999.

KAUFFMAN, H.E.; REDDY, P.K.; HSIEH, S.P.Y.; MERCA, S.D. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.537-541, 1973.

KNAUSS, J.F. Resistance of *Xanthomonas dieffenbachiae* isolates to streptomycin. **Plant Disease Reporter**, v.56, n.5, p.394-397, 1972.

KURODA, N.H. Avaliação do comportamento quanto a resistência de espécies e progênies de maracujazeiro a *Xanthomonas passiflorae* Pereira. Jaboticabal, 1981. 47p. Monografia (graduação)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

LEACH, J.E.; RHOADS, M.L.; VERA CRUZ, C.M.; WHITE, F.F.; MEW, T.W.; LEUNG, H. Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a repetitive DNA element. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, n.7, p.2188-2195, 1992.

LEITE Jr, R.P.; MOHAN, S.K. Mancha bacteriana pequena do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, n.3, p.541-547, 1985.

LEITE Jr., R.P.; JONES, J.B.; SOMODI, G.C.; MINSAVAGE, G.V.; STALL, R.E. Detecção of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with

pepper and tomato seed by DNA amplification. **Plant Disease**, v.79, n.9, p.917-922, 1995.

LEPPIK, E.E. Gene centers of plants as sources of disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, v.8, p.323-344, 1970.

MALAVOLTA Jr, V.A.; BERIAM, L.O.S; RODRIGUES NETO, J. Podridão do fruto, novo sintoma relacionado a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 22., Jaboticabal, 1999. **Resumos**. Jaboticabal: FUNEP, 1999. P.89.

MALVICK, D.K.; PERCICH, J.A. Variation in pathogenicity and genotype among single-zoospore strains of *Aphanomyces euteiches*. **Phytopathology**, v.88, n.1, p.52-57, 1998.

MARCO, G.M.; STALL, R.E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. **Plant Disease**, v.67, n.7, p.779-781, 1983.

MARINGONI, A.C.; KUROSZAWA, C.; BARBOSA, V.; SILVA NETO, J.M. Controle químico da mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge)) Dye do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Summa Phytopathologica**, v.12, p.93-101, 1986.

MARINGONI, A.C.; LEITE Jr, R.P.; KOMORI, N. Nova doença bacteriana do pepino (*Cucumis sativus* L.), causada por *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (Bryan) DYE, no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.14, p.225-230, 1988.

- MEHTA, A.; LEITE Jr., R.P.; ROSATO, Y.B. Polymorphism of *Xylella fastidiosa* strains by RAPD-PCR and SDS-PAGE of proteins. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.4, p.651-655, 2000.
- MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. **Maracujá: produção e comercialização**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1999. 64p. (boletim técnico 181).
- MELLO, S.C.M.; LOPES, C.A.; TAKATSU, A. Avaliação da virulência de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ao tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, n.1, p.39-43, 1996.
- MELLO, S.C.M.; OLIVEIRA, M.Z.A. Ocorrência da bacteriose do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.140, 1987.
- MILL, S.; JASALAVICH, C.A.; COOKSEY, D.A. A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance Operon of *Pseudomonas syringae*. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.6, p.1656-1664, 1993.
- MINSAVAGE, G.V.; CANTEROS, B.I.; STALL, R.E. Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, v.80, p.719-723, 1990.
- MORGADO, H.S.; LOPES, C.A.; TAKATSU, A. Virulência de isolados de *Pseudomonas solanacearum* à berinjela. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, n.4, p.430-434, 1992.

- NELSON, R.J.; BARAOIDAN, M.R.; VERA CRUZ, C.M.; YAP, I.V.; LEACH, J.E.; MEW, T.W.; LEUNG, H. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. **Applied Environmental Microbiology**, v.60, p.3275-3283, 1994.
- NORMAN, D.J.; CHASE, A.R.; STALL, R.E.; JONES, J.B. Heterogeneity of *Xanthomonas campestris* pv. *hederae* strains from *Araliaceae* hosts. **Phytopathology**, v.89, n.8, p.646-652, 1999.
- O'GARRO, L.W. Bacterial spot of tomato and pepper on four east Caribbean Islands: races, their abundance, distribution, aggressiveness, and prospects for control. **Plant Disease**, v.82, n.8, p.864-870, 1998.
- OLIVEIRA, G.H.N.; SUDO, S.; SILVA, J.R.; KIMURA, O. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* infectando vascularmente plantas de maracujazeiro (*P. edulis* f. *flavicarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, v.13, n.2, p.107, 1988.
- OLIVEIRA, J.C.; SALOMÃO, T.A.; RUGGIERO, C.; ROSSINI, A. Observações sobre o cultivo de *Passiflora alata* Art. (maracujá guaçu). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 2, p.59-63, 1980.
- PEREIRA, A.L.G. Contribuição ao estudo da etiologia da mancha oleosa da folha de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) causada por *Xanthomonas passiflorae* n.sp. Piracicaba, 1968. 91p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- RAYMUNDO, A.K.; BRIONES, A.M.; ARDALES, E.Y.; PEREZ, M.T.; FERNANDEZ, L.C.; LEACH, J.E.; MEW, T.W.; YNALVEZ, M.A.; McLAREN, C.G.; NELSON, R.J. Analysis of DNA polymorphism and virulence in

Philippine strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **Plant Disease**, v. 83, n.5, p.434-440, 1999.

RESTREPO, S.; VERDIER, V. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihots* in Colombia. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, n.11, p.4427-4434, 1997.

RIBEIRO, G.P.; MARIANO, R.L.R. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia; doenças das plantas cultivadas**, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, cap.50, p.525-534.

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

RIZZI, L.C.; RABELLO, L.R.; MOROZINI FILHO, W.; SAVAZAKI, E.T.; KAVATI, R. **Cultura do maracujá azedo**. Campinas: CATI, 1998. 54 p. (Boletim técnico, n. 235).

RODRIGUES NETO, J.; SUGIMORI, M.A.; MALAVOLTA Jr., A. Infecção natural em *Passiflora alata* art. por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, v. 10, p.50, 1984.

ROMEIRO, R.S. Bactérias fitopatogênicas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 283p.

ROMEIRO, R.S.; MOURA, A.B.; OLIVEIRA, J.R.; SILVA, H.S.A.; BARBOSA, L.S.; SOARES, F.M.P.; PERES, F. Evidences of constitutive multiple

- resistance to antibiotics in some plant pathogenic bacteria. **Summa Phytopathologica**, v.24, n.314, p.220-225, 1998.
- SCHROTH, M.N.; THOMSON, S.V.; MOLLER, W.J. Streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, v.69, n.6, p.565-568, 1979.
- SILVA, V.L; LOPES, C.A. Isolados de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* resistentes a estreptomicina e oxitetraciclina em tomateiros pulverizados ou não com antibióticos agrícolas. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, n.1, p.80-84, 1995.
- SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. Numerical taxonomy. San Francisco: W.H. Freeman and company, 1973. 573p.
- SPOTTS, R.A.; CERVANTES, L.A. Copper, oxitetracycline, and streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. **Plant Disease**, v.79, n.11, p.1132-1135, 1995.
- STALL, R.E.; LOSCHKE, D.C.; JONES, J.B. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, v.76, n.2, p.240-243, 1986.
- STALL, R.E.; THAYER, P.L. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. **Plant Disease Report**, v.46, p.389-392, 1962.
- STARR, M.P.; JENKINS, C.L.; BUSSEY, L.B.; ANDREWES, A.G. Chemotaxonomic significance of the Xanthomonadins, novel brominated

Aryl- Polyene pigments produced by bactéria of the genus *Xanthomonas*. **Archives of Microbiology**, v.113, p.1-9, 1977.

SUMMERS, A.O; SILVER, S. Microbial transformations of metals. **Annual Review Microbiology**, v.32, p.637-672, 1978.

SUNDIN, G.W.; JONES, A.L.; FULBRIGHT, D.W. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. **Phytopathology**, v.79, n.8, p.861-865, 1989.

TAKATSU, A. Classificação atual de bactérias fitopatogênicas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p.93-120, 2000.

TEIXEIRA, C.G. Cultura. In: TEIXEIRA, C.G.; CASTRO, J.V.; TOCCHINI, R.P.; NISIDA, A.L.A.C.; HASHIZUME, T.; MEDINA, J.C.; TURATTI, J.M.; LEITE, R.S.S.F.; BLISKA, F.M.M.; GARCIA, A.E.B.C. (Ed.) **Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**, Campinas: ITAL, 1994. p. 1-142. (ITAL. Série Frutas Tropicais, 9).

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

THAYER, P.L.; STALL, R. Effect of variation in the bacterial spot pathogen of pepper and tomato on control with streptomycin. **Phytopathology**, v.51, p.568-572, 1961.

TORRES FILHO, J.; PONTE, J.J. Estudo sobre o controle da bacteriose ou "Morte Precoce" (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) do maracujá

amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, v.19, n.1, p.34-38, 1994.

TREVORS, J.T. Copper resistance in bacteria. **Microbiological Sciences**, v.4, n.1, p.29-31, 1987.

WANG, G.; THOMAS, S.W.; BERG, C.M.; BERG, D.E. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucleic Acids Research**, v.21, n.25, p.5930-5933, 1993.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

APÊNDICES