

Implicacoes da competicao ...
2016 TS-PP-2016.00654



CNPMA-15188-1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CARLA MARIA CAVALCANTI RIBEIRO

IMPLICAÇÕES DA COMPETIÇÃO POR ÍONS FERRO E NITROGÊNIO
NO CONTROLE DA MANCHA-BACTERIANA
DO MARACUJAZEIRO

BOA VISTA, RR
2016

-2016.00654



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CARLA MARIA CAVALCANTI RIBEIRO

**IMPLICAÇÕES DA COMPETIÇÃO POR ÍONS FERRO E NITROGÊNIO
NO CONTROLE DA MANCHA-BACTERIANA
DO MARACUJAZEIRO**

BOA VISTA, RR
2016

CARLA MARIA CAVALCANTI RIBEIRO

IMPLICAÇÕES DA COMPETIÇÃO POR ÍONS FERRO E NITROGÊNIO
NO CONTROLE DA MANCHA-BACTERIANA
DO MARACUJAZEIRO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Agronomia. Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo de Almeida
Halfeld Vieira

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Augusto
Schurt

BOA VISTA, RR
2016

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

R484i Ribeiro, Carla Maria Cavalcanti.
Implicações da competição por íons ferro e nitrogênio no controle da mancha-bacteriana do maracujazeiro / Carla Maria Cavalcanti Ribeiro. – Boa Vista, 2016.
71f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira.
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Augusto Schurt.

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

1 – Bactéria. 2 – Controle biológico. 3 – Filoplano. 4 – *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*. 5 – *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*. I – Título. II – Vieira, Bernardo de Almeida Halfeld (orientador). III – Schurt, Daniel Augusto (coorientador).

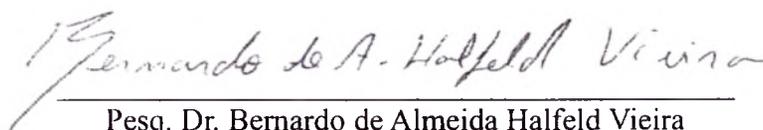
CDU – 632.1

CARLA MARIA CAVALCANTI RIBEIRO

Implicações da competição por íons ferro e nitrogênio no controle da mancha-bacteriana

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

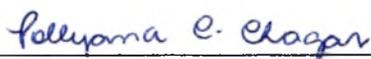
Aprovada: 29 de fevereiro de 2016.



Pesq. Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira
Orientador – Embrapa



Pesq.. Dr. Edvan Alves Chagas
Embrapa



Profa. Dra. Pollyana Cardoso Chagas
UFRR



Pesqa. Dra. Hyanameyka Evangelista de Lima
Embrapa

Às raízes,
painho e mainha,
Cláudio Rogério Escorel Ribeiro e
Maria da Conceição Cavalcanti Ribeiro,
pelo amparo e exemplo diário de luta e fé na vida.

Aos ramos,
Ninho e Kcal,
Caio Cesar Cavalcanti Ribeiro e,
Claudia Maria Cavalcanti Ribeiro Alves,
pelo apoio e companheirismo em todos os meus ideais.

AGRADECIMENTOS

Em todos os passos que dou, nunca estou só. Dedico minhas conquistas àqueles que caminharam comigo e que, de alguma forma, me apoiaram.

Agradeço, em especial, a Deus por me conceder saúde, coragem, alegria e determinação em todos os meus momentos.

Aos meus amados pais, Cláudio e Conceição, e irmãos, Cláudia e Caio, por toda confiança, apoio, carinho, incentivo. Por compreenderem minha ausência física durante todo o período do curso e por compartilharem e vibrarem sempre com cada vitória minha.

Aos pesquisadores Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira e Dr. Daniel Augusto Schurt, pela orientação, apoio, incentivo, conselhos e pela experiência e aprendizagem adquirida sob orientação durante a elaboração deste trabalho;

Ao técnico de laboratório Giovanni Ribeiro por toda paciência, pela boa convivência e pelos ensinamentos transmitidos durante o período de trabalho no laboratório de Fitopatologia da Embrapa – RR;

As minhas queridas amigas-irmãs Marília Gabriela, Leila Milfont, Carol Taveira, Nicole Rodrigues, Patricia Lopez, Laydjane Maria, Fabiola Maia e Lilian Flores, que sempre se fizeram presentes apesar de toda a distância.

Ao meu primo Marcelo, sua esposa Flavia e aos meus tios Jairo e Lila, por todo apoio e carinho, nunca deixando que me sentisse sozinha no período que estive em Roraima;

A minha cunhada Anna Gabriela e meu irmão Caio Ribeiro, por todo acolhimento e receptividade que recebi durante minha estadia em Campinas-SP, para conclusão da dissertação.

Aos meus queridos amigos e companheiros “macuxis”, Jouvart Mendanha, Patricia Eduardo, Analia Aguiar, Maycon Machado, Jorge Luis, Yuri Maia, Rayssa Melo, Helder Santos, Thiago Holanda, Mirla Elayne, Nyanne Picanço, Jéssica Tosin, Gabriela Almeida, Ana Karine, Olisson Mesquita, Bruna Santana, Felipe Souza, Tanner Menezes e Felipe Rossi que me acolheram e tornaram minha permanência em Boa Vista mais alegre, colorida e divertida;

Aos meus companheiros de república: Ariane Evald, Emilia Villalba, Fernanda Ramalho, Edgley Soares, Antonio Suassuna e Rosinaldo Ferreira, pelos bons

momentos juntos, pela diversão, pelos grupos de estudo e noites em claro, por todo incentivo e pela paciência em explicar termos e conceitos de agronomia para uma bióloga.

Aos companheiros e colegas de curso, Anderson, Ana Bárbara, Ariane, Auriane, Bruna, Edgley, Emília, Fernanda, Hugo, Izabel, Jéssica, João, Luciana, Marden, Olisson e Victorio;

As minhas companheiras de laboratório Aveline Kuat, Inaira Leoni, Aline Ferreira, Ana Luiza, Kellen, Roseane Tomé, e os amigos Helder Santos, Joao Paulo Tostes, Olisson Mesquita e Rodolpho, pelo apoio em trabalhos na casa de vegetação e laboratório e, sobretudo, pela amizade.

Aos colegas Josimar, Patricia, Keyla, Dilaci, Jorge, Maycon, Bruna, pelas inúmeras caronas até a Embrapa para realização dos experimentos, principalmente aos fins de semana quando nada parece funcionar em Boa Vista;

Ao amigo Victor França, que vibrou comigo desde o começo, me incentivando a seguir em frente e não desistir dos ideais, e pelos helps com a formatação ou qualquer coisa ligada a informática;

A toda comunidade NSPS, ao Pe. Paulo, ao meu grupo de oração, aos meus amigos catequistas, e aos grandes amigos que fiz por lá;

Ao amigo Pedro Henrique Dantas, por seus sábios conselhos e por dividir comigo bons e maus momentos durante essa caminhada;

Ao amigo Guilherme Borges, por todo apoio, incentivo e pelo dom de me tranquilizar quando tudo parecia desandar, principalmente na reta final dessa jornada;

Aos companheiros nas horas das distrações e aventuras, pelas boas risadas, as boas lembranças e as divertidas histórias que juntos. Quem viveu sabe;

Ao amigo Anderson Antônio, por todo apoio e ajuda concedida quebrando meus galhos na UFRPE;

Aos queridos Daniel, Fernanda, Carol, Val, Bruna, Camilinha, Cris e Giba, por trazerem alegria, companheirismo, descontração e sorrisos aos meus dias na Embrapa Meio Ambiente.

A Universidade Federal de Roraima (UFRR), pela oportunidade concedida em dar continuidade à minha formação profissional, me tornando mestre; Aos docentes da POSAGRO, pelos ensinamentos concebidos; A coordenação e secretaria da

POSAGRO, em especial Elene e Ismael, sempre a postos para ajudar no que foi preciso.

A Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA) Roraima e Meio Ambiente e o seu pessoal, por toda infraestrutura e pessoal necessário para o desenvolvimento das minhas pesquisas;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, no qual tornou-se possível a realização da minha formação;

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

BIOGRAFIA

CARLA MARIA CAVALCANTI RIBEIRO, filha de Cláudio Rogério Escorel Ribeiro e Maria da Conceição Cavalcanti Ribeiro, nasceu em 24 de maio de 1984 na cidade de Recife, Pernambuco. Concluiu o ensino médio na Escola Academia Santa Gertrudes, Olinda - PE. Ingressou na Universidade Federal Rural de Pernambuco, no Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas em 2003, e o concluiu em 2007. Em 2004, ingressou como bolsista no Programa de Educação Tutorial do Curso de Biologia da UFRPE, onde permaneceu até 2007. Monitora voluntária da Disciplina de Microbiologia, de 2006 a 2007. Em 2009, iniciou o curso de especialização em Gestão de Sistemas e Ações e Saúde, pela Universidade de Pernambuco. Em 2011 ingressou no curso de graduação de Licenciatura em Ciências Biológicas, na UFRPE, onde foi bolsista do Programa Ciência sem Fronteiras na Espanha, no período de 2012 a 2013. Em 2014 ingressou no Mestrado em Agronomia, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, da Universidade Federal de Roraima.

**Construí amigos, enfrentei derrotas,
venci obstáculos, bati na porta da vida
e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la!
(AUGUSTO CURY, 2008)**

RIBEIRO, Carla Maria Cavalcanti **Implicações da competição por íons ferro e nitrogênio no controle da mancha-bacteriana do maracujazeiro**. 2016. 71p. Dissertação em agronomia na Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2016.

RESUMO

A mancha-bacteriana do maracujazeiro constitui uma das principais doenças da cultura, trazendo impacto significativo à produção. Postula-se que *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Xap), agente causal da doença, necessite de uma densidade mínima de células viáveis no filoplano para que seja capaz de causar infecção. Portanto, é pressuposto que antagonistas previamente selecionados, que demonstraram capacidade controle da doença e de competirem por íons ferro e fontes de nitrogênio orgânico, reduzam a população de Xap, por meio da exclusão prévia do patógeno. Esta premissa constituiu a hipótese testada neste trabalho. Para tal, foram definidos: a concentração de unidades formadoras de colônias capaz de incitar o desenvolvimento da mancha-bacteriana, o efeito da competição por íons ferro e por fonte de nitrogênio na população residente de Xap em filoplano, assim como na severidade da mancha-bacteriana. Com os resultados obtidos, pode-se determinar que íons Fe foram capazes de interferir na densidade populacional de Xap em filoplano, bem como na severidade da doença, junto com fontes de N. Mesmo nas situações onde não foi observada a diminuição da população bacteriana de Xap devido a restrição do acesso ao íon Fe e a fonte de N, houve redução da severidade da doença. Estas informações trazem como contribuição a possibilidade de desenvolver novos modos de controle da doença, seja pelo uso dos antagonistas selecionados ou pelo uso de moléculas que ocasionem as mesmas restrições a esses elementos.

Palavras-chave: Bactéria. Controle biológico. Filoplano. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

RIBEIRO, Carla Maria Cavalcanti **Implications for competition of Fe ions and nitrogen in controlling bacterial blight of passionfruit.** 2016. 71p. M. S. Dissertation in agronomy - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2016.

ABSTRACT

The passionfruit bacterial blight is one of the major diseases of culture, bringing a significant impact to production. It is postulated that *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Xap), the causative agent of the disease, requires a minimum density of viable cells in the phylloplane to be able to cause infection. Therefore, it is assumed that previously selected antagonists, who demonstrated ability to control the disease and to compete for iron ions and organic nitrogen sources, reduce the population of Xap by preemptive exclusion. This is the hypothesis to be tested in this work. On this research was defined: the concentration of colony forming units capable of inducing the development of bacterial spot, the effect of competition for iron ions and nitrogen source in the resident population of Xap in phyloplan, the role of competition for iron ions and N source in reduction of the resident population Xap phyloplan, as well as the severity of bacterial spot. With the results obtained, it can be determined that Fe ions were able to interfere with the population density of Xap in phyloplan and severity of the disease, along with sources N.de how the availability of iron ions or organic nitrogen interferes the population density of Xap in phyloplan passion fruit and severity of the disease. Even in situations where it was observed to decrease the bacterial load of Xap due to restricted access to the Fe ion and the source of N, a reduction of disease severity. This information can brings the possibility of developing new disease control methods, either by the use of selected antagonists or the use of molecules that performs the same restrictions on these elements.

Keywords: Bacterium. Biological control. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Phylloplane. *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Severidade média e período de incubação da mancha-bacteriana em plantas de seis diferentes cultivares de maracujá infectadas por *X. a. pv. passiflorae*. S. Cerrado= BRS Sol do Cerrado, G.Amarelo= BRS Gigante Amarelo e R.Cerrado= BRS Rubi do Cerrado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 40
- Figura 2- Redução média percentual da área foliar em plantas de seis diferentes cultivares de maracujá infectadas por *X. a. pv. passiflorae*. S. Cerrado= BRS Sol do Cerrado, G.Amarelo= BRS Gigante Amarelo e R.Cerrado= BRS Rubi do Cerrado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 41
- Figura 3 - Correlação linear entre a severidade da mancha-bacteriana do maracujá e a redução da área foliar. Coeficiente de correlação de Pearson: $r = 0,56$ ($p < 0,0001$)..... 42
- Figura 4 - Correspondência entre concentração bacteriana (unidades formadoras de colônias (ufc.mL⁻¹) e fator de diluição, a partir de suspensão bacteriana ajustada a Abs₅₄₀=0,15..... 43
- Figura 5 - Relação entre concentração bacteriana em suspensão e severidade da mancha-bacteriana. (T1 - 10⁵ ; T2-10⁶ ; T3-10⁷ ufc.mL⁻¹)..... 45
- Figura 6 - Relação entre diferentes concentrações de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (ln 10⁵, ln 10⁶ e ln 10⁷, ufc.mL⁻¹) e número de lesões por folha aos 8 dias após a inoculação..... 45
- Figura 7 - Relação entre diferentes concentrações de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (ln 10⁵, ln 10⁶ e ln 10⁷, ufc.mL⁻¹) e severidade da doença (% de área foliar lesionada) aos 20 dias após a inoculação..... 46
- Figura 8 - Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em relação ao tempo. Tratamento 1: Folhas pulverizadas com solução obtida através do meio 523 suplementado com 2 µM de Fe²⁺..... 47
- Figura 9 - Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em relação ao tempo. Tratamento 2: Folhas pulverizadas com solução obtida através do meio 523 não suplementado..... 48
- Figura 10 - Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em relação ao tempo. Tratamento 3: Folhas pulverizadas com solução de pioverdina com Abs₃₆₃=0,115 49
- Figura 11 - Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em relação ao tempo. Tratamento 4: Folhas pulverizadas com solução de pioverdina com Abs₃₆₃=0,231 49
- Figura 12 - Efeito da pioverdina produzida pela bactéria 29RR em relação ao número de lesões por folha causadas pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Xap SP) no maracujá gigante amarelo..... 51

Figura 13 - Efeito da pioverdina produzida pela bactéria 29RR na severidade (%) da mancha bacteriana causada pela <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> (Xap SP) no maracujá gigante amarelo	52
Figura 14 - Dinâmica populacional de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> em relação ao tempo. Tratamento 1: Folhas pulverizadas com água destilada estéril	54
Figura 15 - Dinâmica populacional de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> em relação ao tempo. Tratamento 2: Folhas pulverizadas com solução de ácido L-glutâmico (1g.L ⁻¹)	54
Figura 16 - Dinâmica populacional de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> em relação ao tempo. Tratamento 3: Folhas pulverizadas com solução obtida a partir do antagonista 18SP	55
Figura 17 - Dinâmica populacional de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> em relação ao tempo. Tratamento 4: Folhas pulverizadas com solução obtida do antagonista 18SP e ácido L-glutâmico (1g.L ⁻¹) ..	55
Figura 18 - Efeito do antagonista 18SP em relação ao numero de lesões por folha causadas pela <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> (Xap SP) no maracujá gigante amarelo.....	56
Figura 19 - Efeito do antagonista 18SP em relação a severidade (%) causada pela <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> (Xap SP) no maracujá gigante amarelo	57
Figura 20 - Comparativo do número de lesões entre a testemunha (T1) e o Tratamento com o antagonista 18SP (T3)	57
Figura 21 - Comparativo do número da severidade entre a testemunha (T1) e o Tratamento com o antagonista 18SP (T3)	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores observados entre unidades formadoras de colônias (ufc) e fator de diluição de suspensão	43
Tabela 2 - Contraste entre taxas de declínio da densidade populacional de xap resultante dos tratamentos observados, de acordo com o teste t (tukey) a 5% e 1%, em que se verificou a competição por sideróforo	48
Tabela 3 - Contraste entre taxas de declínio da densidade populacional de xap resultante dos tratamentos observados, de acordo com o teste t (tukey) a 5% e 1%, em que se verificou a competição por nitrogênio.	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivo específico	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Aspectos gerais e importância do maracujazeiro	19
3.2 Mancha-bacteriana	21
3.3 Biocontrole por meio de bactérias	23
3.4 Bactérias do filoplano como possíveis agentes de biocontrole	25
3.5 Importância de íons Fe para o metabolismo microbiano	26
3.6 Importância do nitrogênio no controle biológico	27
4. ESTADO DA ARTE	29
5 METODOLOGIA	32
5.1 Determinação da resistência de diferentes cultivares de maracujazeiro à mancha-bacteriana	32
5.2 Correspondência entre unidades formadoras de colônias (ufc) e absorvância	33
5.3 Seleção de mutantes de <i>xap</i> resistentes a antibióticos a ser utilizado nos ensaios In vivo	33
5.4 Determinação de unidades formadoras de colônias capaz de incitar o desenvolvimento da mancha-bacteriana	34
5.5 Efeito de sideróforos produzido por antagonista previamente selecionado na redução da população residente de <i>xap</i> em filoplano	35
5.6 Efeito de sideróforo produzido por antagonista previamente selecionado na severidade da mancha-bacteriana	37
5.7 Efeito da competição por fonte de nitrogênio na redução da população residente de <i>xap</i> em filoplano	37
5.8 Efeito da competição por fonte de nitrogênio na severidade da mancha-bacteriana	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1 Determinação da resistência de diferentes cultivares de	40

maracujazeiro à mancha-bacteriana	
6.2 Correspondência entre unidades formadoras de colônias (ufc) e turbidez	42
6.3 Seleção de mutantes de xap resistentes a antibióticos a ser utilizado nos ensaios in vivo	43
6.4. Determinação de unidades formadoras de colônias capaz de incitar o desenvolvimento da mancha-bacteriana	44
6.5. Efeito do sideróforo produzido por antagonista previamente selecionado na população residente de xap em filoplano	46
6.6 Efeito do sideróforo produzido por antagonista previamente selecionado na severidade da mancha-bacteriana.....	51
6.7 População residente de xap em filoplano.....	53
6.8 Efeito da competição por fonte de n no número de lesões e na severidade da mancha-bacteriana.....	56
7. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O maracujazeiro é uma planta nativa do Brasil e amplamente cultivada para fins medicinais, composição de formulações em cosméticos e, principalmente, extração de suco. Dentre as espécies cultivadas, o maracujá amarelo ou azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) é o mais amplamente difundido e explorado comercialmente. Nesta cultura, algumas doenças têm impacto significativo à produção. Dentre elas, a mancha-bacteriana, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Xap), é uma das mais importantes, não somente pelos danos que causa, mas também pela dificuldade de controle (MELETTI, 2011).

O patógeno infecta folhas, ramos e frutos (GONÇALVES; ROSATO, 2000; HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006) e ocasiona a redução do período de exploração da cultura em campo capaz de oferecer retorno comercial (BORO et al., 2011). A bactéria é transmitida por sementes, sendo comum a prática dos produtores em produzirem suas próprias mudas a partir de frutos comercializados no mercado (NAKATANI et al., 2009). Estes fatores propiciam a sua ocorrência generalizada nas mais diversas áreas de cultivo.

Entre os meios de controle da doença que poderiam ser aplicáveis em cultivos comerciais, o melhoramento genético seria um dos mais promissores (NAKATANI et al., 2009; MELETTI, 2011). Porém, em recente trabalho em que se caracterizaram genes de maracujá amarelo diferencialmente expressos durante a resposta de defesa à Xap, por meio de bibliotecas subtrativas de cDNA, Munhoz (2011) concluiu que o maracujazeiro amarelo, embora possua diversos transcritos para responder à infecção, estes não são eficientes para impedir o desenvolvimento da bacteriose. Portanto, não se vislumbra ainda a disponibilidade de plantas de maracujá azedo com níveis satisfatórios de resistência à doença.

Em relação ao controle químico, Franco e Takatsu (2004) verificaram que o uso frequente de produtos contendo ingrediente ativo a base de cobre, tradicionalmente utilizados pelos produtores para o controle da mancha-bacteriana, leva facilmente à seleção de estirpes resistentes ao produto, fazendo com que estes não sejam eficientes. Desta forma, alternativas de controle são necessárias para auxiliar no manejo da doença.

Halfeld-Vieira et al. (2015) selecionaram bactérias de filoplano capazes de reduzir a severidade da doença *in vivo*. A competição por elementos essenciais ao metabolismo bacteriano foi evidenciada como mecanismo capaz de explicar como estes antagonistas atuam. A continuidade desse trabalho visou demonstrar como a população de Xap é afetada pela competição.

A principal contribuição será a possibilidade do desenvolvimento de novos meios de controle da doença, seja pelo uso dos antagonistas selecionados, seja pelo uso de moléculas que possam desempenhar as mesmas restrições aos elementos que são objetos da competição como, por exemplo, o uso de taninos para sequestro de íons ferro em filoplano (KARAMANOLI et al., 2011). Além disso, estas informações poderão oferecer uma nova perspectiva de controle de bacterioses a ser investigada para outros patossistemas em que, cujo patógeno, tem no filoplano o seu sítio de infecção.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi determinar se a competição por fontes de nitrogênio orgânico e íons ferro no filoplano pode ser aplicada como meio de controle da mancha-bacteriana do maracujazeiro.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a resistência de diferentes cultivares à mancha-bacteriana para definir a cultivar de maracujazeiro a ser utilizada nos ensaios;

Definir a concentração ideal de inóculo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* capaz de iniciar o processo de infecção;

Definir como a restrição de íons ferro influencia na densidade populacional do patógeno no filoplano;

Definir como a restrição de fontes de nitrogênio orgânico influencia na densidade populacional do patógeno no filoplano.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos gerais e importância do maracujazeiro

O maracujazeiro é uma planta pertencente à família *Passifloraceae*, da ordem *Passiflorales*, que compreende 18 gêneros e cerca de 630 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais da América, Ásia e África (VANDERPLANK, 1996). A família é representada no Brasil por apenas dois gêneros: *Dilkea* e *Passiflora*. O gênero *Passiflora* é originário da América do Sul e tem no Centro-Norte do Brasil o maior centro de distribuição geográfica (MEDINA et al., 1980). Possui cerca de 530 espécies tropicais e subtropicais, das quais de 111 a 150 são originárias do Brasil (SOUZA; MELETTI, 1997; BRAGA, JUNQUEIRA, 2000). Destas, cerca de 60 produzem frutos com valor comercial (SCHULTZ, 1968; MANICA, 1997).

Das *Passifloras*, a espécie mais cultivada é *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* que tem como nome vulgar, maracujá-amarelo ou maracujá-azedo, seguida por *Passiflora alata* ou maracujá-doce. A espécie *Passiflora edulis*, conhecida como maracujá-roxo, é muito cultivada na Austrália, África e sudeste asiático e no Sul do Brasil. Estima-se que, juntas, as espécies *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. edulis* ocupem mais de 90% da área cultivada com maracujá no mundo (JUNQUEIRA et al., 2005).

Além de seu aproveitamento *in natura*, o maracujá é utilizado por indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos, graças ao alto valor nutritivo do fruto, rico em vitaminas A e C, fósforo e cálcio, e à presença de substâncias como maracugina e passiflorina, utilizadas como calmante. A casca do maracujá é rica em niacina (vitamina B3), pectina, ferro, fósforo e cálcio (CÓRDOVA et al., 2005).

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, com aproximadamente 60% da produção total. Em segundo lugar aparece o Equador, com pouco mais de 13% e a Colômbia em terceiro, com 5% do total da produção do fruto (AREDESet al.; MEZZARILA et al. 2009). No país, a produção de maracujá estimada é de 823.284 toneladas. A área cultivada corresponde a 57.183 hectares por ano. A produtividade média é de 14 toneladas por hectare. (IBGE, 2014).

O maracujá amarelo representa 97% da área plantada e do volume comercializado no Brasil. Devido a qualidade de seus frutos, estima-se que mais de 60% da produção brasileira de maracujá amarelo seja destinada ao consumo *in natura* e o restante destinado às indústrias de processamento, sendo o suco o principal produto (MELETTI; MAIA, 1999; LARRÉ et al., 2007; CLARO; MONTEIRO, 2010; ZERAIK et al., 2010).

No Brasil a produção da fruta destaca-se a região Nordeste (583mil toneladas/ano), Sudeste (144 mil toneladas/ano) e Norte (50 mil toneladas/ano). Os Estados da Bahia (381 mil toneladas/ano), Ceará (144 mil toneladas por ano) e Espírito Santo (70 mil toneladas por ano) são os maiores estados brasileiros produtores do maracujá (IBGE, 2014). Roraima não possui destaque na produção nacional de maracujá, mas em contrapartida a fácil comercialização, bem como o clima ideal para seu cultivo, fizeram aumentar a área plantada no estado, muitas vezes sem a devida preocupação com os problemas fitossanitários, que podem onerar ou mesmo inviabilizar a atividade (HALFELD-VIEIRA et al., 2007).

A ocorrência de doenças constitui-se em um dos principais problemas da passicultura, sendo comuns doenças no sistema radicular e parte aérea da planta, provocando morte precoce, desfolhamento, retardamento na maturação e baixo rendimento de polpa do fruto (VIANA et al., 2014). Para Junqueira et al (2005), doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides podem afetar a expansão e produtividade dos cultivos do maracujá, provocando prejuízos expressivos e levando os produtores ao uso indiscriminado de defensivos agrícolas, que além de afetar os insetos polinizadores resultando em queda na produção, proporciona também problemas ambientais e conseqüente desequilíbrio ecológico.

Em algumas regiões do país, doenças como a murcha-de-fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*), virose do endurecimento do fruto (Passion fruit Woodiness Virus), a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e a bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*), têm sido limitantes de produção (JUNQUEIRA et al., 2005), com destaque especial, para a última, com ocorrência generalizada no Brasil, e de difícil controle devido á forma severa com que ocorre sob condições edafoclimáticas favoráveis, em clima quente e úmido (OLIVEIRA; RUGGIERO, 1998; MIRANDA, 2004). Essas doenças exigem dedicação e esforços multidisciplinares urgentes, encontrando uma alternativa eficaz para evitar a disseminação desses patógenos (SANTOS FILHO et al., 2004).

Têm sido recomendada diversas medidas para o controle da bacteriose, como a produção de mudas saudáveis, erradicação das porções vegetais doentes, uso de quebra-ventos e aplicação de produtos com ação bactericida. No entanto, esses métodos tradicionais de controle não têm apresentado resultados satisfatórios (MIRANDA, 2004), causando, aumento de custos ao produtor, prejuízos ao meio ambiente e à saúde humana (ALTIERI; NICHOLLS, 2000).

3.2 Mancha-bacteriana

O gênero *Xanthomonas*, predominantemente composto por espécies fitopatogênicas, tem como habitat os tecidos vegetais e infectam plantas em todo o planeta, afetando os principais vegetais superiores com um ou mais tipos de doenças (STARR, 1983; MOORE et al., 1997), sendo considerado um dos maiores gêneros de bactérias que possui associação com plantas. Espécies desse gênero são responsáveis pela infecção de pelo menos 124 monocotiledôneas e de 268 dicotiledôneas, enquanto outros membros são saprófitas e epífitas (MATTA, 2005).

Miranda (2004) relata que a mancha bacteriana do maracujazeiro foi descrita pela primeira vez por Pereira em 1969, no Estado de São Paulo, região de Araraquara, que classificou a bactéria como uma nova espécie, propondo a designação de *Xanthomonas passiflorae*. Em 1980, Dye e colaboradores reclassificaram a bactéria, passando a denominá-la *X. campestris* pv. *passiflorae*. Posteriormente, Gonçalves e Rosato (2000), por meio de técnicas de hibridação DNA-DNA, propuseram sua reclassificação como *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Xap).

Em Roraima, a mancha-bacteriana foi verificada pela primeira vez em julho de 2005, em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) cultivado em plantio comercial na região do Monte Cristo, em Boa Vista. Desde então, tem sido diagnosticada sistematicamente em amostras de maracujá (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006).

A Xap é uma bactéria em forma de bastonete, gram-negativa, móvel por um único flagelo polar, sem formação de esporos ou cápsulas, mede 0,5 x 1,5 µm e produz um pigmento amarelo denominado xanthomonadina. É aeróbia estrita e forma características colônias com nuances amarelo-brilhantes, circulares,

convexas, salientes, elevadas, translúcidas, bordos regulares e viscosas. Apresentam crescimento ótimo a 27 °C. (ALMEIDA et al.,1994).

A doença incide na parte aérea da planta, principalmente as partes tenras ou suculentas do tecido, atingido os elementos vasculares adjacentes. Apresenta formas de infecção localizada ou sistêmica, que podem ou não ocorrer em associação. A infecção se torna mais grave quando a planta está exposta a altas temperaturas e umidade, principalmente quando acontece de forma localizada, atingindo as folhas mais novas. Porém, quando a infecção é sistêmica, a bactéria pode disseminar-se independente da condição ambiental. A mancha-bacteriana pode inutilizar os frutos para consumo e acarretar a destruição total da planta afetada (TEIXEIRA, 1994; LEITE JR., 2002; SANTOS; SANTOS FILHO,2003; KIMATI et al., 2005).

Facilmente reconhecida, a mancha-bacteriana é caracterizada pelo encharcamento do tecido, com coloração verde-escura, ao redor das manchas que se formam nas folhas, sendo comum o início do desenvolvimento das lesões a partir dos bordos foliares. As lesões apresentam um rápido avanço em direção ao centro, progredindo para uma queima severa, na maioria das vezes com halo amarelado em torno do tecido necrosado. Com o desenvolvimento da doença ocorre seca das folhas e, posteriormente, desfolha, reduzindo consideravelmente a produtividade. Ao atingir os feixes vasculares a bactéria causa infecção sistêmica, podendo ocasionar morte de ramos e, ocasionalmente, até a morte da própria planta (HALFELD-VIEIRA et al., 2007). Nos frutos, a doença se caracteriza pelo surgimento de manchas grandes, inicialmente esverdeadas e oleosas, depois pardas, circulares e bem delimitadas. Apesar de superficiais, essas manchas, em condições favoráveis, permitem que o patógeno penetre na polpa, causando sua fermentação e alcançando as sementes, o que pode causar queda de frutos e inviabilizar sua comercialização (VIANA et al., 2003; SANTOS FILHO et al., 2004; KIMATI et al., 2005).

A principal forma de disseminação deste patógeno a longa distância é através do uso de material propagativo contaminado. A semente pode veicular o patógeno tanto interna como externamente, sendo que a taxa de transmissão da bactéria pelas sementes varia de 1,85% (DIAS, 1990) a 2,3 % (VILLANOVA et al., 2007). Segundo Liberato e Costa (2001), a curta distância, a disseminação da *Xap* ocorre por meio de escorrimento e respingos de água da chuva ou irrigação, associados ao

vento, bem como através de ferramentas, utensílios e máquinas contaminadas (MELETTI; MAIA, 1999).

A bactéria penetra na planta através de estômatos, hidatódios ou ferimentos, e coloniza os espaços intercelulares do tecido foliar e vasculares. Quando são depositadas sobre a superfície das folhas por respingos de água ou aerossóis, as bactérias podem morrer se não forem capazes de crescer epifiticamente ou encontrarem uma abertura para adentrar na planta. Dentre as principais medidas de controle destacam-se o uso de mudas e sementes saudáveis, o tratamento de sementes em água a temperatura de 50°C durante 15 minutos, poda de limpeza, uso de quebra ventos, aplicação de bactericidas e uso de plantas resistentes ou tolerantes à bacteriose (TEIXEIRA, 1994; TORRES; PONTES, 1994; KIMATI et al., 2005).

3.3 Biocontrole por meio de bactérias

A utilização de microorganismos, formulados ou não, para manter as populações de organismos prejudiciais na agricultura em níveis aceitáveis têm se tornado cada vez mais comum. Esse processo é denominado controle biológico (CASTRO; JONSSON, 1999).

O controle biológico surge como uma alternativa atraente para auxiliar no controle de doenças foliares. É caracterizado por promover a redução da densidade de inóculo ou atividades determinantes da doença causada por um patógeno, por um ou mais organismos (COOK; BAKER, 1983). Pode ocorrer de maneira espontânea, ou como resultado da manipulação de organismos pelo homem, sendo condicionado pelo hospedeiro ou o meio ambiente (SOGLIO, 2004).

Agentes de controle biológico são capazes de se estabelecer, colonizar e dispersar no ecossistema (ÁVILA et al., 2005) além de serem uma alternativa viável para diminuir o potencial de inóculo de patógenos presentes no solo, sem trazer danos ao meio ambiente (MELLO et al., 2007). A eficiência dos agentes de biocontrole de doenças da parte aérea depende da capacidade de sobrevivência e manutenção de populações em alta densidade nesse ambiente (HALFELD-VIEIRA et al., 2004). Dentre as diversas bactérias benéficas existentes na natureza, as endofíticas, as rizobactérias e as residentes de filoplano podem vir a ser utilizadas como agentes de biocontrole (HALFELD-VIEIRA, 2002).

Bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) ao colonizar os tecidos das plantas, exercem um efeito benéfico no desenvolvimento e sanidade das mesmas (KLOEPPER et al., 1980a). As BPCP atuam no controle biológico de doenças, como também diretamente na promoção de crescimento aumentando a produtividade e desenvolvimento das plantas (MARIANO; ROMEIRO, 2000).

As BPCP podem exercer o controle biológico de doenças de plantas através de um ou mais mecanismos tais como antibiose, sideróforos, produção de ácido cianídrico, indução de resistência e enzimas que degradam a parede celular como pectinase, celulase e β -1,3-glucanase (KLOEPPER, et al., 1989), além de parasitismo (LUZ, 1996), produção de ácido salicílico, desencadeando a indução de resistência (PRESS et al., 1997) e competição por ácidos graxos (VAN DIRK; NELSON, 2000).

Grande parte dos microrganismos envolvidos no controle biológico atua através de antibiose, ocorrendo interação entre organismos, onde um metabólito produzido por um deles tem efeito prejudicial sobre o outro. Também, em alguns casos, a produção de enzimas hidrolíticas pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular e independe do contato físico entre os microrganismos (BETTIOL; GHINI, 1995).

Dentre os gêneros mais utilizados em biocontrole de doenças de plantas, destaca-se o *Bacillus* com grande vantagem em relação a outros agentes de biocontrole, que permite sua utilização na formulação de produtos mais estáveis e viáveis e, sua aplicação no tratamento por via foliar (BACKMAN et al., 1997; KLOEPPER et al., 1989). Outra vantagem do gênero *Bacillus* se deve ao seu rápido crescimento em meio líquido e incapacidade de ser patogênico à maioria das espécies (SHODA, 2000).

Além do seu efeito direto na inibição do patógeno, Hassni et al (2007), em estudos de microrganismos que inibem *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, constataram que isolados de *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., e *Rahnella aquatilis* foram capazes de induzir reações de defesa em plantas sem causar mortalidade de mudas.

3.4 Bactérias do filoplano como possíveis agentes de biocontrole

A parte aérea das plantas geralmente são colonizadas por uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos. Enquanto algumas espécies microbianas podem ser isoladas a partir do interior dos tecidos de plantas, muitas são recuperadas a partir das superfícies de plantas saudáveis. O habitat aéreo colonizado por esses microrganismos é denominado filosfera, e os habitantes são chamados de epífitas (LINDOW; BRANDI, 2003).

Postulado por Last; Deighton (1965), o termo filoplano considera a superfície foliar, já o termo filosfera, adotado por Last (1955) em analogia a rizosfera, é o ambiente sob influência da superfície foliar. É um ambiente complexo, que sofre variações intermitentes de componentes ambientais como umidade, temperatura, incidência de radiação, ventilação, composição e quantidade de nutrientes (ANDREWS; HIRANO, 1991; WILSON et al., 1999).

No filoplano, as comunidades microbianas são diversas e incluem gêneros diferentes de bactérias, fungos filamentosos, leveduras, algas, protozoários e nematoides, embora este último menos frequente. Considerados habitantes transitórios de superfície das folhas, os fungos filamentosos estão presente predominantemente como esporo, e durante a esporulação essas espécies e leveduras colonizam este habitat de forma mais ativa (ANDREWS; HARRIS, 2000). As bactérias são, predominantemente, os habitantes mais abundantes da filosfera. Muitas vezes são encontrados números com média de 10^6 a 10^7 células.cm⁻² (até 10^8 células.cm⁻²) da folha (ANDREWS; HARRIS, 2000; BEATTIE; LINDOWN, 1995).

Em comparação com a maioria dos outros habitats, há relativamente pouca pesquisa sobre a microbiologia da filosfera (LINDOW; BRANDL, 2003). Embora tenha havido alguma investigação das colônias de flores e brotos (ANDREWS; HARRIS, 2000; HALFELD-VIEIRA, 2002), a maioria dos trabalhos em microbiologia da filosfera focou em folhas, uma estrutura de planta aérea mais dominante.

As bactérias do filoplano são uma alternativa ainda pouco explorada, principalmente quando comparadas as rizobactérias (LINDOW; LEVEAU, 2002) e esta diferença se deve, principalmente, as características do habitat onde cada um se encontra. Explorar suas potencialidades e investigar a maneira que podem ser utilizadas como agentes de controle biológico de patógenos de parte aérea, pode

trazer grandes contribuições no manejo de doenças (HALFELD-VIEIRA et al.2004), já que elas podem ser capazes de atuar por antagonismo direto contra patógenos ou por indução de resistência (ROMEIRO, 2007), com um impacto ambiental mínimo, levando à melhoria das técnicas de cultivo e evitando perdas acentuadas por doenças.

No filoplano, a capacidade de um antagonista atuar por competição de nutrientes é maior que em outros nichos e é promovida quando ocorre sobreposição das exigências nutricionais do antagonista e do fitopatógeno, resultando em um baixo nível de coexistência entre os dois organismos em que um tende a excluir o outro (WILSON; LINDOW, 1994a). É necessário destacar a importância da disponibilidade de certos nutrientes para a permanência das populações de residentes no filoplano. Wilson e Lindow (1994) afirmam que a presença de carbono é determinante para que haja efetiva colonização das células bacterianas.

Microrganismos do filoplano podem desempenhar o controle biológico usando os compostos de carbono e nitrogênio, como principais recursos limitantes para o crescimento bacteriano em folhas (WILSON; LINDOW, 1994ab; MERCIER; LINDOW, 2000; PARANGAN-SMITH; LINDOW, 2013), para estabelecer e manter sua própria população. Esta capacidade de exclusão competitiva de preferência é fornecida pela similaridade nutricional para fontes de carbono e nitrogênio orgânico entre o antagonista e o agente patogênico (WILSON; LINDOW, 1994ab; DIANESE et al., 2003). Portanto, é desejável que bactérias residentes no filoplano utilizadas para atuar no controle biológico de organismos fitopatogênicos devam possuir habilidades para competir com o patógeno alvo por nutrientes e nichos, multiplicando-se e desenvolvendo-se nas mesmas condições ambientais ideais para a ocorrência da doença (ROMEIRO, 2007).

3.5 Importância de íons fe para o metabolismo bacteriano

O ferro (Fe) é um micronutriente essencial para plantas e microrganismos, e de extrema importância para as bactérias. Apenas algumas bactérias do gênero *Lactobacillus* e a *Borrelia burgdorferi* já foram apontadas como capazes de se desenvolver e multiplicar em ambiente livre de ferro para desempenhar suas funções

metabólicas utilizando, em substituição, íons manganês e cobalto (ANDREWS et al., 2003; KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012).

Normalmente, o ferro é utilizado como grupo prostético ou cofator de proteínas envolvidas em funções de síntese de aminoácidos, fixação de nitrogênio, ciclo do ácido cítrico, resistência a estresse redox e transporte de oxigênio. Também é utilizado em vários processos biológicos importantes, tais como a fotossíntese, a respiração e a biossíntese da clorofila (ANDREWS et al., 2003; CHU et al., 2010; BRAUN; HANTKE, 2011).

As bactérias podem superar a limitação de Fe no ambiente por meio de agentes quelantes chamados sideróforos. Os sideróforos são definidos como moléculas de baixo peso molecular em massa (<1000 Da) com elevada especificidade e afinidade para o quelante ou ligação preferencial de Fe^{3+} , seguido pelo transporte e deposição de Fe dentro de células bacterianas (NEILANDS, 1995; KREWULAK; VOGEL, 2008). Em geral, os patógenos de plantas são sensíveis à ação de sideróforos produzidos pelos antagonistas, em virtude de não os produzirem ou os produzirem com menor afinidade pelo ferro. (ROMEIRO, 2007).

Certas espécies do gênero *Pseudomonas* produzem sideróforos que quelatizam o ferro, inibindo o desenvolvimento de alguns microrganismos dependentes deste elemento para sua sobrevivência, incluindo fitopatógenos. O mecanismo para produção de sideróforos é estimulado sob condições de baixa disponibilidade de ferro. Nesse caso, os produtores de sideróforos têm vantagem ecológica sobre os outros, já que o pouco ferro disponível estaria disponível apenas para eles próprios, que na qualidade de produtores de sideróforos, desenvolvem um processo específico, ao nível de isolado, para obtenção do elemento e seu transporte pelo interior da célula (HOHNADDEL; MEYER, 1988).

3.6 Importância do nitrogênio no controle biológico

O nitrogênio(N) é um componente importante de macromoléculas que variam de proteínas a ácidos nucleicos e que são essenciais para todos os organismos vivos (CARROLL; SAL 2004). Para Huber e Watson (1974), formas de N são assimilados pelas plantas, mas podem ter efeitos opostos sobre doença, porque eles são metabolizados de forma diferente. Uma maneira em que a oferta N pode

influenciar nas interações planta-patógeno é através do impacto sobre a defesa da planta (WALTERS; HEIL, 2007). Alguns autores sugerem que uma nutrição deficiente neste elemento desfavorece a atuação dos mecanismos de defesa da planta (SNOEIJERS et al., 2000).

Estudos agronômicos indicam que a aplicação de N pode ter influência no desenvolvimento de doenças em plantas, no entanto levam a conclusões contraditórias, provavelmente por causa de diferentes requisitos para o crescimento e síntese de metabólitos relacionados a defesa aos organismos patogênicos. (HUBER; WATSON, 1974; WALTERS; BINGHAM, 2007; DORDAS, 2008). Para Fagard (2014), há uma relação complexa ligando absorção de N e o metabolismo e os processos de doença de infecção. Assim, embora seja claro que a disponibilidade de N interfira no desenvolvimento da doença, os mecanismos subjacentes permanecem obscuros. Também tem sido sugerido que agentes patogênicos biotróficos podem ter uma resposta diferente a fertilizantes nitrogenados em comparação com patógenos necrotróficos. O que se observa é que fertilizantes nitrogenados geralmente aumentam a suscetibilidade das plantas a biotróficos e diminuem a susceptibilidade das plantas a necrotróficos (SNOEIJERS et al. de 2000; DORDAS, 2008; BALLINI et al., 2013). Um exemplo é o impacto do fornecimento de N na suscetibilidade das plantas ao fungo *Botrytis cinerea* que depende da estirpe (LECOMPTE et al., 2010), o que poderia explicar, em parte, as contradições observadas na literatura quanto à efeito do nitrogênio sobre a doença.

Pesquisa realizada por Dalsing et al. (2015) indica que a *Ralstonia solanacearum* é inibida por concentrações elevadas de NO^3 ou do seu produto metabólico NO^2 . O nitrato influencia diretamente o crescimento de *R. solanacearum*, inibindo o seu crescimento em condições de baixo oxigênio. Em contraste, a adição de nitrito não aumentou o crescimento de *R. solanacearum* em qualquer nível. De fato, o crescimento celular foi inibido, sugerindo que, enquanto na respiração o NO^3 contribui diretamente para o crescimento sob limitação de oxigênio, a desnitrificação só facilita o crescimento indiretamente, através da eliminação de níveis tóxicos de NO^2 .

4 ESTADO DA ARTE

A mancha-bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Xap), é uma doença que ocorre em folhas e frutos (GONÇALVES; ROSATO, 2000; HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006). Assim como para maioria das espécies de *Xanthomonas*, o agente causal é uma típica bactéria habitante do filoplano, capaz de sobreviver associada às plantas em fase residente, que configura uma fonte de inóculo para o desenvolvimento da doença (STALL et al., 1993).

Apesar de escassa comprovação do papel epidemiológico das populações epifíticas, assume-se que essas bactérias patogênicas têm uma fase residente em plantas saudáveis que precede à infecção, o que é desencadeado e dependente da densidade de células viáveis no sítio infectivo (SHARON et al., 1982; HIRANO; UPPER, 1983; STROMBERG, 1999). Esta relação foi demonstrada para o crestamento bacteriano comum do feijoeiro em que um número base de 5×10^6 unidades formadoras de colônias compostas por células de *Xanthomonas a.* pv. *phaseoli* por 20cm^2 de tecido foliar foram consideradas necessárias para o desenvolvimento da doença (WELLER; SAETTLER, 1980). Da mesma forma, para *X. citri* pv. *citri*, a sobrevivência em fase residente e a formação de biofilme, representam eventos importantes na fase de pré-infecção e, portanto, para o desenvolvimento do cancro-cítrico (RIGANO et al., 2007).

Essas informações sugerem que a manutenção de populações residentes do patógeno em baixa densidade através de mecanismos diretos de antagonismo pode resultar em uma estratégia eficaz para o controle de doenças causadas por bactérias que apresentam fase residente prévia à infecção.

No contexto do controle biológico, as bactérias nativas do filoplano podem desempenhar este papel, utilizando fontes de carbono e nitrogênio, considerados os principais recursos limitantes à multiplicação de células e, portanto, ao estabelecimento de populações em filoplano (WILSON; LINDOW, 1994ab; MERCIER; LINDOW, 2000; PARANGAN-SMITH; LINDOW, 2013). Esta capacidade de exclusão prévia é provida pela similaridade nutricional entre o antagonista e o patógeno em que, o que for menos versátil na utilização de uma gama maior de compostos além dos que são objeto da competição, tem menores chances de

estabelecer suas populações no filoplano (WILSON; LINDOW, 1994a; DIANESE et al., 2003).

À semelhança do papel das fontes de carbono e nitrogênio, a disponibilidade de íons ferro no filoplano varia significativamente de acordo com a espécie vegetal, não sendo raro haver baixa concentração do elemento na superfície foliar (KARAMANOLI; LINDOW, 2006).

Além disso, íons ferro disponíveis são predominantemente pouco acessíveis na natureza, devido a sua baixa solubilidade (EXPERT; O'BRIAN, 2012). Nesta situação, a competição por ferro pode afetar não somente a multiplicação da população bacteriana no filoplano, mas também a modulação da expressão de genes, a virulência ao hospedeiro, produção de antibióticos e outros compostos tóxicos (KARAMANOLI et al., 2011), o que implica em consequências na intensidade da doença. Para *X. oryzae* pv. *oryzae* por exemplo, em experimentos com uma estirpe deficiente em produzir lesões em uma cultivar suscetível de arroz, ficou demonstrado que a disponibilidade de ferro para o metabolismo bacteriano, desempenhou um papel crítico na virulência de *X. oryzae* pv. *oryzae* (CHATTERJEE; SONTI, 2002).

Em estudo anteriormente conduzido, foi demonstrado que bactérias de filoplano selecionadas de plantas de maracujazeiro apresentam como fatores em comum o mecanismo de competição por íons ferro e/ou por fontes de nitrogênio orgânico o que, conforme exposto, explicaria como estes antagonistas atuam na redução da severidade da mancha-bacteriana incitada por Xap (HALFELD-VIEIRA et al., 2015).

Dois antagonistas foram capazes de produzir pioverdinas, que configura uma classe de sideróforos hidrossolúveis produzidos por espécies fluorescentes de *Pseudomonas*, com alta afinidade por íons Fe (MEYER, 2000; VARMA; CHINCHOLKAR, 2007; EXPERT; O'BRIAN, 2012). Particularmente o antagonista 29RR (identificado previamente por sequenciamento da região 16S como pertencente ao gênero *Pseudomonas*) foi capaz de inibir totalmente o crescimento de Xap por competição por íons ferro (HALFELD-VIEIRA et al., 2015). Também, todos os antagonistas apresentaram altos índices de sobreposição de nicho para as fontes de nitrogênio orgânico, em especial, aminoácidos, sendo o antagonista 18SP (identificado previamente por sequenciamento da região 16S como pertencente ao gênero *Arthrobacter*) o que apresentou índices de sobreposição de nicho de 100%

tanto para aminoácidos como para aminas e amidas. Por outro lado, os índices de sobreposição de nicho de Xap sobre os antagonistas apresentaram valores baixos (HALFELD-VIEIRA et al., 2015).

Desta forma, infere-se que os antagonistas são capazes de consumir, pelo menos, mais de 90% das fontes de aminoácidos capazes de serem utilizadas por Xap, podendo fazer com que não haja fonte de N disponível para o estabelecimento de Xap em fase residente quando o antagonista coloniza previamente o filoplano.

Em decorrência dos resultados obtidos, a hipótese da exclusão prévia de populações do patógeno devido à competição por esses elementos foi postulada como a responsável pelo controle da doença exercido por estes antagonistas. Para comprovar essa premissa, se faz necessário demonstrar que alterações na disponibilidade desses elementos interferem na densidade de células do patógeno no filoplano, fator pressuposto como condicionante à ocorrência da doença.

5 METODOLOGIA

5.1 Determinação da resistência de diferentes cultivares de maracujazeiro à mancha-bacteriana

Esta etapa foi realizada em casa de vegetação na Embrapa Roraima, com temperatura programada a 28°C, variando até 2°C, irrigação e adubação conforme recomendações para a cultura.. Foi avaliada a reação de seis cultivares de maracujazeiro à mancha-bacteriana para se determinar qual seria utilizada nos experimentos *in vivo*. Plantas das cultivares: FB 200, BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado, BRS Rubi do Cerrado, IAC 275 e IAC 277 foram cultivadas em vasos de 1 L, com o substrato plantmax, sendo 1 vaso por repetição, por 79 dias. Após esse período foram inoculadas por pulverização com uma solução de Xap, ajustada, com o auxílio de espectrofotômetro, a $Abs_{540} = 0,15$, com 10 repetições por tratamento. Cinco plantas de cada cultivar foram mantidas sem terem sido inoculadas com o patógeno para serem tomados os valores de referência de a serem tomados os valores de referência de área foliar para cada cultivar.

As plantas inoculadas foram avaliadas diariamente, determinando-se o período de incubação, a severidade aos 29 dias após a inoculação. A área foliar de cada planta, inoculada ou não inoculada foi determinada aos 30 dias, com auxílio de um medidor de área foliar.

A redução da área foliar foi calculada tomando-se o valor médio de área foliar das plantas não inoculadas menos o desvio padrão obtido das 5 plantas sadias de cada cultivar, ou seja, referente a área foliar mínima estimada que deveria ter uma planta sadia de cada respectiva cultivar ($amín$).

O percentual de redução da área foliar para cada planta inoculada foi calculado pela fórmula: %Redução da área foliar = $(amín - \text{área foliar da planta inoculada}) \times 100 / amín$.

Os resultados foram analisados por meio de teste Tukey ($p < 0,05$), regressão linear e correlação de Pearson.

5.2 Correspondência entre unidades formadoras de colônias e absorvância

Para se estabelecer acuradamente a correspondência entre absorvância e número de unidades formadoras de colônias (UFC), uma cultura de células do isolado Xap São Paulo (SP), mantido em coleção na Embrapa Meio Ambiente, foi cultivada em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 48 h. Em condições assépticas, no laboratório de fitopatologia da Embrapa Roraima, foi preparada uma suspensão ajustada a 0,150 em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm de absorvância (Abs_{540}), diluindo-se sucessivamente à metade suspensões subsequentes até a diluição 1/16. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas de cada suspensão em fator 1:10 até a diluição 10^{-6} . Uma alíquota de 100 μ L das diluições 10^{-5} a 10^{-6} de cada suspensão foi semeada em triplicata, em meio 523 e o material incubado a 27 °C por 72 h. Após esse período o número de colônias foi contado e então calculado no excel, o número de UFC correspondente a cada diluição, considerando o volume de cada suspensão plaqueada.

5.3 Seleção de mutante de Xap resistente à antibiótico a ser utilizado nos ensaios in vivo

Uma suspensão de células do isolado Xap SP, mantido em coleção na Embrapa Meio Ambiente, cultivada em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 48 h, foi preparada e ajustada na concentração $Abs_{540} = 0,2$ no laboratório de fitopatologia da Embrapa Roraima. Uma alíquota de 100 μ L da suspensão foi adicionada em meio 523 contendo rifampicina, na concentração de 20 $mg.L^{-1}$ e espalhada com auxílio de alça de Drigalski sobre a superfície do meio. Após incubação por 7 dias, uma colônia da bactéria resistente espontânea ao antibiótico foi repicada para o mesmo meio contendo uma concentração maior de rifampicina. O procedimento repetiu-se sucessivamente em meio com concentrações crescentes de rifampicina, até que se atingiu a alta concentração de 200 $mg.L^{-1}$ do antibiótico no meio (JACQUES et al., 2005). A cultura foi mantida no meio com o antibiótico nesta concentração por repicagem da cultura a cada 20 dias.

5.4 Determinação de unidades formadoras de colônias capaz de incitar o desenvolvimento da mancha-bacteriana

Foram cultivadas em vasos de 1L de capacidade 63 plantas de maracujazeiro da cultivar BRS Gigante Amarelo,(uma planta por vaso), utilizando substrato composto de solo, areia e esterco de carneiro curtido (1:1:1), com temperatura programada a 28°C, com até 2°C de variação, irrigação e adubação conforme recomendações para a cultura. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, na Embrapa Roraima, até apresentarem 5 folhas definitivas expandidas (79 dias). Foram preparadas suspensões a partir de cultura do isolado Xap SP cultivada em meio 523, mantido em coleção na Embrapa Meio Ambiente, resistente a 200 mg.L⁻¹ de rifampicina e ajustadas em espectrofotômetro para Abs₅₄₀=0,150. Em seguida foram feitas diluições para ajustar a concentração a 10⁵(T1), 10⁶(T2), e 10⁷(T3), UFC.mL⁻¹. Um grupo de 21 plantas foi inoculado com cada suspensão de Xap SP, por pulverização das suspensões nas faces abaxial e adaxial, até o ponto de escorrimento. As plantas foram mantidas em câmara úmida, sacos plásticos previamente umedecidos por 24h em casa-de-vegetação. Para verificação da capacidade de iniciar o processo infectivo em função da concentração de inóculo, as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação. Com a visualização dos primeiros sintomas, aos 8 dias após a inoculação, desprezou-se as 2 folhas mais novas e quantificou-se o número de lesões por folha nas cinco folhas seguintes de cada planta. Cada folha foi identificada com uma fita colorida, com o intuito de não haver confusão na hora da contagem de lesões e avaliação da severidade. Aos 20 dias após a inoculação, realizou-se estimativa da severidade da doença, onde foi estabelecido uma porcentagem de severidade para cada uma das 5 folhas avaliadas visualmente.

Os dados foram analisados por meio de regressão, utilizando-se o programa SigmaPlot v. 12.

5.5 Efeito do sideróforo produzido por antagonista previamente selecionado na população residente de Xap em filoplano

Neste ensaio utilizou-se o isolado 29RR, mantido em coleção na Embrapa Meio Ambiente, pertencente ao gênero *Pseudomonas* selecionado para o controle da mancha-bacteriana em estudo prévio. Este antagonista produz pioverdina e apresentou capacidade em inibir totalmente o crescimento de Xap em meio de cultura por competição por íons ferro (HALFELD-VIEIRA et al., 2015).

O experimento foi composto por 4 tratamentos: solução sem suplementação, apenas com a presença do patógeno; solução suplementada com 2 μM de Fe^{2+} , juntamente com a presença do patógeno; solução de pioverdina de $\text{Abs}_{363}=0,115$ com o patógeno; solução de pioverdina de $\text{Abs}_{363}=0,231$ com o patógeno.

Plantas cultivadas conforme descrito no item 5.4. Inicialmente cultivou-se o isolado 29RR, em tubos de ensaio, por 48h a 27°C em meio B de King (KING et al., 1954) líquido. Foi preparado 100 mL do meio B de King (semi-sólido) para cada tratamento, contido em erlenmeyer de 250 mL de capacidade. Fundiu-se o meio semi-sólido em microondas e esperou-se o frasco esfriar, incorporando então 1 mL da cultura da bactéria do meio líquido e misturou-se bem antes do meio solidificar. Os erlenmeyers foram levados a incubadora por 72h a 27°C. Após esse período, foram adicionados 100 mL de água destilada estéril no erlenmeyer, levando-se para agitador orbital, a 180.000g, por 60 min, para que os produtos difusíveis, incluindo os sideróforos secretados nas culturas, difundissem para a água. A difusão da pioverdina para água foi verificada por fluorescência em câmara escura com luz ultravioleta a 375 nm. A solução com os produtos difusíveis foi levada em tubos para a centrifuga. Após centrifugação a 10.000rpm, por 15 minutos, o sobrenadante foi filtrado com membrana de nitrocelulose com poros de 0,22 μm de diâmetro para eliminar as células bacterianas remanescentes. Mediu-se sua absorbância que foi de $\text{Abs}_{363}=0,231$. Esta solução foi então diluída a metade, obtendo-se uma segunda solução de pioverdina, de $\text{Abs}_{363}=0,115$. Como testemunhas utilizou-se erlenmeyers contendo somente o meio de cultura, com ou sem a suplementação por 2 μM de Fe^{2+} preparado a partir de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (marca Synth), sem o cultivo bacteriano. Xap

Foram pulverizadas 42 plantas com o sobrenadante do isolado 29RR até o ponto de escorrimento, sendo 21 plantas pulverizadas com a solução a

Abs₃₆₃=0,231, e 21 com a concentração reduzida pela metade Abs₃₆₃=0,115. As testemunhas tiveram sua representação por dois grupos de 21 plantas. No primeiro, as plantas foram pulverizadas somente com a solução dos erlenmeyers sem o cultivo bacteriano da 29RR, contendo apenas o meio de cultura sem suplementação de Fe²⁺. O segundo grupo teve as plantas pulverizadas com a solução obtida dos erlenmeyers sem o cultivo bacteriano da 29RR, contendo somente o meio de cultura com a suplementação por 2 µM de Fe²⁺.

No mesmo dia, após a secagem da suspensão sobre as folhas, inoculou-se a suspensão de Xap SP resistente a 200 mg.L⁻¹ de rifampicina, por pulverização, em todos os tratamentos, levando-se as plantas de imediato para câmara úmida, feita através de sacos plásticos previamente umedecidos, onde permaneceram 24 h casa na de vegetação. Para o preparo da suspensão de Xap mutante, a cultura foi cultivada em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), incubada por 72 h a 27 °C e suspensa em água destilada, ajustando-se a concentração bacteriana em 540nm, na concentração 10⁷ UFC.mL⁻¹.

Ao retornarem da câmara úmida, uma área de 9 cm² da folha basal foi coletada com o auxílio de um furador previamente esterilizado, adicionada em erlenmeyer de 125 mL de capacidade contendo 20 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% + 0,05% de Tween 80 e submetida a agitação em agitador orbital a 170 rpm por 30 min. Três amostras de folhas para cada tratamento foram utilizadas, constituindo cada amostra obtida de uma planta diferente, uma repetição. Após diluição seriada, até o fator 1:10³, 100 µL da suspensão foi adicionado em uma placa de petri com meio 523, contendo 50 ppm de ciclohexamida (2mL de uma solução estoque de 0,125g.50mL⁻¹ de água destilada estéril), e rifampicina na concentração de 200 mg.L⁻¹, conforme estipulada no segundo experimento, e espalhada com auxílio de alça de Drigalski na superfície do meio. Após incubação por 72h a 27 °C contou-se o número de colônias e foi calculado número de UFC por cm⁻² de folha. As amostras foram coletadas diariamente de três plantas por tratamento, até o período de 7 dias após a inoculação com Xap (adaptado de LANNA FILHO et al., 2010). Esta etapa foi realizada no laboratório de fitopatologia da Embrapa Roraima.

As análises estatísticas foram realizadas por meio de regressão, utilizando-se o programa SigmaPlot v.12, Xap(MADDEN et al., 2007). As taxas de crescimento da população de Xap em função do tempo foram analisadas por teste t para comparação entre os tratamentos.

5.6 Efeito do sideróforo produzido por antagonista previamente selecionado na severidade da mancha-bacteriana

Para verificar o efeito dos tratamentos na severidade da doença, selecionou-se 12 plantas de cada tratamento utilizados no experimento para quantificação da população residente de Xap SP em filoplano. Foram mantidas em casa-de-vegetação na Embrapa Roraima com temperatura programada a 28°C, com até 2°C de variação, irrigação e adubação conforme recomendações para a cultura, avaliadas diariamente. Com a visualização dos primeiros sintomas, aos 8 dias após a inoculação, desprezou-se as 2 folhas mais novas e quantificou-se o número de lesões por folha nas cinco folhas seguintes de cada planta. Cada folha foi identificada com uma fita colorida, com o intuito de não haver confusão na hora da contagem de lesões e avaliação da severidade. Aos 19 dias após a inoculação, realizou-se estimativa da severidade da doença, onde foi estabelecido uma porcentagem de severidade para cada uma das 5 folhas avaliadas visualmente.

O número de lesões por folha e a severidade foram analisados por meio do proc GLM do software SAS versão 9. As médias foram comparadas por meio do teste Fischer-LSD a 5% de significância.

5.7 Efeito da competição por fonte de N na redução da população residente de Xap em filoplano

Neste ensaio utilizou-se o antagonista 18SP, identificado como pertencente ao gênero *Arthrobacter*, selecionado para o controle da mancha-bacteriana em estudo prévio, não produtor de sideróforos, porém que apresentou índice de sobreposição de nicho de 100% quando consideradas as fontes de nitrogênio orgânico e eficiência no controle de três isolados distintos de Xap (HALFELD-VIEIRA et al., 2015).

Culturas do 18SP foram cultivadas por 48 h a 27°C em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970). 84 plantas foram cultivadas conforme descrito no item 5.4. Um grupo de 42 plantas foi pulverizado até o ponto de escorrimento com suspensão do antagonista 18SP ajustada a $A_{540} = 0,3$. A testemunha, representada por 42 plantas, foi pulverizada somente com água destilada estéril. As plantas foram mantidas em

câmara úmida, sacos plásticos previamente umedecidos, para favorecer a colonização pelo antagonista.

Após 24 h, um grupo de 21 plantas colonizadas com o antagonista e outro com água destilada estéril foram pulverizados com uma suspensão de ácido L-glutâmico (1g.L^{-1}) da marca Sigma, até o ponto de escorrimento. O ácido L-glutâmico foi determinado previamente como aminoácido capaz de ser usado tanto pelo antagonista como por Xap (HALFELD-VIEIRA et al., 2015) e capaz de suprir a demanda necessária ao metabolismo de *Xanthomonas* spp. (TAO et al., 2010; YUAN et al., 2010), nesta concentração. No mesmo dia, após a secagem do pulverizado com e sem a suspensão do antagonista, foi feita a inoculação com Xap, por pulverização em todos os tratamentos. Para o preparo da suspensão de Xap SP resistente a rifampicina fez-se o cultivo em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), com 50 ppm de ciclohexamida (2mL de uma solução estoque de $0,125\text{g.50mL}^{-1}$ de água destilada estéril), e rifampicina na concentração de 200 mgL^{-1} , conforme estipulada no segundo experimento, procedendo a incubação por 72 h a 27°C . Após suspensão em água destilada, a mesma foi ajustada em 540 nm à concentração de 10^7UFC.mL^{-1} . As plantas mantiveram-se em câmara úmida por 24 h e depois permaneceram na casa-de-vegetação. Desta forma os tratamentos foram compostos por plantas com ou sem antagonista e com ou sem suplementação por aminoácido.

Ao retornarem da câmara úmida, uma área de 9 cm^2 foi coletada, com o auxílio de um furador previamente esterilizado, diariamente de folhas basais, adicionando-se em erlenmeyer de 125 mL de capacidade contendo 20 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% + 0,05% de Tween 80 e submetendo-se à agitação em agitador orbital a 170 rpm por 30 min. Três amostras de folhas de plantas para cada tratamento foram utilizadas por dia, constituindo cada amostra obtida de uma planta diferente, uma repetição. Após diluição seriada, até o fator $1:10^3$, $100\text{ }\mu\text{L}$ da suspensão foi adicionada em meio 523, contendo 50ppm de ciclohexamida (2 mL de uma solução estoque de $0,125\text{ g.50mL}^{-1}$ de água destilada estéril), e rifampicina na concentração de 200 mgL^{-1} , conforme estipulada no segundo experimento, e espalhada com auxílio de alça de Drigalski na superfície do meio. Após incubação por 72h dias a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ o número de colônias foi contado e calculado o número de UFC por cm^2 de folha. Coletaram-se diariamente as amostras de 3 plantas por tratamento, até o período de 7 dias após a inoculação com Xap (adaptado de LANNA FILHO et al., 2010).

As análises estatísticas foram realizadas por meio de regressão, utilizando-se o programa SigmaPlot v.12., que estabeleceu o modelo e a equação que melhor representa a dinâmica populacional de Xap (MADDEN et al., 2007) As taxas de crescimento da população de Xap em função do tempo foram analisadas por teste t para comparação entre os tratamentos.

5.8 Efeito da competição por fonte de N na severidade da mancha-bacteriana

Para verificar o efeito dos tratamentos na ausência ou presença de suplementação com 1 g.L^{-1} de ácido L-glutâmico na severidade da doença, utilizou-se 13 plantas de cada tratamento utilizados no experimento para quantificação da população residente de Xap SP em filoplano. Foram mantidas em casa-de-vegetação na Embrapa Roraima com temperatura programada a 28°C , com até 2°C de variação, irrigação e adubação conforme recomendações para a cultura, avaliadas diariamente. Com a visualização dos primeiros sintomas, aos 7 dias após a inoculação, desprezou-se as 2 folhas mais novas e quantificou-se o número de lesões por folha nas cinco folhas seguintes de cada planta. Cada folha foi identificada com uma fita colorida, com o intuito de não haver confusão na hora da contagem de lesões e avaliação da severidade. Aos 18 dias após a inoculação, realizou-se estimativa da severidade da doença, onde foi estabelecido uma porcentagem de severidade para cada uma das 5 folhas avaliadas visualmente.

O número de lesões por folha e a severidade foram analisados por meio do proc GLM do software SAS versão 9. As médias foram comparadas por meio do teste Fischer-LSD a 5% de significância.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Determinação da resistência de diferentes cultivares de maracujazeiro à mancha-bacteriana

Não houve diferença estatística entre os períodos de incubação da doença entre as seis cultivares analisadas. A cultivar BRS Rubi do Cerrado foi que apresentou maior redução da área foliar e severidade da doença. Por outro lado, FB200 foi a que apresentou menores valores destas duas variáveis (Figura. 1 e 2).

Figura 1 - Severidade média e período de incubação da mancha-bacteriana em plantas de seis diferentes cultivares de maracujá infectadas por *X. a. pv. passiflorae*. S. Cerrado= BRS Sol do Cerrado, G.Amarelo= BRS Gigante Amarelo e R.Cerrado= BRS Rubi do Cerrado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

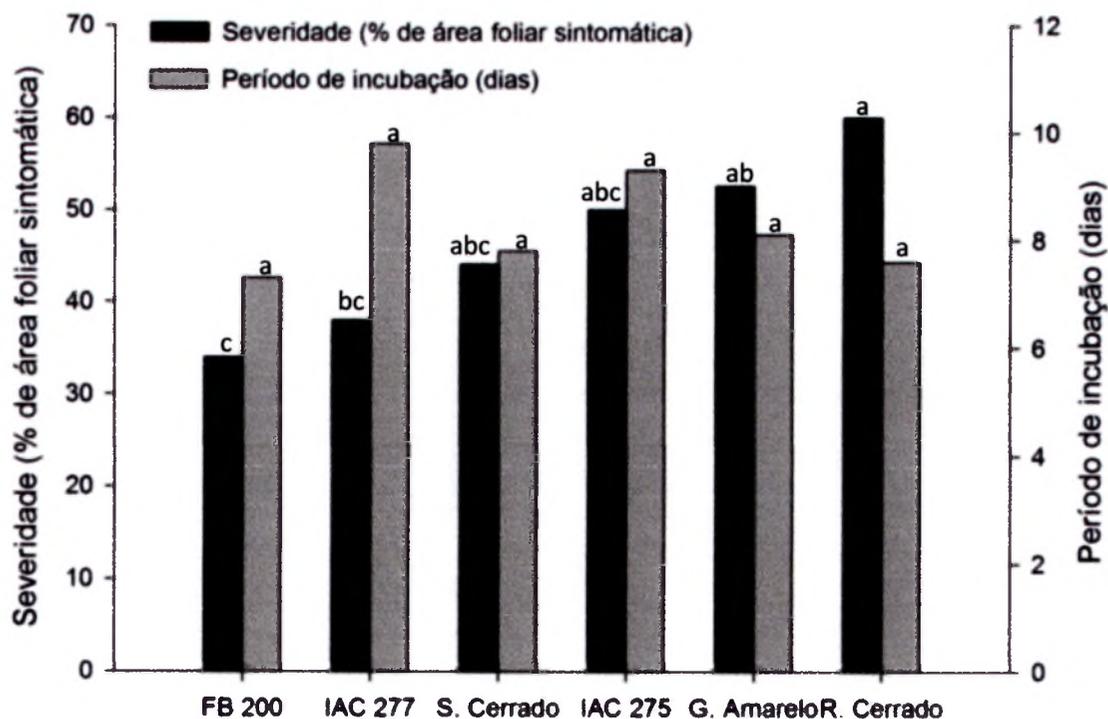
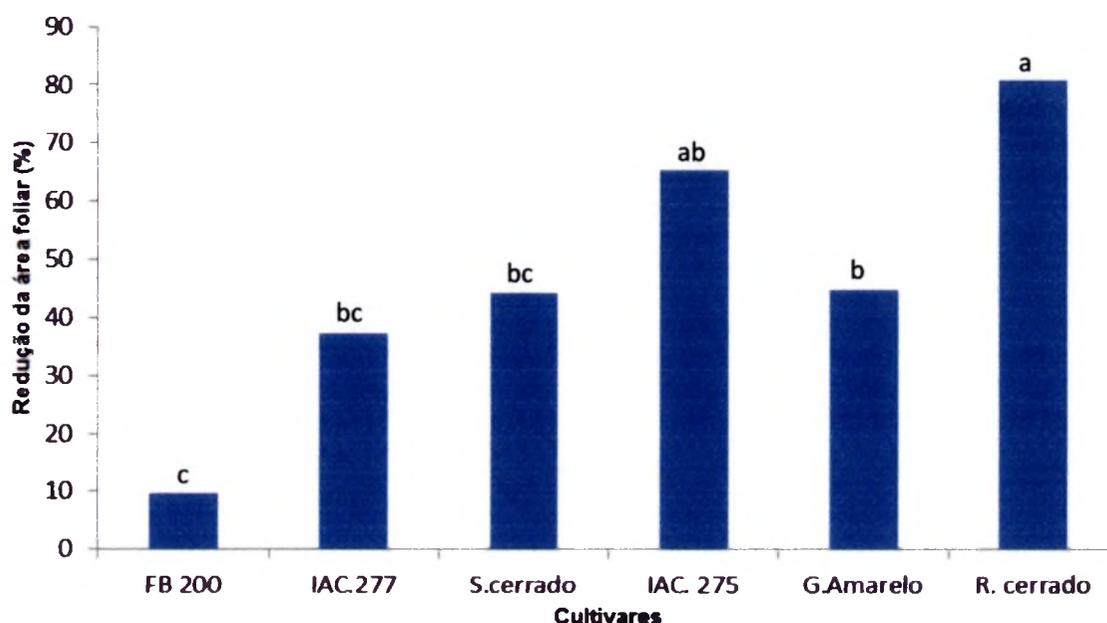
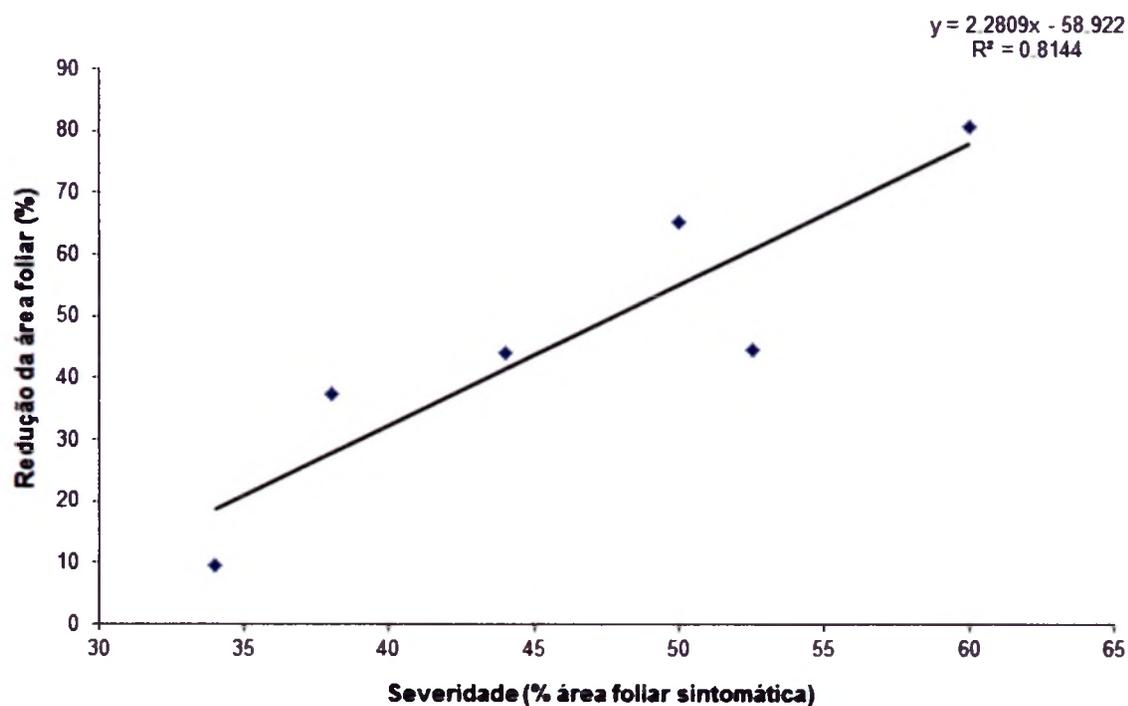


Figura 2-Redução média percentual da área foliar em plantas de seis diferentes cultivares de maracujá infectadas por *X. a. pv. passiflorae*. S. Cerrado= BRS Sol do Cerrado, G.Amarelo= BRS Gigante Amarelo e R.Cerrado= BRS Rubi do Cerrado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Entre as cultivares analisadas, houve correlação linear moderada e positiva entre severidade e redução de área foliar (Figura 3), tendência também encontrada em trabalhos realizados por Kososki et al. (2008) e Viana et al. (2014). A cultivar FB200 apresentou maior resistência à doença. A cultivar BRS Rubi do Cerrado foi a mais suscetível à doença, apresentando também a maior redução da área foliar. A BRS Gigante Amarelo também apresentou alta suscetibilidade à mancha-bacteriana, associado a um moderado nível de desfolha, fator levado em consideração na escolha da cultivar para os ensaios, evitando perda de folhas excessiva e interferência nas avaliações a serem feitas nos experimentos subsequentes. Em estudo avaliando a resistência de maracujá azedo à bacteriose, Mendes et al.(2015) afirmou que o genótipo BRS Gigante Amarelo mostrou-se suscetível a bacteriose na fase de mudas, sob casa de vegetação. Fuhrman et al (2014), analisando a reação de híbridos de *Passiflora* spp. à Xap concluíram que a cultivar comercial BRS Gigante Amarelo foi a mais suscetível a mancha-bacteriana, sendo classificada com altamente suscetível.

Figura 3 - Correlação linear entre a severidade da mancha-bacteriana do maracujá e a redução da área foliar. Coeficiente de correlação de Pearson: $r = 0,56$ ($p < 0,0001$).



6.2 Correspondência entre unidades formadoras de colônias e absorvância

A relação *in vitro* entre número de unidades formadoras de colônias (UFC) da Xap e absorvância pode ser observada na Tabela 1. A reta predita pela que relaciona a concentração bacteriana ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função das diluições a partir do valor de absorvância 0,15 em leitura a 540nm pode ser visualizada na Figura 6.

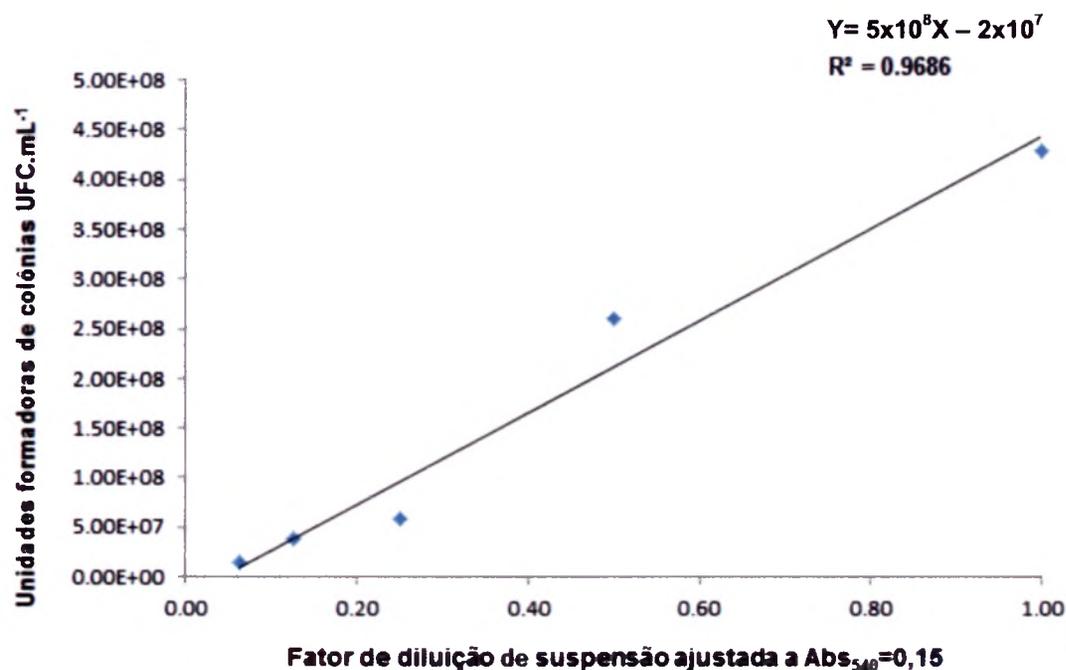
Tabela1-Valores observados entre unidades formadoras de colônias (UFC) e fator de diluição de suspensão

Tratamentos ^Z	Nº de colônias de Xap ^Y
Abs₅₄₀=0,15	4,28x10⁸
1/2 de Abs₅₄₀=0,15	2,60x10⁸
1/4 de Abs₅₄₀=0,15	5,80x10⁷
1/8 de Abs₅₄₀=0,15	3,93x10⁷
1/16 de Abs₅₄₀=0,15	1,40x10⁷

Z – Fator de diluição de suspensão ajustada a Abs₅₄₀=0,150.

Y- Unidades formadoras de colônias de Xap ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Figura 4- Correspondência entre concentração bacteriana (unidades formadoras de colônias (UFC/mL⁻¹) e fator de diluição, a partir de suspensão bacteriana ajustada a Abs₅₄₀=0,150



Os resultados mostram uma relação linear entre absorvância da suspensão e número de UFC encontrado, com equação da reta $Y = 5 \times 10^8 X - 2 \times 10^7$, a qual apresentou coeficiente de determinação (R^2) igual a 0.9686. Com o resultado obtido foi possível estabelecer a diluição necessária a ser feita em uma suspensão bacteriana com Abs₅₄₀= 0,15, para se atingir uma determinada concentração em UFC.mL⁻¹. Com a definição da correspondência de UFC.mL⁻¹ e as diluições foi possível determinar com exatidão a concentração de células bactérias na suspensão. Esta informação, utilizada para montar o experimento de determinação de UFC capaz de incitar o desenvolvimento da mancha bacteriana, permite que em trabalhos futuros seja utilizado não simplesmente a absorvância e suas diluições, mas o número de ufc.mL⁻¹, o que é bem mais exato

6.3 Seleção de mutante de Xap resistente a antibiótico utilizado nos ensaios *in vivo*

A cultura bacteriana utilizada nos experimentos teve como característica ser resistente a 200 mg.L⁻¹ de rifampicina e 50 ppm de ciclohexamida. O uso dessas substâncias suprimiu o crescimento de outras bactérias e fungos, permitindo a contagem exclusiva das colônias de Xap em placas nos ensaios.

O mutante espontâneo de Xap SP resistente a rifampicina mostrou estabilidade para resistência ao antibiótico, além de apresentar crescimento em meio 523 e causar doenças em plantas de maracujazeiro. Resultados semelhantes foram encontradas para mutantes Aac1Rif de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (SILVA et al., 2006) e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato* e *P. viridiflava* (MARIANO, MCCARTER, 1991 a, b; 1993).

6.4 Determinação de unidades formadoras de colônias capaz de incitar o desenvolvimento da mancha-bacteriana

Embora todas as concentrações de UFC testadas tenham mostrado capacidade de incitar o desenvolvimento da mancha-bacteriana (Figura 5), os resultados indicam que a concentração mínima da suspensão bacteriana que irá fazer com que a população adicionada na suspensão em folha seja capaz de iniciar o processo de infecção é de $1,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹. Os resultados corroboram com trabalhos realizados por Kosoviski (2008) e Viana (2014), que utilizaram concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, e por Mendes (2015) a concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ de Xap confirmando a incitação da doença em seus experimentos com as concentrações utilizadas.

A concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ incitou a doença de forma a proporcionar, pelo menos, uma lesão por folha e uma severidade acima de 1% (Figura 6 e 7). Esse fator foi determinante para escolha dessa concentração para as inoculações, para que houvesse um valor de severidade mínimo de 1% ao usar essa concentração na inoculação.

Figura 5: Relação entre concentração bacteriana em suspensão e severidade da mancha-bacteriana. (T1 - 10^5 ; T2- 10^6 ; T3- 10^7 UFC.mL⁻¹)

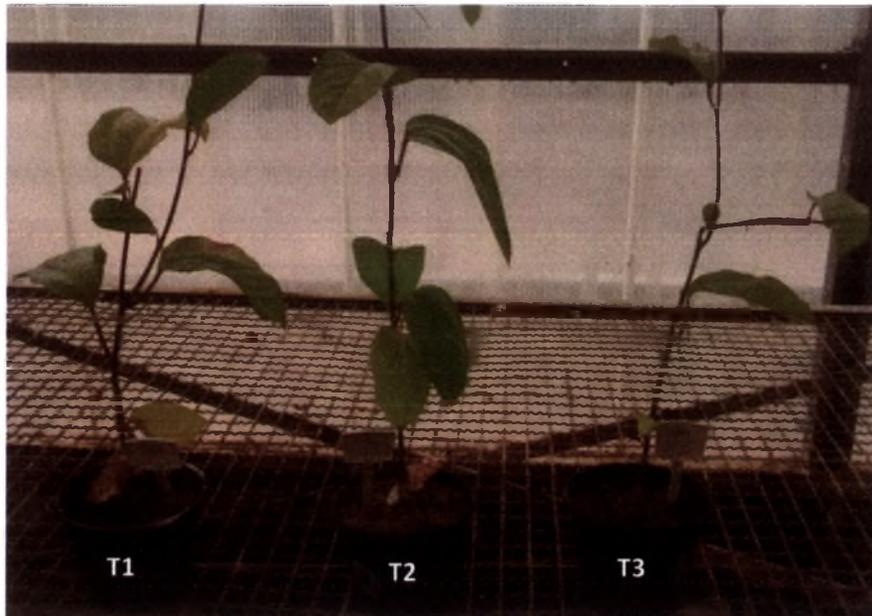


Figura 6- Relação entre diferentes concentrações de *Xanthomonas axonopodispv. passiflorae* ($\ln 10^5$, $\ln 10^6$ e $\ln 10^7$, UFC.mL⁻¹) e número de lesões por folha aos 8 dias após a inoculação.

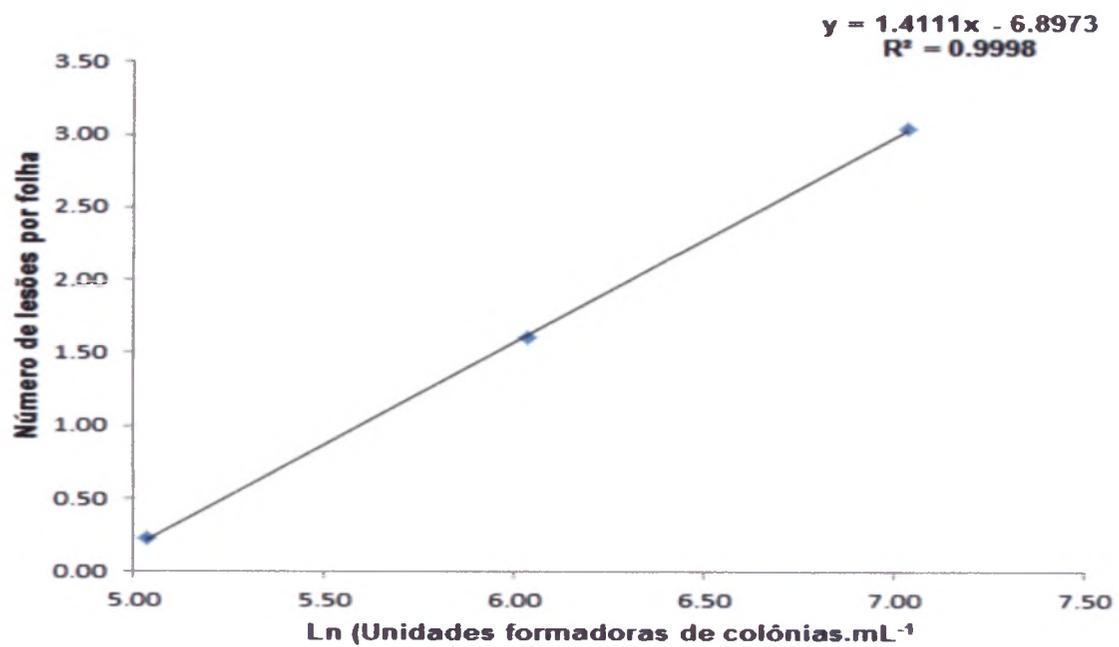
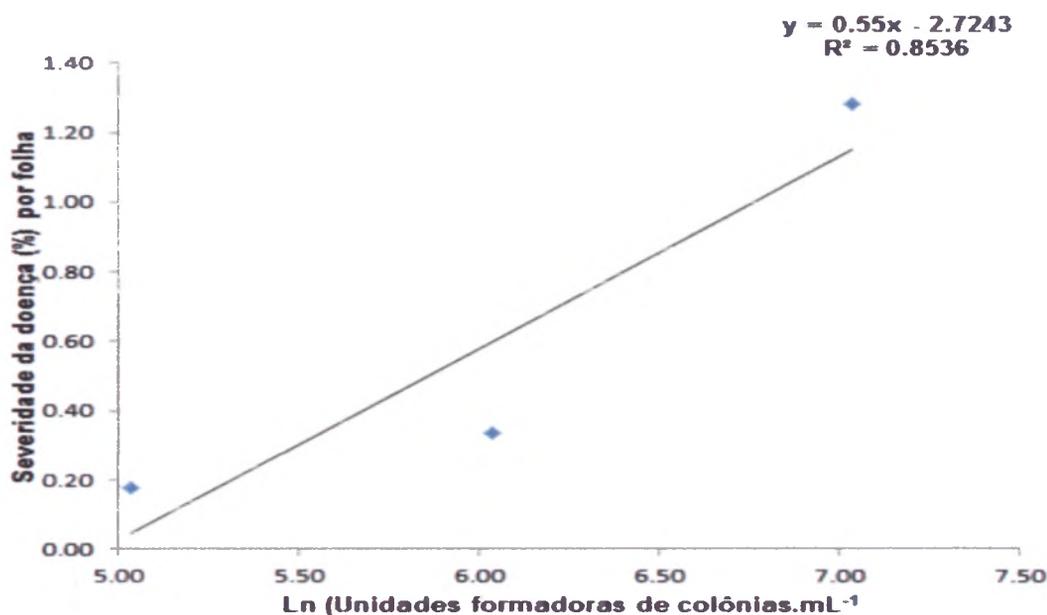


Figura 7 - Relação entre diferentes concentrações de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* ($\ln 10^5$, $\ln 10^6$ e $\ln 10^7$, UFC.mL⁻¹) e severidade da doença (% de área foliar lesionada) aos 20 dias após a inoculação.



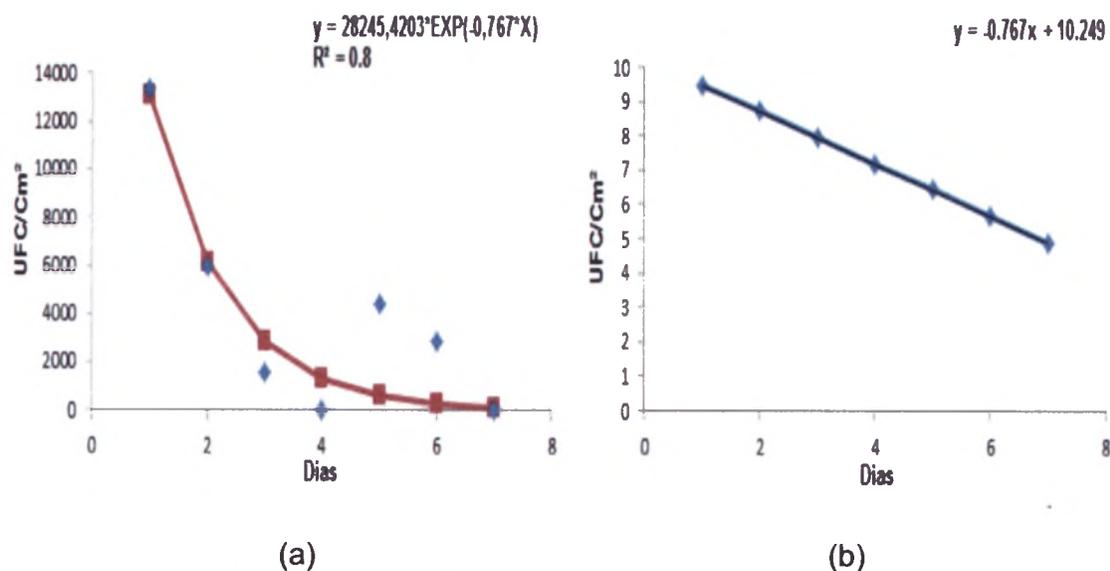
6.5 Efeito do sideróforo produzido por antagonista previamente selecionado na população residente de Xap em filoplano

Para Chaves (2013), uma das formas mais eficientes para captação de ferro extracelular encontrada por bactérias se dá através da síntese de sideróforos, moléculas de baixo peso molecular, que apresentam alta afinidade por íons ferro. A competição por ferro indica ser um fator de importância, já que este é essencial e importante ao metabolismo bacteriano, e sua baixa disponibilidade pode ser um fator limitante para o crescimento de bactérias antagonistas e fitopatogênicas.

Os dados mostraram que, na ausência do antagonista, as colônias do patógeno se desenvolveram normalmente, em meio suplementado ou não por sulfato ferroso, T1 e T2, respectivamente (Figura 8 e 9), apresentando baixas taxas de declínio para suas populações bacterianas (Tabela 2). No meio suplementado (Figura 8), inoculou-se um grande número de bactérias. O filoplano não apresentou recursos disponíveis para suprir a necessidade de toda a população residente, o que provavelmente ocasionou uma redução mais severa na população nos 4 primeiros dias, voltando a se estabelecer em seguida. No meio não suplementado (Figura 9), as bactérias conseguem manter sua população em desenvolvimento normal por um

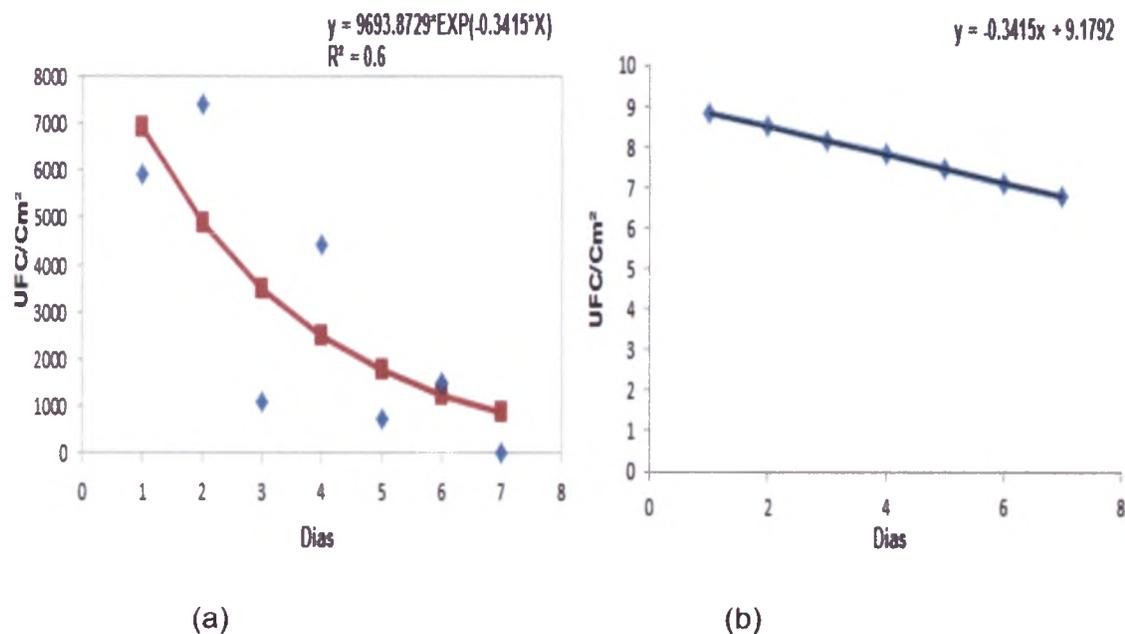
maior período de dias. A suplementação por íons ferro não influenciou o crescimento de colônias de Xap, indicando que o sideróforo é a molécula responsável pela redução de Xap, através da competição por ferro, conforme observado nos tratamentos 3 e 4 (Figura 10 e 11). Nestes tratamentos foi possível observar a competição da pioverdina diretamente com a Xap pela captação do ferro disponível. A medida que o Fe ia sendo indisponibilizado, a cultura bacteriana ia diminuindo seu crescimento (Figura 10). Na presença de uma solução mais concentrada de pioverdina (Figura 11), não foi possível a Xap obter o íon Fe e aumentar sua população no filoplano, apresentando uma taxa de declínio de sua população maior que os outros tratamentos que ainda apresentavam alguma disponibilidade deste íon.

Figura 8 - Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em relação ao tempo. Tratamento 1: Folhas pulverizadas com solução aquosa obtida através do meio 523 suplementado com 2 μM de Fe^{2+} .



(a) Dados observados (●) e modulados (■), (b) Dados preditos linearizados pelo uso do Ln. Unidades formadoras de colônias por 100 μL foram transformadas para Ln (UFC.100 μL^{-1}).

Figura 9 - Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em relação ao tempo. Tratamento 2: Folhas pulverizadas com solução aquosa obtida através do meio 523 não suplementado.



(a) Dados observados (◆) e modulados (■), (b) Dados preditos linearizados pelo uso do Ln. Unidades formadoras de colônias por 100 μ L foram transformadas para Ln ($\text{UFC} \cdot 100 \mu \text{L}^{-1}$).

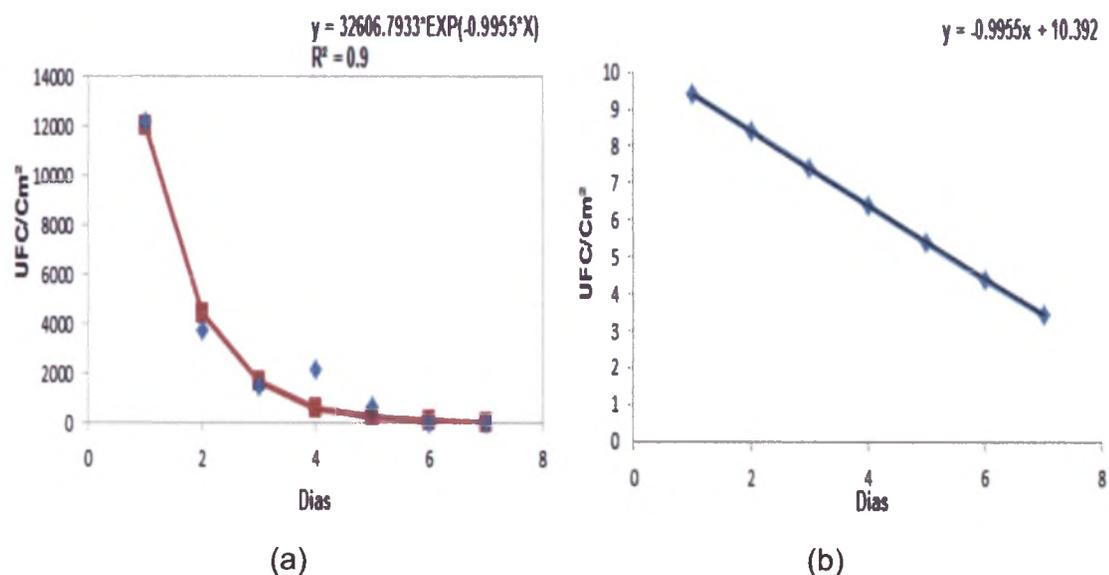
Tabela 2 - Contraste entre taxas de declínio da densidade populacional de Xap resultante dos tratamentos observados, de acordo com o teste t (tukey) a 5% e 1%, em que se verificou a competição por sideróforo.

Taxa de declínio: T1=-0,767; T2= -0,3415; T3= -0,9955; T4= - 7,9939					
T1-T2	-1,4280252	T2-T3	3,0747477**	T3-T4	10,3147754**
T1-T3	0,7773414	T2-T4	11,2497014**		
T1-T4	10,1809516**				

Valores tabelados t: 5%* = 2,57 1%** = 4,03. Os contrastes entre os tratamentos T2-T3; T2-T4 e T3-T4 diferiram entre si segundo o teste t, a 1% de significância.

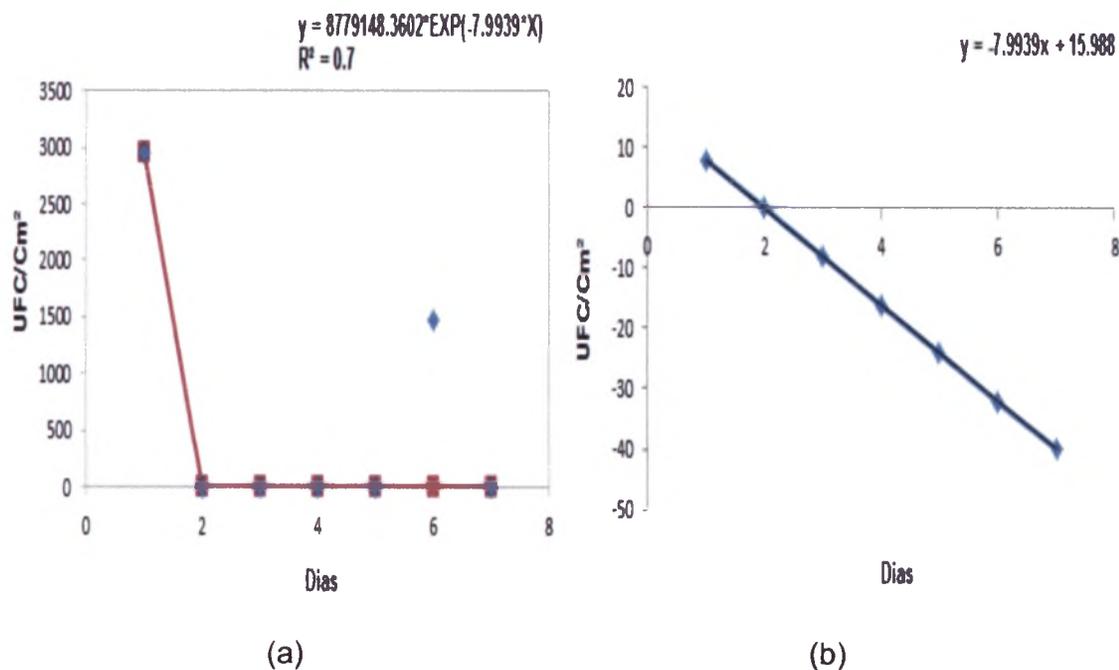
(T1) Plantas inoculadas com Xap + solução aquosa de meio B de King (testemunha 1); (T2) Plantas inoculadas com Xap + solução aquosa de meio B de King suplementado por 2 μ M de Fe⁺²; (T3) Plantas inoculadas com Xap + solução aquosa de pioverdina ($\text{Abs}_{363}=0,115$); (T4) Plantas inoculadas com Xap + solução aquosa de pioverdina ($\text{Abs}_{363}=0,231$).

Figura 10 - Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em relação ao tempo. Tratamento 3: Folhas pulverizadas com solução aquosa de pioverdina com $Abs_{363}=0,115$



(a) Dados observados (◆) e modulados (■), (b) Dados preditos linearizados pelo uso do Ln. Unidades formadoras de colônias por 100 μ L foram transformadas para Ln (UFC.100 μ L⁻¹).

Figura 11 - Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em relação ao tempo. Tratamento 4: Folhas pulverizadas com solução aquosa de pioverdina com $Abs_{363}=0,231$



(a) Dados observados (◆) e modulados (■), (b) Dados preditos linearizados pelo uso do Ln. Unidades formadoras de colônias por 100 μ L foram transformadas para Ln (UFC.100 μ L⁻¹).

O tratamento 3, com a segunda maior taxa de declínio ($td=-0,9955$), provavelmente interferiu de alguma forma, através da pioverdina, no processo

infectivo da Xap, no entanto não diferiu do tratamento 1 ($td=-0,767$), de forma que estes tratamentos não reduziram de forma significativa a população do patógeno. No tratamento 4, com maior concentração de pioverdina, foi apresentada a maior taxa de declínio da população bacteriana ($td=-7,9939$), reduzindo a população de Xap e diferenciando-se dos demais tratamentos analisados.

Diversos trabalhos mostram que a excreção de sideróforos por bactérias pode inibir o estabelecimento de patógenos de plantas, decorrentes do sequestro do ferro do meio ambiente. A competição por ferro, mediada pela produção de sideróforos, é considerada como um mecanismo importante no biocontrole de patógenos (WELLER, 1998; BENEDUZI et al., 2012). Exemplos de bactérias com esta atividade incluem *Pseudomonas putida* e *P. aeruginosa*, que inibem o crescimento dos patógenos de *Fusarium oxysporum* e *Pythium*, respectivamente (VANDENDERGH; GONZALEZ, 1984; BUYSSENS et al., 1995). Hafeld-Vieira et al. (2015) observaram em estudos realizados previamente, que o sideróforo produzido pelo antagonista 29RR inibiu totalmente o crescimento Xap em uma condição de baixa disponibilidade de ferro. Ao contrário dos fitopatógenos microbianos, as plantas não são prejudicadas com a depleção de ferro pelas bactérias produtoras de sideróforos. Algumas podem até capturar o complexo ferro-sideróforo bacteriano, transportando-o e disponibilizando ferro para suas células (CROWLEY et al., 1988).

Em condições altamente competitivas, a capacidade de adquirir ferro via sideróforos pode determinar o resultado de competição para diferentes fontes de carbono disponíveis (CROWLEY, 2006). Entre a maioria dos sideróforos estudados, os produzidos por *Pseudomonas* são conhecidos pela sua elevada afinidade pelo íon férrico. A pioverdina, por exemplo, pode inibir o crescimento de bactérias e fungos que apresentam sideróforos com menor afinidade ao elemento em meios *in vitro* pobres em ferro (KLOEPPER et al. 1980a).

Para a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, estudo realizado por Chatterjee e Sonti (2002), utilizando duas bactérias do filoplano selecionadas demonstraram que a disponibilidade de ferro desempenha um papel crítico no metabolismo da Xap, já que as duas bactérias do filoplano foram capazes de produzir pioverdinas, inibindo significativamente o desenvolvimento de colônias de Xap.

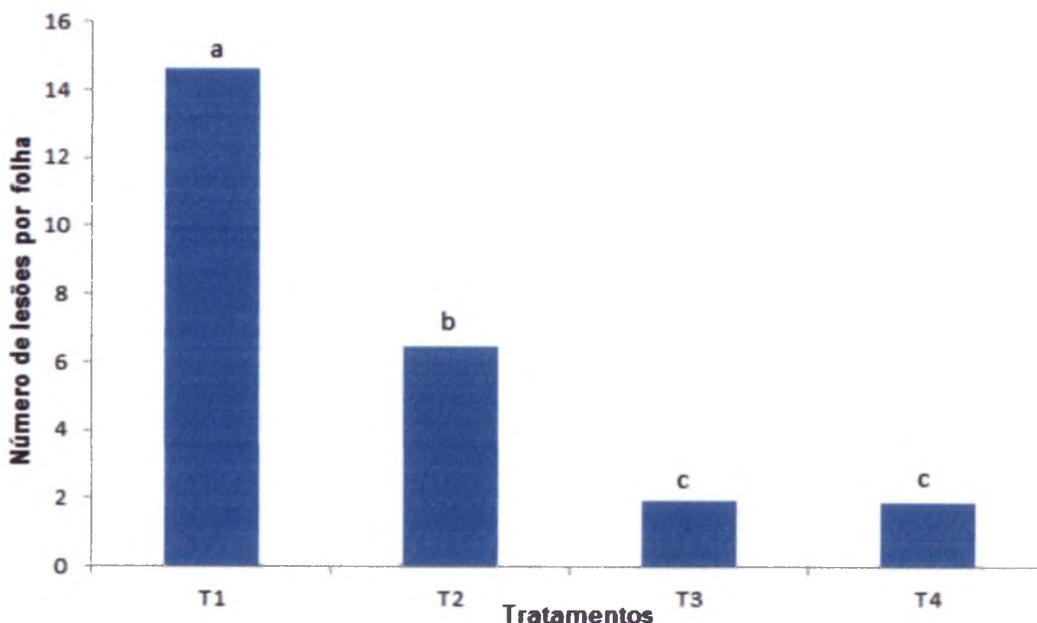
O sideróforo produzido pela bactéria *P. putida* foi capaz de suprimir *Fusarium oxysporum* em solo deficiente em ferro. Esta supressão foi perdida quando foi

adicionada fonte de ferro no solo, uma condição que reduz a necessidade de produção de quelantes por microrganismos (KLOEPPER et. al., 1980b).

6.6 Efeito do sideróforo produzido por antagonista previamente selecionado na severidade da mancha-bacteriana

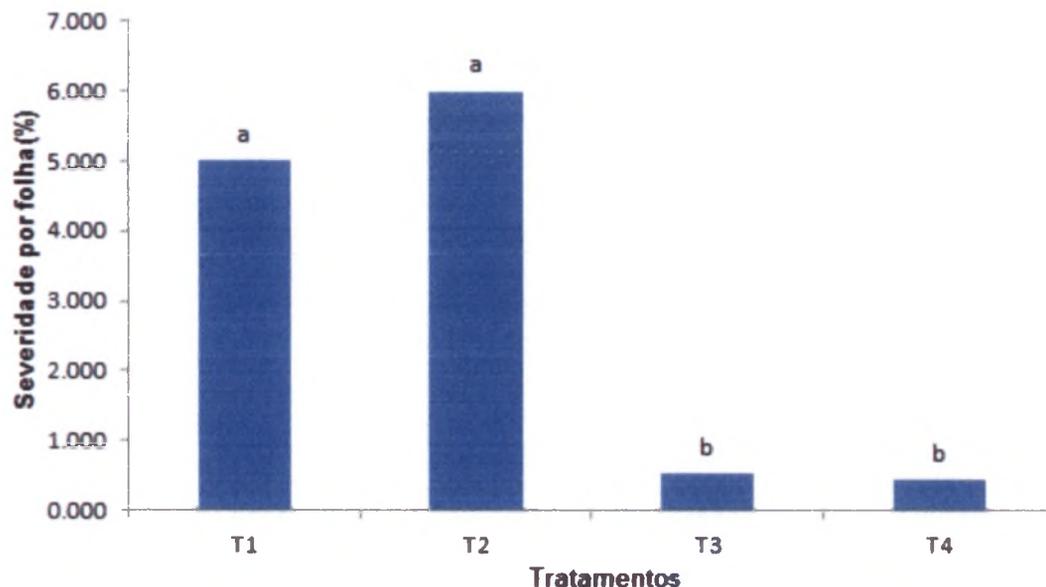
Os resultados mostram que houve diferença significativa do efeito do sideróforo produzido por antagonista no número de lesões (Figura 12) e na severidade (Figura 13) da mancha-bacteriana em folhas de maracujazeiro BRS Gigante Amarelo previamente tratadas, quando comparadas às folhas correspondentes nas plantas testemunhas indicando eficiência da pioverdina no controle do patógeno.

Figura 12 - Efeito da pioverdina produzida pela bactéria 29RR em relação ao número de lesões por folha causadas pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*(Xap SP) no maracujá BRS Gigante Amarelo.



(T1) Plantas inoculadas com Xap + solução aquosa de meio B de King (testemunha 1); (T2) Plantas inoculadas com Xap + solução aquosa de meio B de King suplementado por 2 μM de Fe^{+2} ; (T3) Plantas inoculadas com Xap + solução aquosa de pioverdina ($\text{Abs}_{363}=0,115$); (T4) Plantas inoculadas com Xap + solução aquosa de pioverdina ($\text{Abs}_{363}=0,231$).

Figura 13 - Efeito da pioverdina produzida pela bactéria 29RR na severidade (%) da mancha bacteriana causada pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Xap SP) no maracujá BRS Gigante Amarelo.



(T1) Plantas inoculadas com Xap + solução aquosa de meio B de King (testemunha 1); (T2) Plantas inoculadas com Xap + solução aquosa de meio B de King suplementado por 2 μM de Fe^{+2} ; (T3) Plantas inoculadas com Xap + solução aquosa de pioverdina ($\text{Abs}_{363}=0,115$); (T4) Plantas inoculadas com Xap + solução aquosa de pioverdina ($\text{Abs}_{363}=0,231$).

Em estudos realizados por Hafeld-Vieira et al. (2015), constataram que o sideróforo é a molécula responsável pela inibição do crescimento do patógeno, pois quando cultivou-se o antagonista em meio com suplementação de Ferro, este apresentou redução significativa na sua capacidade de inibição da Xap em comparação a quando foi cultivado em meio não suplementado.

Com os resultados obtidos, notou-se claramente a capacidade dos tratamentos 3 e 4 em reduzirem de forma significativamente a severidade da doença quando comparado com as testemunhas. Resultados semelhantes foram encontrados por Tortora et al. (2011), onde sideróforos produzidos por *Azospirillum brasilense* mostrou *in vitro* atividade antagônica a *Colletotrichum acutatum*, agente causal da antracnose. Além disso, uma redução dos sintomas da doença foi observada em plantas de morango (*Fragaria vesca*) previamente inoculadas com *A. brasilense*.

6.7 Efeito da competição por fonte de N na redução da população residente de Xap em filoplano

Para N, o teste Tukey mostrou não haver diferença entre as taxas de declínio das populações bacterianas testadas sob efeito do nitrogênio (Tabela 3), não registrando redução significativa na população do patógeno nos tratamentos analisados. Ou seja, a competição por N não modificou a densidade populacional do patógeno. Observa-se claramente um padrão de crescimento bastante semelhante em todos os tratamentos analisados (Figuras 14, 15 16 e 17). O antagonista 18SP e a fonte de ácido L-glutâmico não foram capazes de estimular ou inibir o desenvolvimento das colônias de Xap residentes no filoplano.

No meio suplementado sem a presença do antagonista (Figura 15), observa-se o declínio normal da população bacteriana, com um discreto aumento aos 7 dias após a inoculação.

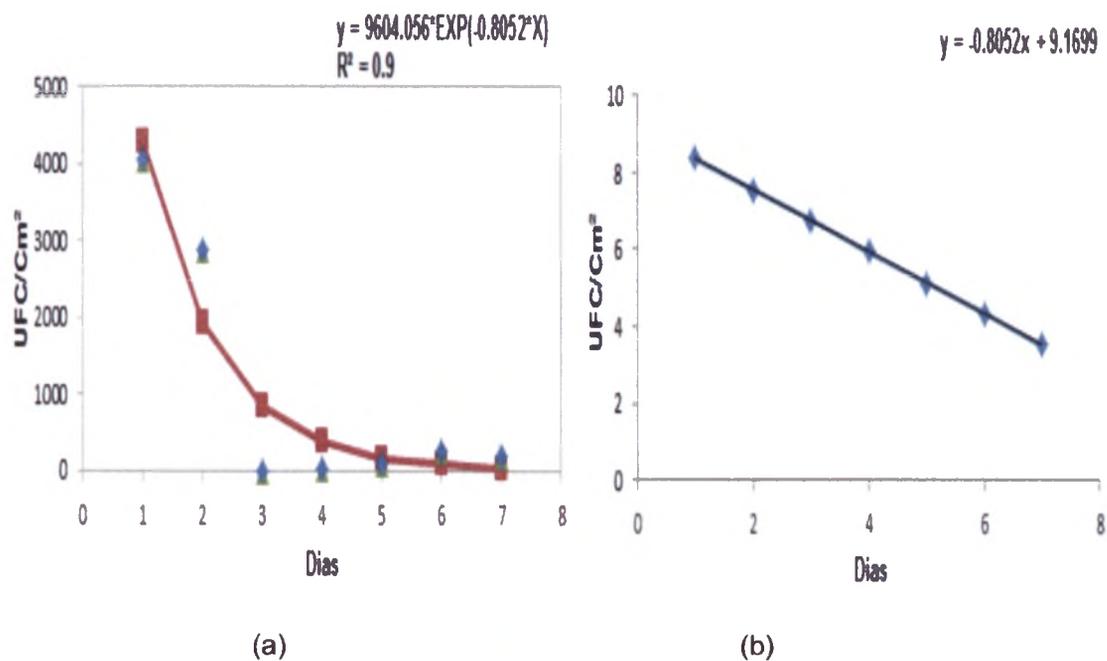
Tabela 3 - Contraste entre taxas de declínio da densidade populacional de Xap resultante dos tratamentos observados, de acordo com o teste t (tukey) a 5% e 1%, em que se verificou a competição por nitrogênio.

Taxa de declínio: T1= 0,8052; T2= 0,5396; T3= 0,6189; T4= 0,6158.					
T1-T2	-0,6680042	T2-T3	0,1737357	T3-T4	-0,0068319
T1-T3	-0,4707745	T2-T4	0,1673311		
T1-T4	-0,4800858				

Valores tabelados t: 5%* = 2,57 1%** = 4,03. Nenhum contraste entre tratamentos diferiu segundo o teste t.

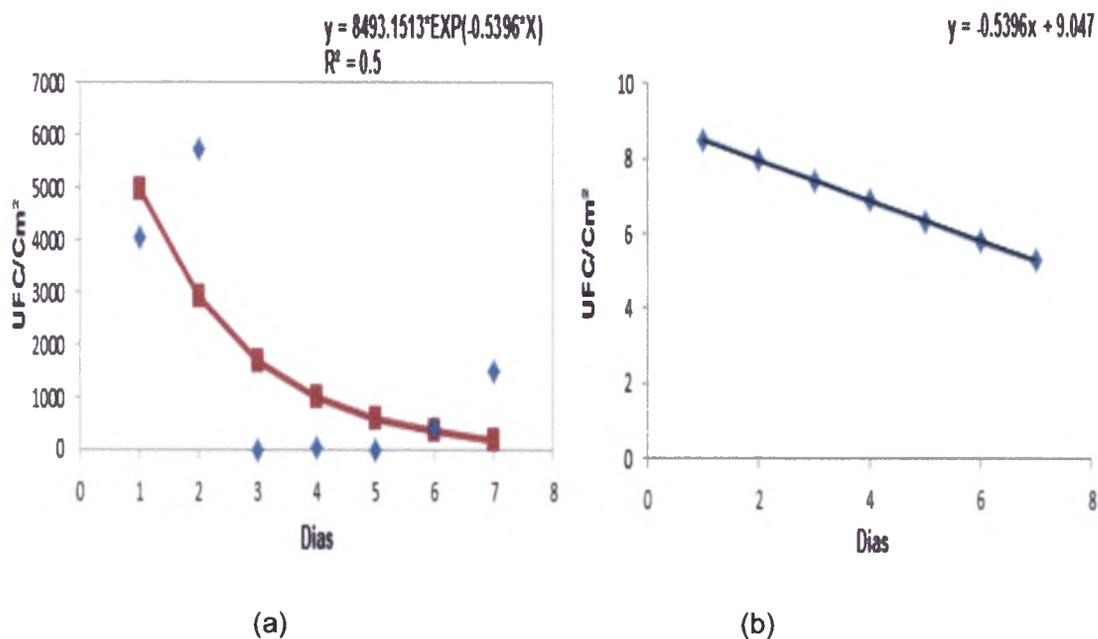
(T1) Plantas inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; (T2) Plantas inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e ácido L-glutâmico; (T3) Plantas inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e a antagonista 18SP; (T4) Plantas inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, ácido L-glutâmico e o antagonista 18SP.

Figura 14- Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em relação ao tempo. Tratamento 1: Folhas pulverizadas com água destilada estéril .



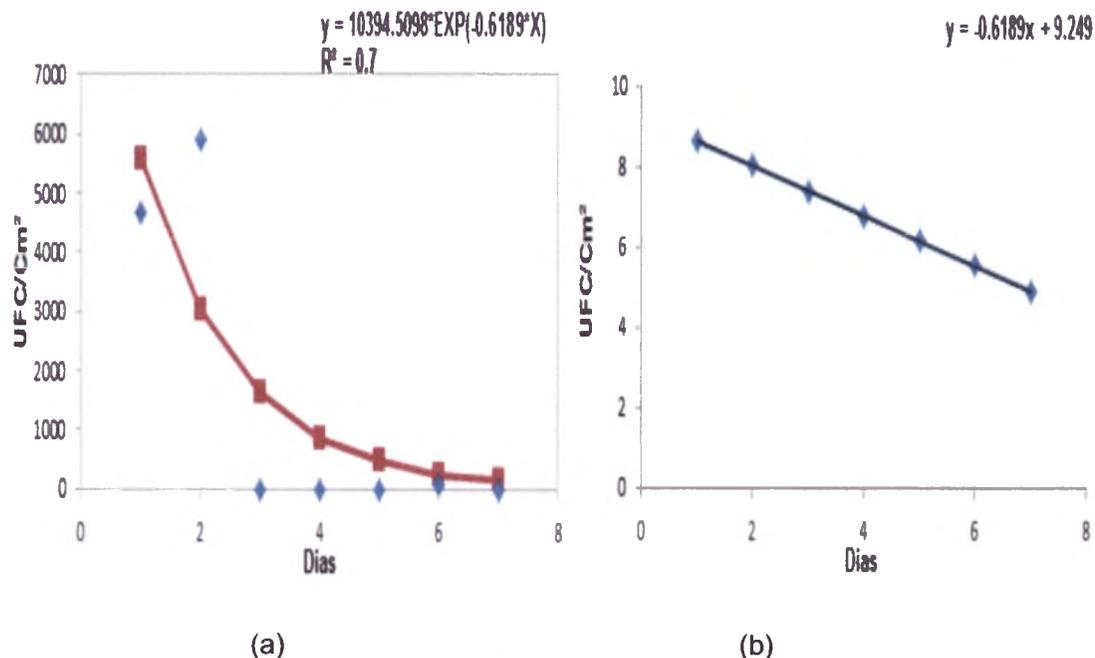
a) Dados observados (\blacklozenge e modulados (\blacksquare) (b) Dados preditos linearizados pelo uso do Ln. Unidades formadoras de colônias por 100 μ L foram transformadas para Ln (UFC.100 μ L⁻¹).

Figura 15- Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em relação ao tempo. Tratamento 2: Folhas pulverizadas com solução de ácido L-glutâmico (1g.L⁻¹) .



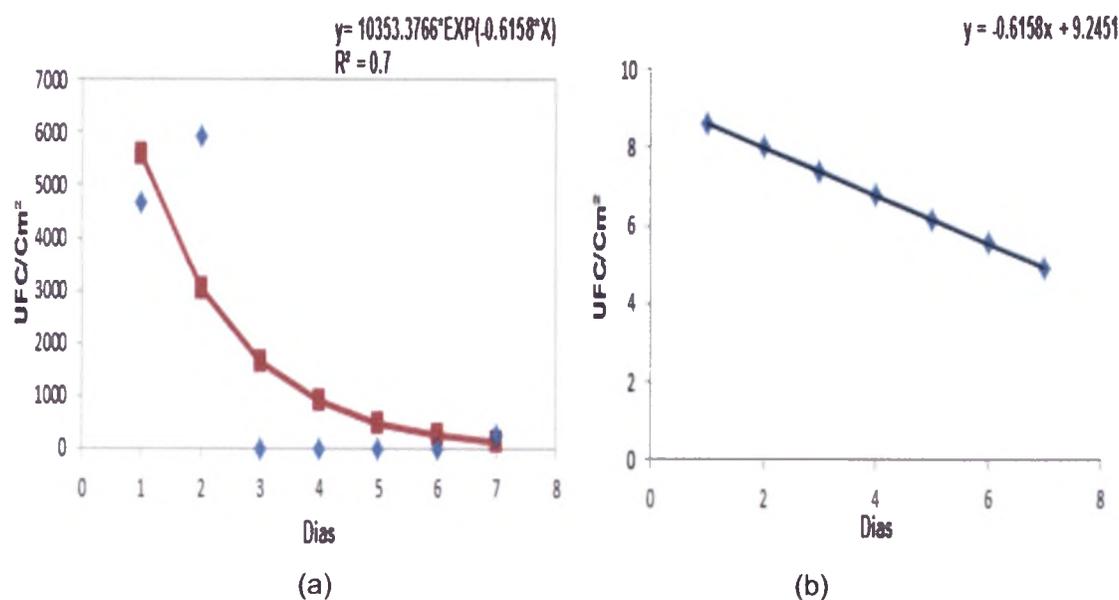
(a) Dados observados (\blacklozenge) e modulados (\blacksquare) (b) Dados preditos linearizados pelo uso do Ln. Unidades formadoras de colônias por 100 μ L foram transformadas para Ln (UFC.100 μ L⁻¹).

Figura 16 - Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em relação ao tempo. Tratamento 3: Folhas pulverizadas com solução obtida a partir do antagonista 18SP.



(a) Dados observados (◆) e modulados (■), (b) Dados preditos linearizados pelo uso do Ln. Unidades formadoras de colônias por 100 μ L foram transformadas para Ln (UFC.100 μ L⁻¹).

Figura 17 - Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em relação ao tempo. Tratamento 4: Folhas pulverizadas com solução obtida do antagonista 18SP e ácido L-glutâmico (1g.L⁻¹).

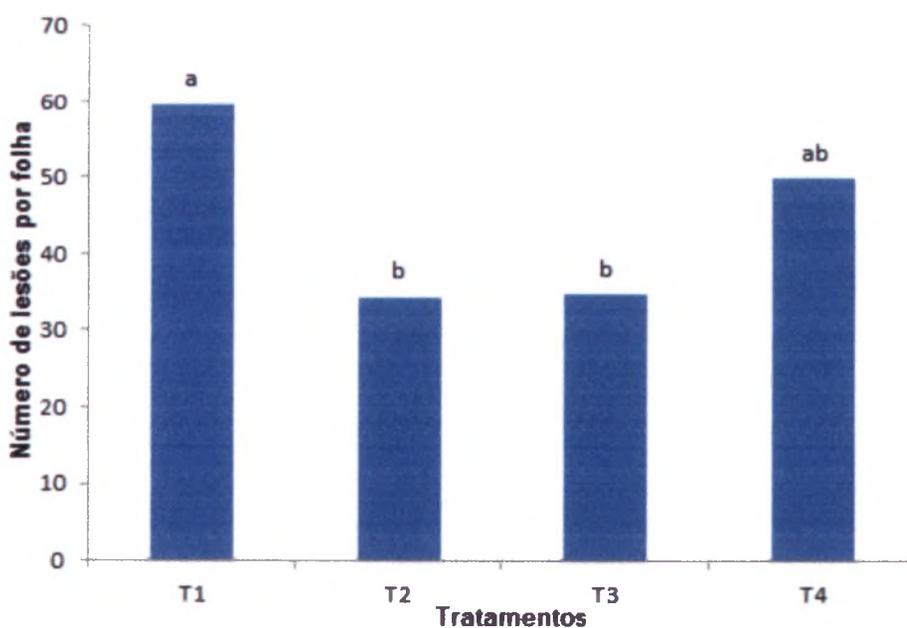


(a) Dados observados (◆) e modulados (■), (b) Dados preditos linearizados pelo uso do Ln. Unidades formadoras de colônias por 100 μ L foram transformadas para Ln (UFC.100 μ L⁻¹).

6.8 Efeito da competição por fonte de N no número de lesões e na severidade da mancha-bacteriana

Embora o uso do nitrogênio não tenha interferido na densidade populacional do patógeno, os resultados indicam que a competição por esse elemento interferiu de alguma forma no processo infectivo da Xap, ocasionando a redução do número de lesões (Figuras 18 e 19) e, conseqüentemente, severidade da doença (Figuras 20 e 21).

Figura 18 - Efeito do antagonista 18SP em relação ao número de lesões por folha causadas pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Xap SP) no maracujá BRS Gigante Amarelo.

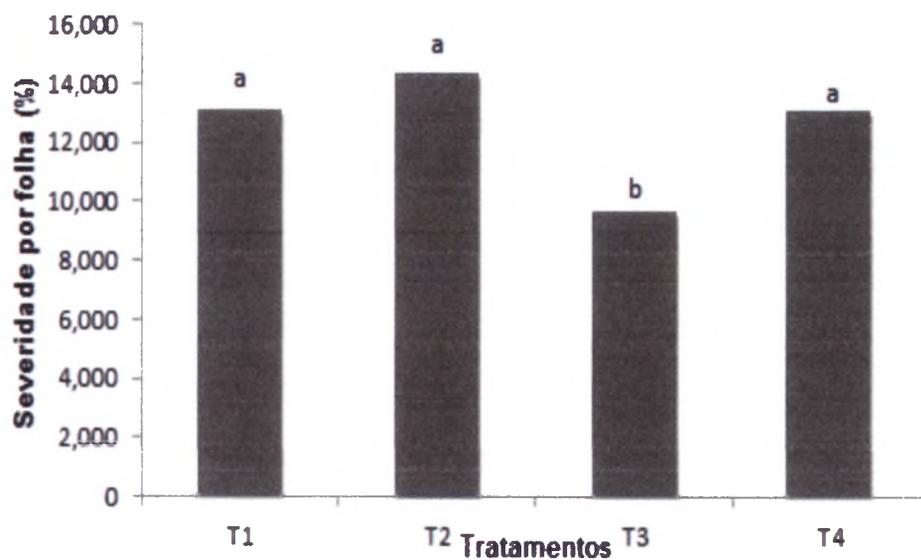


(T1) Plantas inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; (T2) Plantas inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e ácido L-glutâmico; (T3) Plantas inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e o antagonista 18SP; (T4) Plantas inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, ácido L-glutâmico e o antagonista 18SP.

Figura 19 – Comparativo do número de lesões entre a testemunha (T1) e o Tratamento com o antagonista 18SP (T3)



Figura 20 - Efeito do antagonista 18SP em relação a severidade (%) causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Xap SP) no maracujá BRS Gigante Amarelo.



(T1) Plantas inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; (T2) Plantas inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e ácido L-glutâmico; (T3) Plantas inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e a antagonista 18SP; (T4) *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, ácido L-glutâmico e o antagonista 18SP.

Figura 21 – Comparativo da severidade entre a testemunha (T1) e o Tratamento com o antagonista 18SP (T3)



No tratamento 2, para o parâmetro número de lesões por folha, foi observado que o ácido L-glutâmico se acumulou em alguns locais específicos, podendo ter interferido no processo de infecção, reduzindo assim, o número de sítios infectivos de Xap no filoplano.

No experimento, o uso do antagonista 18SP foi capaz de diminuir o número de lesões e a severidade nas plantas (tratamento 3), embora o número de colônias não tenha apresentado redução. No Tratamento 4, a antagonista 18SP provavelmente consumiu parte do substrato na superfície do filoplano, reduzindo o efeito deste composto sobre a Xap.

Os valores de severidade de T2, que não diferiram significativamente da testemunha, indicam que o filoplano de maracujá é capaz de prover uma alíquota mínima necessária para o patógeno se estabelecer e causar infecção. Nesse caso, a severidade não diferiu da testemunha, provavelmente pelo acúmulo do ácido L-glutâmico em alguns locais específicos, modificando o potencial osmótico na folha a ponto de interferir no processo de infecção, mesmo que a população da Xap tenha se mantido a mesma dos outros tratamentos.

As plantas inoculadas com Xap e que foram tratadas apenas com o antagonista 18SP (T3), em meio sem suplementação de fonte de nitrogênio, apresentaram uma severidade mais baixa da doença quando comparadas aos

demais tratamentos, permitindo atribuir a redução da severidade da mancha bacteriana pelo antagonista 18SP.

Verificou-se que no T4, o efeito ácido L-glutâmico eliminou a capacidade de controle exercida pelo antagonista 18SP não reduzindo a severidade da mancha bacteriana. O efeito da competição se tornou evidente, já que ao adicionar o ácido L glutâmico a severidade sobe a níveis intermediários entre a testemunha e os demais tratamentos. O maior valor de severidade no T4 em relação a T3 deve ter ocorrido porque a 18 SP foi mais uma a consumir esta molécula, reduzindo a quantidade dela e melhorando a condição para Xap infectar. Como ainda havia disponibilidade deste elemento para Xap e 18SP se desenvolverem bem, o efeito pronunciado da 18SP na redução da severidade foi reduzido.

Embora não tenha havido redução da população residente de Xap em filoplano, constatou-se que de alguma forma a competição pela fonte de N interfere no processo de infecção, uma vez que na ausência da suplementação por fonte de C e N ou presença do agente de biocontrole houve redução na severidade da doença. Dietrich et al. (2004), obtiveram resultados onde concluíram que embora seja claro que a limitação de N tem um impacto na defesa da planta, ainda é difícil descrever este efeito.

Snoeijers et al. (2000) afirmam que o suprimento de N pode afetar interações planta-patógeno através de um efeito sobre a virulência do patógeno. Vários processos infecciosos são modulados por alterações na disponibilidade de N *in vitro*. Por exemplo, o desenvolvimento da forma filamentosa do basidiomiceto *Ustilago maydis*, que é um pré-requisito para a infecção de plantas, é estimulada pela carência de N (HORST et al., 2012).

Analisando o impacto do crescimento em condições de limitação de N sobre a suscetibilidade do gênero *Arabidopsis* a *Erwinia amylovora* e ao fungo *Bortrytis cinerea*, Fagard et al. (2014) constataram que a limitação de N reduz a resistência de *Arabidopsis* a *Erwinia amylovora*, corroborando com resultados obtidos por Moreau et al.(2012), onde observaram que a resistência de *Arabidopsis* a *Erwinia amylovora* é um processo ativo e sugere-se que este processo de defesa é fortemente afetado pela disponibilidade de N. Por outro lado, a limitação de N reduz a susceptibilidade de *Arabidopsis* a *Bortrytis cinerea*.

7. CONCLUSÕES

Os resultados suportam a hipótese de que a competição entre Xap e bactérias do filoplano por compostos de ferro e nitrogênio em filoplano é o mecanismo responsável pela capacidade das bactérias antagonistas em controlar a mancha-bacteriana do maracujazeiro.

Mesmo nas situações onde não foi observada a diminuição da população bacteriana de Xap devido a restrição do acesso ao íon Fe e a fonte de N e C, houve a redução da severidade da doença.

A carência de íons Fe pode limitar as condições ideais para a colonização do filoplano por Xap.

A restrição de íons Fe para o patógeno através dos sideróforos pode reduzir a população de Xap no filoplano.

A competição por fonte de nitrogênio não interferiu na população residente de Xap no filoplano.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, I.M.G.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L. O.S. Ocorrência de estirpe não pigmentada em *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 20, p. 47, 1994. Resumos.

ALTIERI, M.; NICHOLLS, C. I. **Agroecología: teoría y practica para una agricultura sustentable**. Mexico: Pnuma/Orpalc, 2000. p.250 (Série Textos Básicos para la Formación Ambiental).

ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, V, 38, p.145–180, 2000.

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

ANDREWS, P. C.; ROBINSON, A. K.; RODRIGUEZ-QUINONES, F. Bacterial iron homeostasis. **Fem Microbiol Reviews** 27:215-37, 2003.

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

ÁVILA, Z.R., CARVALHO, S.S., BRAÚNA, L.M., GOMES, D.M.P.A., SILVA, M.C.F.; MELLO, S.C.M. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2005.. 30p. (Boletim Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa 177).

BACKMAN, P. A.; WILSON, M.; MURPHY, J. F. **Bacteria for biological control of plant diseases**. In- Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control, Eds. N. A. Rehcigl and J. E. Rehcigl. Boca Rota : CRC Press. pp. 95-109, 1997.

BALLINI E.; NGUYEN, T. T. T.; MOREL J. B. Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. **Rice** v.6, n.32, p. 1-13, 2013.

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

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potencial as antagonists and biocontrol agentes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n^o4, p. 1044-1051, 2012.

BETTIOL, W.; GHINI, Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. P.717-728.

BORO, M.C.; BERIAM, L. O. S.; GUZZO, S. D. Induced resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* in passion fruit plants. **Tropical Plant Pathology**. v.36, p.74-80, 2011

BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V. Uso potencial de outras espécies de Passiflora. In: **Informe agropecuário**, Belo Horizonte. v. 21. n. 206. 2000. p.72-75.

BRAUN, V.; HANTKE, K. Recent insights into iron import by bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.15, p. 328-334, 2011.

BUYSENS, S.; HOFTE M.; POPPE J. Biological control of *pythium sp* IN soil and nutrient film technique systems by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. **Acta Horticulturae**, v. 382, nº27, p. 238-245, 1995.

CASTRO, V. L.; JONSSON, C. M. Avaliação de risco ecotoxicológico de biopesticida – mamíferos e organismos aquáticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de. **Controle biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA - CNPMA, p. 399, 1999.

CARROLL S. B., SALT S. D., **Ecology for Gardeners**. Timber Press, Portland, OR. 2004.

CHATTERJEE, S.; SONTI, R. V. rpfF mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are deficient for virulence and growth under low iron conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.15, n. 5, p.463-471, 2002.

CHAVES, G. A. T. **Captação de ferro e efeito desse metal para crescimento e morfologia de *Xylella fastidiosa***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CHU, B. C., GARCIA-HERRERO, A., JOHANSON, T.H., KREWULAK, K. D., LAU, C. K., PEACOCK, R. S., SLAVINSKAYA, Z.; VOGEL, H.J.. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. **Biometals**, v. 23, p. 601-611, 2010.

CLARO, R. M.; MONTEIRO, C. A. Renda familiar, preço de alimentos e aquisição domiciliar de frutas e hortaliças no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 6, p.1014-1020, 2010.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. **American Phytopathological Society**, p. 539, St. Paul, MN. 1983.

CÓRDOVA, K.R.V.; GAMA, T.M.M.T.B.; WINTER, C.M.G.; KASKANTZIS NETO, G.; FREITAS, R. J. S. **Características físico-químicas da casca do maracujá Amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Degener) obtida por secagem**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2005.

CROWLEY, D. E.; BANISH, S., DUPTA, R. K. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. **Plant Physiology**, v. 87, nº 3, p. 680-685, 1988.

CROWLEY D. E. Microbial siderophores in the plant rhizospheric. In: Barton L.L., Abadía J., (Eds) . **Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms**. Springer; Dordrecht: 2006. p. 169–198.

- CURY, A. **O vendedor de sonhos**. 1. ed. Academia de Inteligência, 2008. 296 p.
- DALSING, B. L.; TRUCHON, A. N.; GONZALEZ-ORTA; E. T., MILLING, A. S.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum*: Uses Inorganic Nitrogen Metabolism for Virulence, ATP Production, and Detoxification in the Oxygen-Limited Host Xylem Environment. **mBio**. v.6, n.2, p.1-13, 2015.
- DIANESE, A .C.; JI, P.; WILSON, M. Nutritional similarity between leaf-associated nonpathogenic bacteria and the pathogen is not predictive of efficacy in biological control of bacterial spot of tomato. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, p.3484-3491, 2003.
- DIAS, S. C. **Morte precoce do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) causada por patógenos que afetam a parte aérea da planta**. 1990.137p. (dissertação de Mestrado em Fitopatologia). Brasília: UnB. 1990.
- DIETRICH, R.; PLOB, K.; HEIL, M. .Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. **Plant, Cell and Environment**. v. 27, n. 7, p. 896–906, 2004.
- DORDAS C. 2008. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture.A review.**Agronomy for Sustainable Development**. v. 28, n. 1, p.33–46, 2008.
- EXPERT, D.; O'BRIAN M.R. (Eds.) **Molecular Aspects of Iron Metabolism in Pathogenic and Symbiotic Plant-Microbe Associations**, Dordrecht: Springer, 2012. p. 86.
- FAGARD, M.; LAUNAY, A.; CLEMENT, G.; COURTIAL, J.; DELLAGI, A.; FARJAD, M.; KRAPP, A.; SOULIE, M.C.; DAUBRESSE, C.M. Nitrogen metabolism meets phytopathology. **Journal of Experimental botany**, v. 65, nº 19, p. 5643-5656, 2014.
- FRANCO, M. M; TAKATSU, A. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodispv. passiflorae* a cobre. **Bioscience Journal**.v.20, p.207-210, 2004.
- FUHRMAN, E.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BLUM, L. E. B.; BRAGA, M. W.; JUNQUEIRA, K. P. Reação de híbridos interespecíficos de *Passiflora* spp. à *Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae*. **Ciência Rural**, v.44, n.8, 2014.
- GONÇALVES, E. R; ROSATO, Y. B. Genotypic characterization of xanthomonad strain isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **International Journal os Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 50, p.811-821, 2000.
- HALFELD-VIEIRA, B. A. **Bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura**. Viçosa, 2002. 98f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.

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

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

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

HALFELD-VIEIRA, B. A. ; SILVA, W. L. M. ; SCHURT, D. A. ; ISHIDA, A. K. N. ; SOUZA, G. R. ; NECHET, K. L. **Understanding the mechanism of biological control of passionfruit bacterial blight promoted by autochthonous phylloplane bacteria**. *Biological Control*, v. 80, p. 40-49, 2015.

HASSNI, M. E, Biological control of bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. **Environmental and Experimental Botany** v.59, p. 224–234, 2007.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**.v.21, p.243-269, 1983.

HOHNADDEL, D.; MEYER, J. M. Specificity of pyoverdine-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 10, p. 4865-4873, 1988.

HORST, R.J.; ZEH, C.; SAUR, A.; SONNEWALD, S.; SONNEWALD, U. The *Ustilago maydis* Nit2 homolog regulates nitrogen utilization and is required for efficient induction of filamentous growth. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 3, p. 368–380, 2012.

HUBER, D. M.; WATSON, R. D. Nitrogen Form and Plant Disease. **Annual Review of Phytopathology**. v. 12, p. 139-165, 1974.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção agrícola: Culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro, v. 41, p.1-100, 2014.

JACQUES, M.A.; JOSI, K.; DARRASSE, A.; SAMSON, R. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseolivar. fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. **Applied and Environmental Microbiology**.v.71, p.208-215, 2005.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L.C. L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**, Planaltina: Embrapa Cerrados, p.80-108, 2005.

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

KARAMANOLI, K.; LINDOW, S.E. Disruption of N-acylhomoserine lactonemediated cell signaling and iron acquisition in epiphytic bacteria by leaf surface compounds. **Applied and Environmental Microbiology**.v.72, p.7678-7686, 2006.

KARAMANOLI, K.; BOULIGARAKI, P.; CONSTANTINIDOU, H.-I.A.; LINDOW S.E.. Polyphenolic compounds on leaves limit iron availability and affect growth of epiphytic bacteria. **Annals of Applied Biology**.v.159, p.99-108, 2011.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.;AMARGO, L. E. A.(Ed.). Manual de Fitopatologia. Doenças de plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 2005.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**.v.44, p.301-307, 1954.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R. ; ZABLOTOWICZ, R. M. Freelifving bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v.7, p.39-44, 1989.

KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v.28, n.14, p.885-886, 1980a.

KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N.. *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. **Curr Microbiol**. v.4, nº 5, p. 317–320, 1980b.

KOBAYASHI T.; NISHIZAWA N. K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**.v.63, p.131-52, 2012.

KOSOSKI, R. M.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V.; UESUGI, C. H.; MELO, B. de. Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, em casa de vegetação. **Bioscience Journal**. v. 24, n. 1, p. 60-66, 2008.

KREWULAK, H. D., VOGUEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1778, nº 9, p.1778-1781. 2008

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

LARANJEIRA, F. F. Problemas e perspectivas da avaliação de doenças como suporte ao melhoramento do maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.161-184, 2005.

LARRÉ, C. F., ZEPKA, A. P. S., MORAES, D. M. Testes de germinação e emergência em sementes de maracujá submetidas a envelhecimento celerado. **Revista Brasileira de Bloclências**, Porto Alegre, v. 5, p. 708-710, 2007.

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

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

LECOMPTE F., ABRO M., NICOT P. Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. **Plant Pathology**. v.59, n. 5, p. 891–899, 2010.

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

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

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

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and environmental microbiology**, v.69, n.4, p. 1875–1883, Apr. 2003.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 1-49, 1996.

MADDEN, L. V.; HUGHES, G.; BOSCH, F. van den. **The Study of Plant Disease Epidemics**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2007. 432 p.

MANICA, I. Maracujá: Taxonomia – anatomia – morfologia. In: SÃO JOSÉ, A.L.; BRUCKNER, C.H.; MANICA, I.; HOFFMANN, M. (Ed). **Maracujá: Temas Seleccionados - Melhoramento, morte prematura, polinização, taxionomia**. Porto Alegre : Cinco continentes, 1997. p.7-24.

MARIANO, R.L.R.; MCCARTER, S.M. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. tomato on tomato and weeds. **Fitopatologia Brasileira**. 16, p.86-91, 1991a.

MARIANO, R.L.R.; MCCARTER, S.M. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato and weeds. **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, p.92-97, 1991b.

MARIANO, R.L.R.; MCCARTER, S.M. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. **Microbial Ecology**, v.26, p.47-58. 1993.

MARIANO, R. L. M.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. In: MELLO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2000. v.2, p.305.

MATTA, F. P. mapeamento de QRL para *xanthomonas axonopodis*pv. *passiflorae*em maracujá-azedo (*Passiflorae edulis* Sims f.*flavicarpa* Deg.). 230 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia Agronomia)–Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” – ESALQ, Piracicaba, SP. 2005.

MEDINA , J.C.; GARCIA, J.L. M.; LARA, L. C.C.; TOCHINI, R.P; HASHIZUME, T; MORETTI, V. A.; CANTO, W. L. **Maracujá** : da cultura ao processamento e comercialização. Campinas: Secretaria de Agricultura e abastecimento ITAL, 1980. 207p.

MELETTI, L. M.; MAIA, M .L. **Maracujá**: produção e comercialização. Campinas: IAC, 1999, 64p. (Boletim Técnico, 181).

MELETTI, L. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.33, p.83-91, 2011.

MELLO, S.C.M., ÁVILA, Z.R., BRAÚNA, L.M., PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de Trichoderma para el control biológico de Sclerotium rolfsii Sacc. **Fitosanidadv**. 11, n.1, P. 3-9, 2007.

MENDES, A. C. N.; COSTA, A. P.; NOGUEIRA, I.; PEIXOTO, J. R.; VILELA, M. **S.Avaliação de resistência de maracujazeiro - azedo à bacteriose(Xanthomonas axonopodis pv . Passiflorae), sob casa de vegetação**. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 8, 2015, Goiânia. Anais, UFG.

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

MEZZALIRA, E. J.; PIVA, A. L.; MENDES, A.S.; PAULUS, D.; WAGNER JUNIOR, A.; NAVA, G. A.I. **Emergência de piântulas de maracujazeiro (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.) em resposta ao ambiente e ao tempo de armazenamento de sementes**. In: SEMINÁRIO SISTEMAS DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA E AGRONOMIA, 3, 2009, Curitiba, PR. **Anais...**Curitiba: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2009. 1 CD-ROM.

MEYER, J. M. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. **Archives in Microbiology**. v.174, p.135-142, 2000.

MIRANDA, J. F. **Reação de variedades de maracujazeiro-amarelo (Passiflora edulis Sims f. flavicarpaDeg.) a bacteriose causada por Xanthomonas campestrispv. passiflorae**. 2004. 48f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração: Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MOORE, E.R.B.; KRÜGER, A.S.; HAUBEN, L.; SEAL, S.E.; DE BAERE, R.; WACHTER, R.; TIMMIS, K.N.; SWINGS, J. 16S rRNA gene sequence analyses and inter-and intrageneric relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. **Fems. Microbiology Letters** v. 151:145-153, 1997.

MOREAU, M.; DEGRAVE, A.; VEDEL, R.; BITTON, F.; PATRIT, O.; RENOU, J-P.; BARNY, M-A.; FAGARD, M. (EDS) contributes to nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* against *Erwinia amylovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 3, p. 421–430, 2012.

MUNHOZ, C.F.; WEISS, B.; HANAI, L. R.; ZUCCHI, M. I.; FUNGARO, M. H. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; AND VIERA, M. L. C. Genetic diversity and a PCR-based method for *Xanthomonas axonopodis* detection in passion fruit. **Phytopathology**, v.101, n.4, p. 416-424, 2011.

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

NEILANDS, J. B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n°45, p. 26723–26726, 1995.

NOGUEIRA FILHO, G. C. et al. Aspectos histológicos da união da enxertia hipocotiledonar do maracujazeiro-amarelo. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 515-521, 2010

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

PARANGAN-SMITH, A.; LINDOW, S. E. Contribution of Nitrate Assimilation to the Fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a on Plants. **Applied and Environmental Microbiology**.v.79, 678-687, 2013.

PRESS, C.M.; WILSON, M.; TUZUN, S.; KLOEPPER, J. W. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.10, n.6, p.761-768, 1997.

RIGANO, L.A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SENDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P.S.; QÜESTA, J.; DOW, J.M.; CASTAGNARO, A.P.; VOJNOV, A.A.; MARANO, M.R. Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.20, 1222-1230, 2007.

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

SANTOS, C. C. F.; SANTOS FILHO, H. P. Doenças causadas por bactérias. In: Santos Filho, H.P.; Junqueira, N.T.V. (Ed.). **Maracujá: fitossanidade**. Brasília: Embrapa informação Tecnológica. n.32, p.22-24. 2003.



SANTOS FILHO, H. P.; LARANJEIRA, F. F.; SANTOS, C. C. F. dos; BARBOSA, C. J. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. da (Ed.). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura. p. 240-280, 2004.

SCHULTZ, A. **Botânica sistemática**. 3 ed. Porto Alegre: s.ed. 1968. 215p.

SHARON, E., BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Presymptomatic multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on the surface of pepper leaves. **Canadian Journal of Botany**.v.60, 1041-1045, 1982.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **Journal Bioscience and Bioengineering**, n. 89, p. 515-521, 2000.

SIDRA. Disponível <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 11/05/2014

SILVA, V. A.V.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L.R. Sobrevivência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em Meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, nº 4, p. 381-386, 2006.

SOGLIO, F. K. D. **Manejo de doenças na perspectiva da transição agroecológica**. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds.). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, p. 293, 2004.

SNOEIJERS, S. S.; GARCIA, A. P.; JOOSTEN, M. H. A. L.; De WIT, P. G. M. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**. v. 106, n. 6, p. 493–506, 2000.

SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ. P. 179, 1997.

STALL, R.E., GOTTWALD, T.R., KOIZUM, M.; SCHAAD, N.C. **Ecology of plantpathogenic Xanthomonads**. in: *Xanthomonas*. SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E.L. eds. Chapman and Hall, London. pp. 265-299. 1993.

STARR, M. P. The genus *Xanthomonas*. In: *The prokaryotes*, vol. 1 (eds) STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A. SCHLEGEL, H.G.), Spring Verlag, BERLIN. p. 742-763, 1983.

STROMBERG, K. D.; KINKEL, L. L.; LEONARD, K. J. Relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. **Phytopathology**.v.89, 131-135, 1999.

TAO, F.; HE, Y.W.; WU, D.H.; SWARUP, S.; ZHANG, L.H. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic Di-GMP effectors. **Journal of Bacteriology**.v.192, n.4 p.1020-1029, 2010.

TEIXEIRA., C. G. Cultura. In: Teixeira, C.G. et al. **Maracujá**: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos. Série Frutas Tropicais, 9, 2.ed. 1994. p.3-142.

TORRES, F. J.; PONTE, J. Estudo sobre o controle da bacteriose ou “morte precoce” (*Xanthomonas campestris* spv. *passiflorae*) do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, v.19, n.1, p.34-38, 1994.

TORTORA M. L.; DÍAZ-RICCI J. C.; PEDRAZA R.O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Arch Microbiol**.v.193, n.4 ,p. 275-286, 2011.

VAN DIRK, K.; NELSON, E. B. Fatty-acids competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.66, p.5340-5347, 2000.

VANDENDERGH, P. A., GONZALES, C. F. Methods for protecting the growth of plants employing mutant siderophore producing strains of *Pseudomonas putida*. **Us Patent** nº. US4 479936, 1984.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. London: Cambridge Press, 1996, 224p.

VARMA, A.; CHINCHOLKAR, S. (Eds.) **Microbial Siderophores**. Berlin: Springer-Verlag. p.248, 2007.

VIANA, F. M. P. et al. **Principais doenças do maracujazeiro na Região Nordeste e seu controle**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico, 86) .p.12 , 2003.

VIANA, C. A. dos S. Genótipos de maracujazeiro-azedo com resistência à bacteriose. **Bioscience Journal**. v. 30, n. 2, p. 591-598, 2014.

VILLANOVA, A. C. C. et al. Índice de transmissão via sementes da virose do endurecimento do fruto do maracujazeiro e da bacteriose do maracujazeiro. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 55. Maringá-PR. 2007

WALTERS, D., HEIL, M. Custos e trade-offs associados com a resistência induzida . **Physiological and Plant Molecular Pathology** v. 71, p. 3-17, 2007.

WALTERS, D. R.; BINGHAM, I. J. Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 151, n.3, p.307-324, 2007.

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

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 379-407.1998

WILSON, M.; LINDOW, S.E. Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. **Applied and Environmental Microbiology**.v.60, 4468-4477, 1994a.

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

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

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

YUAN, M.; CHU, Z.; LI, X.; XU, C.; WANG, S. The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. **The Plant Cell**.v.22 n.9, p.3164-3176, 2010.

