

MIRIAM FUMIKO FUJINAWA

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* E AVALIAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NO CONTROLE DA MANCHA FOLIAR BACTERIANA EM BEGÔNIA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

MIRIAM FUMIKO FUJINAWA

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* E AVALIAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NO CONTROLE DA MANCHA FOLIAR BACTERIANA EM BEGÔNIA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2009.

Prof. Luiz Antonio Maffia
(Co-orientador)

Prof. Olinto Liparini Pereira

Prof^a. Rosângela D'Arc de Lima Oliveira

Doutora Ivanete Tonole da Silva

Prof. José Rogério de Oliveira
(Orientador)

A Deus, à família e aos amigos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, em toda sua excelência, pela oportunidade de realização deste curso que muito contribuiu para minha formação profissional.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro durante toda a execução deste trabalho.

Ao professor José Rogério de Oliveira, pelo apoio, atenção, confiança, incentivo, paciência e a orientação durante a execução deste trabalho.

Ao professor Luiz Antonio Maffia, pela idéias, pelos esclarecimentos científicos, pelas sugestões e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Ricardo Magela de Souza pela solicitude e dicas durante a execução deste trabalho.

Ao professor Olinto Liparini Pereira, professora Rosângela D'Arc de Lima Oliveira e a doutora Ivanete Tonole da Silva pela amizade, atenção, críticas e sugestões que aperfeiçoaram o manuscrito.

Ao professor Onkar Dev Dhingra, pelos ensinamentos e conselhos durante todos esses anos.

Aos professores, Luiz Antonio Dias e Jose Ivo Ribeiro Junior pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Instituto Biológico de Campinas e aos produtores de begônia pela atenção e pela obtenção de isolados bacterianos para a realização da pesquisa.

Aos meus pais, Mitsugu Fujinawa e Lucia Watanabe Fujinawa pela disposição de me ajudar, pelas sugestões apresentadas, pelo carinho, educação, apoio e confiança tidos a mim durante toda a minha existência.

Ao Nadson de Carvalho Pontes pelo amor, atenção, carinho, paciência, compreensão, companheirismo e amizade em todos os momentos.

À equipe do Laboratório de Bacteriologia e Patologia de Sementes, em especial à Hyanameyka, Sueli, Melina e Fabiana por toda a ajuda dedicada a mim durante o curso de mestrado.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos passados ao longo deste curso.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pelo auxílio e pela disponibilidade de me ajudar em diversos momentos da execução deste trabalho

Aos companheiros de turma, em especial, Daniel Anacleto da Costa Lage, Larissa Gomes da Silva, Rafaela Carolina Constantino Roma e Carine Rezende Cardoso pela ajuda, pelo estímulo, pela amizade e pela excelente convivência durante esses anos.

As amigas de República, pela agradável convivência, amizade e compreensão.

A todos os amigos, em especial Luana Piermann, Juliane Escoura, Amanda Figueredo, Patrícia Guerra, Gisele Batista, Andréia Perez de Tassis e Luciano Cota pela torcida e incentivo em todos os momentos.

Aos colegas da Fitopatologia e demais amigos de Viçosa, pelo auxílio e amizade.

Aos meus irmãos Massa, Jun, Mitsugu e Minoru, pelo carinho, incentivo e amizade.

À minha tia Emília pela atenção e carinho por todos os momentos.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista.

À Deus, pela força, coragem e pelas oportunidades que tem me proporcionado durante todo o decorrer da minha vida.

BIOGRAFIA

Miriam Fumiko Fujinawa, filha de Mitsugu Fujinawa e Lucia Watanabe Fuijnawa, nasceu em 10 de setembro de 1982, na cidade de Suzano, São Paulo.

Ingressou em 2002, no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em Engenharia Agrônômica em julho de 2007. Em agosto de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na mesma Universidade, submetendo-se a defesa de dissertação em julho de 2009.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
CAPÍTULO 1.....	8
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1. Obtenção, padronização e preservação dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	10
2.2. Preparo de inóculo.....	11
2.3. Testes bioquímicos.....	11
2.4. Testes de patogenicidade.....	12
2.5. Local de realização da pesquisa e análises estatísticas.....	13
3. RESULTADOS.....	14
3.1. Testes bioquímicos.....	14
3.2. Testes de patogenicidade.....	14
3.3. Variabilidade dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	15
4. DISCUSSÃO.....	19
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO 2.....	28
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1. Obtenção, padronização e preservação dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	31

2.2. Preparo de inóculo.....	31
2.3. Plantas de begônia.....	32
2.4. Defensivos agrícolas.....	32
2.5. Sensibilidade <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> aos defensivos agrícolas avaliados.....	33
2.6. Avaliação da eficiência dos defensivos agrícolas para o controle da mancha foliar bacteriana em begônia.....	33
2.7. Local de realização da pesquisa e análises estatísticas.....	34
3. RESULTADOS.....	35
3.1. Sensibilidade <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> aos defensivos agrícolas avaliados.....	35
3.2. Avaliação da eficiência dos defensivos agrícolas para o controle da mancha foliar bacteriana.....	35
4. DISCUSSÃO.....	41
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
CONCLUSÕES GERAIS.....	49
APÊNDICE.....	50

RESUMO

FUJINAWA, Miriam Fumiko, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* e avaliação de defensivos agrícolas no controle da mancha foliar bacteriana em begônia.** Orientador: José Rogério de Oliveira. Co-orientadores: Luiz Antonio Maffia e Ricardo Magela de Souza.

Xanthomonas axonopodis pv. *begoniae* (*Xab*) é o agente causal da mancha foliar bacteriana em begônias. A variabilidade de isolados brasileiros de *Xab* não é conhecida. Também, não se conhece a eficiência de defensivos agrícolas para o controle da mancha foliar bacteriana em begônias. No presente trabalho buscou-se caracterizar bioquímica e biologicamente os vinte isolados de *Xab* coletados nas principais regiões produtoras de begônia do estado de São Paulo, visando verificar a variabilidade destes com relação à origem geográfica, além de avaliar a eficiência de defensivos agrícolas no controle da mancha foliar bacteriana. Os resultados dos testes bioquímicos e biológicos permitiram agrupar os isolados em cinco grupos, os quais não apresentaram relação com a origem geográfica. Em relação à eficiência dos defensivos agrícolas, todos os produtos apresentaram efeito no controle da doença, com diferentes níveis de eficiência. Os produtos mais efetivos no controle foram a oxitetraciclina+estreptomicina e a oxitetraciclina+sulfato de cobre. Os produtos oxiclreto de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso proporcionaram controle intermediário e a casugamicina foi o menos efetivo no controle da doença. Os produtos a base de cloreto de benzalcônio e sulfato de cobre foram fitotóxicos para begônia. A menor severidade da doença foi sempre proporcional ao aumento da concentração dos produtos.

ABSTRACT

FUJINAWA, Miriam Fumiko, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2009. **Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and evaluation of pesticides in the control of bacterial leaf spot and blight of begonia.** Advisor: José Rogério de Oliveira. Co-advisers: Luiz Antonio Maffia and Ricardo Magela de Souza.

Xanthomonas campestris pv. *begoniae* (*Xab*) is the causal agent of bacterial leaf spot and blight of begonias. The variability of Brazilian strains of *Xab* is not known. Neither is known about the effectiveness of pesticides to control bacterial leaf spot and blight of begonias. This study aimed to characterize biochemical and biologically twenty *Xab* isolates collected in begonia producing regions in the state of São Paulo to verify their variability in relation to geographical origin and to evaluate the efficiency of pesticides on disease control. The results of biochemical and biological analysis clustered isolates into five groups, which had no relation to their geographical origin. Regarding the efficiency of pesticides, all products tested had an effect in controlling the disease with different levels of efficiency. Oxitetracycline+streptomycin and oxitetracycline+cupric sulfate showed the best disease control. Copper oxychloride, cupric hydroxide, and cuprous oxide had intermediary control, and kasugamycin was less effective to control the disease. The products based on benzalkonium chloride and copper sulfate were phytotoxic to begonias. The lower disease severity was always proportional to the increase of products concentrations.

INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de plantas ornamentais no Brasil é uma importante atividade socioeconômica, que iniciou a partir da década de 70, com os imigrantes portugueses, italianos, alemães e principalmente holandeses e japoneses. Esta atividade passou a apresentar os primeiros sinais de organização e crescimento nos estados de São Paulo e Minas Gerais (Silveira, 2009).

O incremento da produção de flores e plantas ornamentais é uma realidade em diversos países, inclusive no Brasil. O desenvolvimento da floricultura no Brasil está ligado à grande diversidade de climas e solos, viabilidade de cultivo de diversas plantas ornamentais, investimento em tecnologia, grande potencial exportador e a capacidade de gerar empregos diretos e indiretos (Anefalos & Guinhoto, 2003).

A produção de plantas ornamentais apresenta um fluxo no comércio internacional da ordem de US\$ 6,7 bilhões por ano e possui uma área cultivada mundial de aproximadamente 190 mil hectares (Motos, 2004). Em 2007, o Brasil exportou US\$ 35,28 milhões, resultado 9,18% maior que no ano anterior, o que caracteriza uma fase de expansão do mercado de flores (Junqueira & Pettz, 2008).

O consumo interno médio brasileiro per capita de flores é de aproximadamente US\$ 4,00 (MAPA, 2009; IBGE, 2009). Esta média é baixa quando comparada com a da Argentina (consumo médio de US\$ 25) e países europeus, como Suíça, Alemanha, Suécia e Dinamarca, os quais consomem acima de US\$ 100 dólares (SEBRAE, 1999; Matsunaga, 1997).

As begônias pertencem à família Begoniaceae, agrupadas no gênero *Begonia*. Elas são representadas por espécies nativas das regiões tropicais África, Américas e Ásia (Larson, 1980; Karlsson & Heins, 1992). Trata-se de um gênero com aproximadamente 1400 espécies (De Lange & Bouman, 1999). Nas Américas ocorrem cerca de 530 espécies, na África (incluindo Madagascar) e Ásia cerca de 150 e 520 espécies respectivamente (Doorenbos *et al.*, 1998). No Brasil, ocorrem cerca de 200 espécies encontradas na maioria das formações vegetais.

As begônias consistem de plantas com diversos tamanhos, diferentes habitats, folhagens e flores, apresentam ampla variabilidade morfológica, podendo ser caracterizadas pela assimetria da lâmina foliar, pelas flores estaminadas com quatro tépalas, ovário ínfero com placentação axilar e cápsulas trialadas (Brilmayer, 1963; Jaques & Mamede, 2005). Elas podem ser classificadas pelo seu sistema radicular em

fibrosas, tuberosas e rizomatosas (Mejias & Ruano, 1990). Segundo Brilmayer (1963), as primeiras espécies foram descobertas em Santo Domingo em 1690 por Charles Plumier, o qual as nomeou em homenagem a Michel Begon. Na região dos Andes, foi descoberta a primeira begônia tuberosa, a qual é a considerada ancestral de todas as begônias híbridas tuberosas atualmente comercializadas. Da África, surgiram as begônias semi-tuberosas “Maple”, do Brasil as *B. semperflorens*, e do México as espécies rizomatosas. Atualmente, novas espécies estão sendo descobertas (De Wilde & Van Valkenburg, 2005; Hughes, 2005; Schui, 2002; Qian, 2001; Guan & Tian, 2000)

As begônias estão entre as principais flores produzidas em estufas por apresentar grande diversidade de folhagens e de cores das inflorescências, precisão da resposta ao fotoperíodo e longevidade das inflorescências, além da possibilidade de cultivo em vasos. Entre as plantas ornamentais, estão entre as cinco flores mais vendidas na Europa (Reynolds *et al.* 1998).

Na cultura da begônia ocorrem diversas doenças, as quais necessitam de um manejo eficiente para reduzir danos econômicos (Daughtrey *et al.*, 1995). Dentre estas, a mancha foliar bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* (Takimoto 1934) Vauterin *et al.*, (1995) (*Xab*), é uma das mais destrutivas. Essa bacteriose encontra-se disseminada nos Estados Unidos, Canadá, São Vicente, Brasil, Índia, Irã, Japão, Austrália, Nova Zelândia, Turquia e parte da Europa (Taylor *et al.*, 1981; Bradbury, 1986, Ornek *et al.*, 2007).

Xanthomonas axonopodis pv. *begoniae* é uma bactéria Gram negativa, com formato baciliforme e tamanho médio entre 0-5x1-2 µm. As células ocorrem individualmente, podendo ocasionalmente ocorrerem em pares ou em pequenas cadeias e se movem através de um único flagelo polar. São aeróbias estritas, oxidase negativa, catalase positiva, formam colônias amarelas e mucóides em meio YDC, não utilizam asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, hidrolisam esculina e amido, produzem ácidos a partir de arabinose, crescem a 35°C e não possuem atividade de nucleação de gelo (Taylor *et al.*, 1981; Schaad *et al.*, 2001). Porém pouco se sabe sobre as características bioquímicas e biológicas de isolados brasileiros de *Xab*.

Os sintomas da doença causada por *Xab* são manchas foliares inicialmente pequenas, circulares e encharcadas e quando examinadas através da luz são conspícuas e transparentes. Gradualmente as manchas se tornam maiores e então coalescem, formando lesões necróticas as quais, quando numerosas podem causar abscisão prematura das folhas (Wehlburg, 1967; Digat & Vidalie, 1975; Daughtrey *et al.*, 1995).

Segundo Ark & Tompkins (1939), a infecção sistêmica só foi observada em begônia tuberosa em casas de vegetação, quando as plantas foram inoculadas com uma suspensão altamente concentrada da bactéria nos tubérculos sob câmara úmida. Nesse tipo de infecção, as plantas entraram em colapso, com a bactéria presente nos elementos de vasos.

As medidas preventivas são adotadas no controle da mancha foliar bacteriana da begônia, tais como o uso de mudas saudáveis, medidas de sanitização e controle cultural. Dentre essas medidas destaca-se: o aumento do espaçamento entre as plantas para promover uma maior aeração e drenagem, evitando o acúmulo de água nas folhas, eliminação de plantas doentes, desinfestação das bancadas, ferramentas e das mãos após a manipulação de plantas doentes, não manipulação de plantas com folhas úmidas e manejo da irrigação (Janse, 2005; Daughtrey & Benson, 2005; Almeida & Beriam, 2007).

O controle químico pode ser importante para a proteção das plantas contra esta doença. Os bactericidas utilizados no controle de bacterioses são geralmente fungicidas a base de cobre e antibióticos. Porém, não existem produtos registrados para o controle da mancha foliar bacteriana em begônias e pouco se conhece sobre a eficiência dos bactericidas disponíveis no mercado para seu controle.

Com o objetivo de se conhecer melhor a bactéria causadora da mancha foliar bacteriana em begônias estudou-se a variabilidade de isolados brasileiros de *Xab*, avaliando-se suas características biológicas e bioquímicas, verificando-se a existência de relações entre a variabilidade e a origem geográfica dos isolados. Além disso, avaliou-se a eficiência de defensivos agrícolas utilizados no controle de fitobacterioses, quanto na redução da severidade da mancha foliar bacteriana em begônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, I.M.G.; BERIAM, L.O.S. Doenças bacterianas e controle. In: ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L. **Aspectos Fitopatológicos de Plantas Ornamentais**, São Paulo: Instituto Biológico, Boletim técnico nº20, 1 ed, 2007. 73p.
- ANEFALOS, L.C.; GUINHOTO, J.J.M. Estrutura do mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais. **Revista de Agricultura**, 50(2):41-63, 2003.
- ARK, P.A.; TOMPKINS, C.M. Bacteriosis of tuberous begonia. **Phytopathology**, 29:663-667, 1939.
- BRADBURY, J.F. **Guide to Plant Pathogenic Bacteria**. Surrey: C.A.B., 1986. 332p.
- BRILMAYER, B. An introduction to the begonia family. In: GRAF, A.B. **Exotica 3: pictorial cyclopedia of exotic plants**. Rutherford, N.J.: Roehrs, 1963. 1823p.
- DAUGHTREY, M.L.; BENSON, D.M. Principles of plant health management for ornamental plants. **Annual Review of Phytopatology**, 43:141-169, 2005.
- DAUGHTREY, M.L.; WICK, R.L.; PETERSON, J.L. **Compendium of flowering potted plant diseases**. Saint Paul: APS Press, 1 ed, 1995. 90p.
- DE LANGE, A.; BOUMAN, F. Seed micromorphology of neotropical Begonias. **Smithsonian Contributions to Botany**, 90:1-49, 1999.
- DE WILDE, J.J.F.E.; VAN VALKENBURG, J.L.C.H. Novitates Gabonenses 57. *Begonia sosefiana* (Begoniaceae). A new species in section loasibegonia from Gabon. **BLUMEA**, 50: 467-471, 2005.
- DIGAT, B.; VIDALIE, H. Cultivation of *Begonia elatior rieger* and phytosanitary problems. **Pepinieristes, Horticulteurs, Maraichers**, 162:13-22, 1975.

DOORENBOS, J.; SOSEF, M.S.M.; DE WILDE, J.J.F.E. The sections of *Begonia*. **Wageningen Agricultural University Papers**, 98:1-266, 1998.

GUAN, K.Y.; D.K. TIAN. The three new *Begonia* from Yunnan. **Acta Botanica Yunnan**, 22 (2): 129-134, 2000.

HUGHES, M. Four new species of begonia (Begoniaceae) from Sulawesi. **Edinburgh Journal of Botany**, 63:191-199, 2005.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Caracterização do Setor Produtivo de Flores e Plantas Ornamentais no Brasil**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=244&id_pagina=1>. Acessado em: 5 de julho de 2009.

JANSE, J.D. **Phylobacteriology: Principles and Practice**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2005. 360 p.

JAQUES, E.L.; MAMEDE, M.C.H. Notas nomenclaturais em *Begonia* L.(Begoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, 28(3):579-588, 2005.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Saldo positivo. Coluna Ibraflor. **Revista Cultivar HF**, 48:38, 2008.

KARLSSON, M.G.; HEINS, R.D. Begonias In LARSON, R.A. (Ed.). **Introduction to floriculture**, New York: Academic Press, 2 ed, 1992. 409-428p.

LARSON, R.A. Begonias. In: LARSON, R.A. (Ed.). **Introduction to floriculture**. New York: Academic Press, 1ed, 1980. 395-340p.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa de desenvolvimento de flores e plantas ornamentais - PROFLORES**. Brasília. Acesso em: 15 de julho de 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.

MATSUNAGA, M.A indústria da flor no mundo e o comercio internacional do Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, 3(2):1-4, 1997.

MEJIAS, R.J.; RUANO, M.C. **El cultivo industrial de plantas em maceta**. Reus: Ediciones de Horticultura, 1990. 664p.

MOTOS, J.R.; PACHECO, M.M. Mercado internacional de flor y verdes de corte. **Revista horticultura**, 18:32-36, 2004.

ORNEK, H.A.; AYSAN, Y.A.; MIRIK, M.B.; SAHIN, F.C. First report of bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*, on Begonia in Turkey. **Plant Pathology**, 56(2):347, 2007.

QIAN, Y.Y. A new species of *Begonia* L. (Begoniaceae) from Yunnan, China. **Acta Phytotaxonomica Sinica**, 39(5): 461-463, 2001.

REYNOLDS, D.; DEVRIES, D.; CARNEY, L. Begonia. In: BALL, V. (Ed.). **Ball red book**. Batavia: Ball Publishing, 388-395, 1998.

SCHAAD, N.W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, Saint Paul, 3 ed, 2001. 373p.

SEBRAE. Serviço de Apoio às Pequenas e Médias Empresas. **Unidade produtora de flores de corte**. Série Perfil de Projetos, Vitória: SEBRAE,1999. 38p.

SHUI, Y.M. A new species of *Begonia* (Begoniaceae) from Mt. Huanglianshan of SE Yunnan, China. **Acta Botanica Yunnan**, 24(3): 307-308, 2002.

SILVEIRA, R.B.A. **Floricultura no Brasil**. Acesso em 13 de julho de 2009. Disponível em: <http://www.uesb.br/flower/florbrasil.html>

TAYLOR, E. H.; BRADBURY, J. F.; PREECE, T. F. *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae*. **Description of Fungi and Bacteria**, no.70, 1981.

WEHLBURG, C. Bacterial leaf spot of begonia. **Plant Pathology**, Florida Department of Agriculture, n°62, 1967.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE ISOLADOS DE

Xanthomonas axonopodis pv. *begoniae*

RESUMO

Pouco se sabe sobre as características bioquímicas e biológicas de isolados brasileiros de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* (*Xab*). Desta forma, buscou-se caracterizar bioquímica e biologicamente vinte isolados de *Xab* coletados nas principais regiões produtoras de begônias do estado de São Paulo, dois isolados provenientes dos Estados Unidos e um da Nova Zelândia, visando verificar uma possível relação desta variabilidade com a respectiva origem geográfica. Nos testes bioquímicos, verificou-se que todos os isolados de *Xab* foram Gram negativos, oxidase negativos, catalase positivos, aeróbios estritos, não promoveram a nucleação de gelo, cresceram a 35°C, hidrolisaram amido e esculina, produziram H₂S a partir de peptona, produziram levana, não digeriram a caseína do leite, não liquefizeram a gelatina e não utilizaram a asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio. Os isolados produziram ácidos a partir de arabinose, celobiose, frutose, galactose, glucose, manose e sacarose, mas não produziram a partir de adonitol, dulcitol, inulina, manitol, ramnose, salicina e sorbitol. A formação de ácidos a partir de inositol, lactose, maltose, melibiose, trealose, rafinose e xilose foi variável. Observaram-se pequenas variações nos testes de tolerância a concentrações de NaCl e de TTC. Nos testes de patogenicidade, observou-se a indução da reação de hipersensibilidade (HR) em plantas de tomate e fumo o que ocorreu em plantas de café. Uma resposta atípica foi observada em plantas de pimentão e de feijão. Os isolados foram patogênicos a *Begonia elatior*, *B. semperflorens*, *B. cucullata* e *B. rex*. Verificou-se através da análise de agrupamento a formação de cinco grupos de isolados, os quais não apresentaram relação com a origem geográfica.

CHAPTER 1

BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* ISOLATES

ABSTRACT

Little is known about the biochemical and biological characteristics of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* (*Xab*). Thus, this study aimed to characterize biochemical and biologically twenty *Xab* isolates collected in begonias produced in regions in the state of São Paulo, two isolates from the United States, and one from New Zealand, to identify a possible relationship between variability and their geographical origin. From biochemical assays, it was found that all *Xab* isolates were Gram negative rods, oxidase negative, catalase positive, aerobic, ice nucleation negative, grew at 35°C, hydrolyzed esculin and starch, produced H₂S from peptone, produced levan, did not digested casein, did not liquefied gelatin and did not use asparagine as the sole source of carbon and nitrogen. Acids were produced aerobically in Dye's medium from arabinose, cellobiose, fructose, galactose, glucose, mannose, and sucrose, but not from adonitol, dulcitol, inulin, mannitol, rhamnose, salicin, and sorbitol. Results varied with inositol, lactose, maltose, melibiose, trehalose, raffinose, and xylose. There were small differences in tests of tolerance to NaCl and TTC. In the pathogenicity tests, it was observed the occurrence of hypersensitivity reaction (HR) in tomato and tobacco plants, but not on coffee plants. An atypical response occurred in bell pepper and beans plants. The isolates were pathogenic to *Begonia elatior*, *B. semperflorens*, *B. cucullata*, and *B. rex*. It was found by cluster analysis five isolates groups and this groups did not show relations of variability with the geographical origin of the strains.

1. INTRODUÇÃO

As begônias compreendem um grupo de plantas muito apreciadas entre as plantas ornamentais e estão entre as cinco flores mais vendidas na Europa (Reynolds *et al.*, 1998). Elas são representadas por aproximadamente 1400 espécies, nativas de regiões tropicais da África, Américas e Ásia (Larson, 1980; Karlsson & Heins, 1992).

Na cultura da begônia ocorrem diversas doenças, as quais necessitam de um manejo eficiente para reduzir danos econômicos (Daughtrey *et al.*, 1995). Dentre estas, a mancha foliar bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* (Takimoto 1934) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 (*Xab*), é uma das mais destrutivas. Essa bacteriose encontra-se disseminada nos Estados Unidos, Canadá, São Vicente, Brasil, Índia, Irã, Japão, Austrália, Nova Zelândia, Turquia e parte da Europa Ocidental (Taylor *et al.*, 1981; Bradbury, 1986, Ornek *et al.*, 2007).

A presença desta bacteriose foi observada no Brasil, em 1943 em material originário do estado de São Paulo, sendo a etiologia confirmada por Robbs em 1954 (Robbs, 1955; Almeida & Beriam, 2007). Atualmente, ela encontra-se disseminada nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Malavolta Jr. *et al.*, 2008).

O estudo da variabilidade de fitopatógenos é crucial para o entendimento da relação patogênica, conhecer a evolução do patógeno, tanto temporal quanto espacial, bem como para estabelecer melhores alternativas de controle. Porém poucos estudos sobre essa bacteriose são conduzidos no Brasil. Sendo assim, objetivou-se determinar aspectos relacionados à variabilidade de isolados brasileiros de *Xab*, por meio de suas características patogênicas e bioquímicas, verificando-se a existência de correlação entre a variabilidade encontrada e a origem geográfica dos isolados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção, padronização e preservação dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*

Os isolados de *Xab* foram obtidos pela coleta de plantas doentes nas principais regiões produtoras de begônia do estado de São Paulo e da coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico de Campinas-SP (Tabela 1). Estes foram inoculados em begônias e posteriormente reisolados, utilizando-se o método padrão de isolamento

de fitobactérias (Romeiro, 2001), a fim de eliminar diferenças de idade e averiguar a sua patogenicidade. As plantas foram inoculadas por meio de infiltração de suspensão bacteriana, com o uso de uma seringa hipodérmica (Klement, 1964). Depois de evidenciados os sintomas de mancha foliar bacteriana nas plantas inoculadas, efetuaram-se o teste de exsudação em gota ao microscópio, seguido do isolamento da bactéria. Preservaram-se os isolados por diferentes métodos: repicagens periódicas em meio YDC (Yeast Extract-Dextrose CaCO₃) (Király *et al.*, 1970; Tuite, 1969, Schaad *et al.*, 2001), em tubos contendo água estéril (Castellani, 1963), criopreservação em glicerina 40% à -80°C (Qualing, 1960) e herborização de folhas sintomáticas (Nichols *et al.*, 1974; Romeiro, 2001).

2.2. Preparo de inóculo

Para o preparo de inóculo, os isolados foram semeados em meio 523 (Kado & Heskett, 1970), incubou-se a 28±1 °C. Após 48 horas, as bactérias foram suspendidas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e a turbidez da suspensão foi ajustada para O.D.₅₄₀ = 0,1 em espectrofotômetro Spectronic 20®, o que corresponde aproximadamente à 1x10⁸ ufc/mL (Schaad, *et al.* 2001).

2.3. Testes bioquímicos

Os isolados de *Xab* foram caracterizados por meio das seguintes provas bioquímicas (Apêndice): reação de Gram com base na solubilidade em KOH (Ryu, 1940; Suslow *et al.*, 1982), produção de catalase (Klement *et al.* 1990); produção de oxidase (Schaad, 1988; Schaad *et al.*, 2001), atividade de nucleação de gelo (Fahy & Hayward, 1983), utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio (Starr & Weiss, 1943), hidrólise da esculina (Schaad, 1988), liquefação da gelatina (Fahy & Hayward, 1983), digestão de proteína (caseína) do leite (Fahy & Hayward, 1983), produção de H₂S a partir de peptona (Schaad *et al.*, 2001), hidrólise do amido (Fahy & Hayward, 1983), formação de levana (Fahy & Hayward, 1983; Schaad, 1988), crescimento a 35°C (Fahy & Hayward, 1983), aerobiose (Ruangrungrrote *et al.*, 2008), produção de ácidos a partir de diversas fontes de carbono (Dye, 1968), tolerância a diferentes concentrações de cloreto de sódio e crescimento a diferentes concentrações de cloreto de trifetil-tetrazolium (TTC) (Kelman, 1954).

Tabela 1 – Hospedeiros e procedência dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* utilizados nos testes bioquímicos e biológicos.

Código	Hospedeiro	Procedência	Mês/Ano de coleta
1	<i>B. elatior</i> var. "Verônica"	Jacareí-SP	2/2008
2	<i>B. elatior</i> var. "Barkos"	Jacareí-SP	2/2008
3	<i>B. elatior</i> var. "Batik"	Jacareí-SP	2/2008
4	<i>B. elatior</i> var. "Borias"	Salesópolis-SP	3/2008
5	<i>B. elatior</i> var. "Barak"	Salesópolis-SP	3/2008
6	<i>B. elatior</i> var. "Barkos"	Salesópolis-SP	3/2008
7	<i>B. elatior</i> var. "Netja"	Salesópolis-SP	3/2008
8	<i>B. elatior</i> var. "Verônica"	Piedade-SP	3/2008
9	<i>B. elatior</i> var. "Batik"	Jacareí-SP	5/2008
10	<i>B. elatior</i> var. "Dragon"	Jacareí-SP	5/2008
11	<i>B. elatior</i> var. "Verônica"	Jacareí-SP	5/2008
12	<i>B. elatior</i> var. "Blitz"	Mairink-SP	6/2008
13	<i>B. elatior</i> var. "Carneval"	Mairink-SP	6/2008
14	<i>B. elatior</i> var. "Batik"	Jacareí-SP	7/2008
15	<i>B. elatior</i> var. Blitz	Jacareí-SP	7/2008
16	<i>B. elatior</i> var. "Carneval"	Jacareí-SP	7/2008
17	<i>B. elatior</i> var. "Verônica"	Jacareí-SP	7/2008
18	<i>Begonia</i> sp.	Nova Zelândia (IBSBF 2442)	1962
19	<i>Begonia</i> sp.	Piedade-SP (IBSBF 1475)	1999
20	<i>Begonia</i> sp.	Holambra-SP (IBSBF 1054)	1994
21	<i>Begonia</i> sp.	Holambra-SP (IBSBF 1138)	1995
22	<i>Begonia</i> SP	EUA (IBSBF620)	1994

2.4. Testes de patogenicidade

Avaliou-se a patogenicidade dos isolados de *Xab* a diferentes espécies de begônias (*B. elatior*, *B. rex*, *B. semperflorens* e *B. cucullata*). As plantas foram inoculadas por meio da infiltração da suspensão bacteriana nos espaços intercelulares da folha com o uso de uma seringa hipodérmica fina (Klement, 1964). Como tratamento controle, as plantas foram infiltradas com solução salina 0,85%. Após o aparecimento dos sintomas foi realizado o teste de exsudação em gota para confirmar a etiologia bacteriana das lesões (Romeiro, 2001).

Para a realização do teste de hipersensibilidade (HR), foram utilizadas diferentes plantas-teste: feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), pimentão (*Capsicum annun*, L.), tomate (*Solanum lycopersicun*, L.), café (*Coffea arabica*, L.) e fumo (*Nicotiana tabacum*, L.). As plantas foram crescidas em casa de vegetação e mantidas em câmara de crescimento a 16°C por 4 dias (Fahy & Hayward, 1983). Após este período, estas foram inoculadas

por meio da infiltração de suspensão bacteriana nos espaços intercelulares da folha, com auxílio de uma seringa hipodérmica fina (Klement, 1964). O tratamento controle consistiu da inoculação das plantas com a solução de salina 0,85%. Após a inoculação, todas as plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 30°C. Avaliou-se HR 24 e 48 horas após a inoculação.

2.5. Local de realização da pesquisa e análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia e Patologia de Sementes, na Clínica de Doenças de Plantas, em casa de vegetação e em câmara de crescimento de 16°C e 30°C do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, entre setembro de 2008 e junho de 2009.

Todos os experimentos foram realizados no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento. Os experimentos foram executados duas vezes para verificar a repetibilidade dos resultados.

Para a avaliação da variabilidade dos isolados de *Xab*, foram realizadas análises estatísticas multivariadas, considerando-se simultaneamente os resultados dos diferentes testes bioquímicos e biológicos. Efetuou-se a análise de cluster (agrupamento) com o objetivo de agrupar isolados homogêneos a partir de coeficientes de similaridade ou de correspondência. Primeiramente geraram-se matrizes de distância, utilizando-se o complemento aritmético do coeficiente de similaridade de Jaccard (Dias, 2006), aplicado sobre todos os resultados em que houve variação dos testes bioquímicos (item 2.3.) juntamente com os testes biológicos (item 2.4.). Para o processamento do referido coeficiente de similaridade, os resultados dos testes bioquímicos e biológicos realizados foram traduzidos em valores quantitativos binários, 0 e 1, referindo-se a resultado negativo (ausência) e positivo (presença), respectivamente. O processamento dessas matrizes foi realizado por meio do programa GENES (Cruz, 2001). A seguir, aplicou-se o algoritmo de agrupamento das médias das distâncias (UPGMA) sobre a matriz de distâncias, a fim de visualizar a classificação dos isolados em um dendrograma. O processamento do algoritmo e a construção do dendrograma foram realizados com a aplicação do programa GENES (Cruz, 2001).

3. RESULTADOS

3.1. Testes bioquímicos

Pelos resultados dos testes bioquímicos (Tabela 2), verificou-se que os isolados apresentaram características próprias do gênero *Xanthomonas* (Krieg & Holt, 1984; Schaad & Stall, 1988). O resultado negativo no teste de Gram, a não utilização de asparagina como a única fonte de carbono e o fato de serem aeróbios estritos confirmaram sua classificação no gênero.

Os isolados, quando cultivados em meio 523 e meio nutriente ágar sólido, apresentaram colônias amarelas, brilhantes, convexas, circulares, com margens inteiras e de consistência viscosa. No teste de levana, apresentaram colônias convexas e mucóides. Todos os isolados de *Xab* avaliados apresentaram resultados negativos para os testes de oxidase, nucleação do gelo, digestão da caseína do leite e liquefação da gelatina, e positivos para catalase, crescimento a 35°C, hidrólise de amido e esculina, e produção de H₂S a partir de peptona. Quanto à produção de ácidos a partir de diferentes fontes de carbono, todos os isolados apresentaram resultados positivos para arabinose, celobiose, frutose, galactose, glucose, manose e sucrose, e negativos para adonitol, dulcitol, inulina, glicerol, manitol, ranmose, salicina e sorbitol. Já para inositol, lactose, maltose, melibiose, trealose, rafinose, e xilose, observaram-se resultados diferentes do esperado e observaram-se variações entre os isolados. O mesmo foi observado nos testes de tolerância a concentrações de NaCl e de TTC.

3.2. Testes de patogenicidade

Todos os isolados avaliados foram patogênicos a *B. elatior*, *B. semperflorens*, *B. cucullata* e *B. rex*. Foram observadas a indução de HR de todos os isolados avaliados em plantas de tomate e fumo, não indução de HR em plantas de café e resposta atípica em pimentão e feijão na qual foi observada uma clorose no local de inoculação da suspensão bacteriana.

3.3. Variabilidade dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*

Os resultados obtidos dos testes bioquímicos foram utilizados para a análise de agrupamento. Foi gerado um dendograma, o qual apresentou coeficiente de correlação cofenética de 0,85, demonstrando boa qualidade deste (Brunet *et al.*, 2004) (Figura 1) . Efetuou-se um corte à distância de 0,25, correspondente à 50% do valor da distância no último ponto de fusão (0,51). Este corte possibilitou a formação de cinco grupos, sendo que o grupo 1 é formado apenas pelo isolado 20, o grupo 2 é formado pelo isolado 5, o grupo 3 pelo isolado 21, o grupo 4 pelos isolados 2, 3, 4, 7, 8, 10 e 22 e o grupo 5 pelos isolados 1, 6, 9, 11, 12, 13, 14,15, 16, 17, 18 e 19 (Figura1).

Tabela 2. Resultados dos testes bioquímicos apresentados pelos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*.

Testes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Taylor <i>et al.</i> , 1981	
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asparagina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+*
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cresc.35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aerobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ranmose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+

(+) reação positiva, (-) reação negativa, (+/-) reação fracamente positiva, (+*) reação lenta

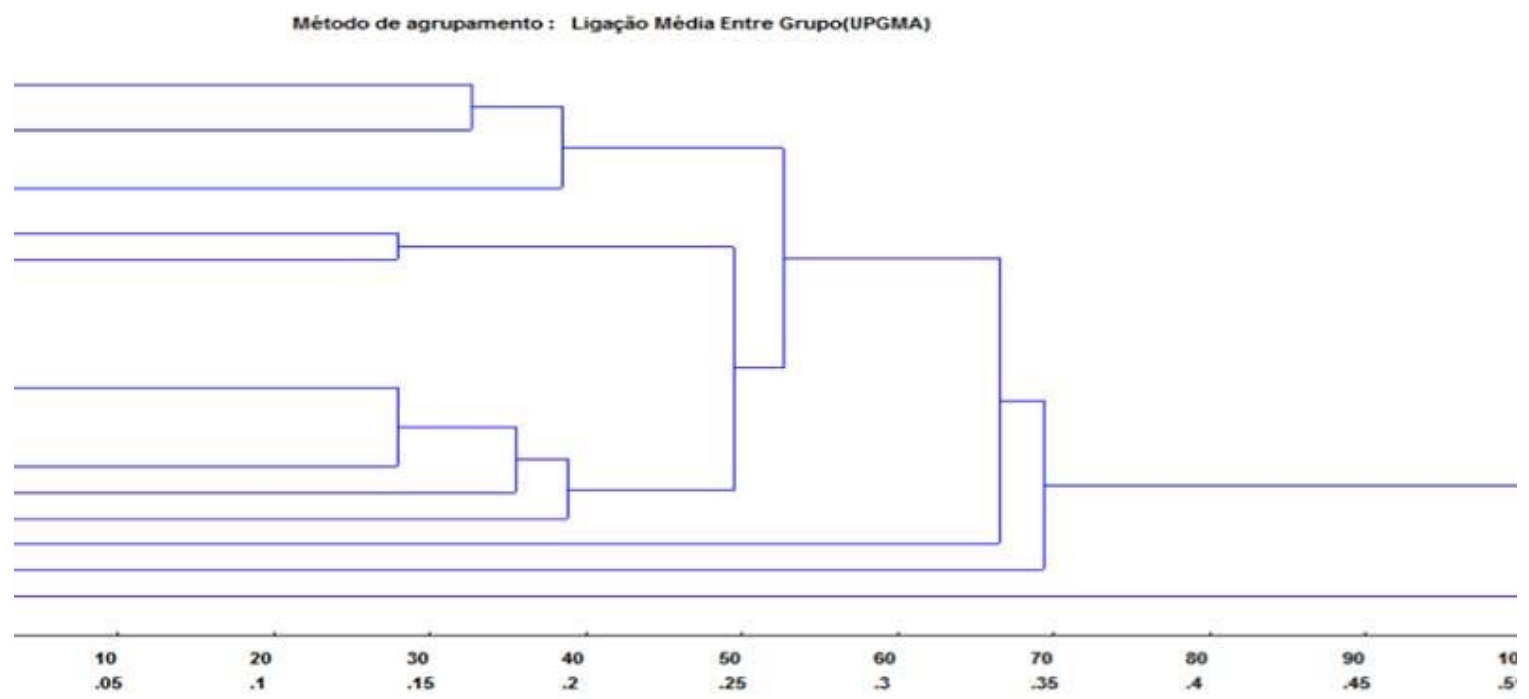
Tabela 2. Continuação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Taylor <i>et al.</i> , 1981	
Maltose	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	*
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TTC 0,04	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	**
NaCl 0,05	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	***

(+) reação positiva, (-) reação negativa, (+/-) reação fracamente positiva, (*) reação variável, (**) Tolerância máxima 0,02%,

(***) Tolerância entre 3 a 4 %

Figura 1. Dendograma de UPGMA referente a 22 isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* avaliados com base nas características bioquímicas.



4. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nos testes bioquímicos de Gram, catalase, oxidase, utilização de asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, hidrólise do amido, nucleação do gelo, produção de H₂S a partir de peptona, hidrólise da esculina, crescimento à 35°C e utilização de adonitol, arabinose, celobiose, dulcitol, frutose, galactose, glucose, inulina, manitol, manose, ranmose, salicina, sorbitol, sucrose foram consistentes com descrição realizada por Taylor *et al.* (1981). Sendo assim estes testes podem auxiliar nos protocolos de caracterização de *Xab*.

Os testes de formação de ácidos a partir de lactose, maltose, melibiose e trealose apresentam variação nos resultados para alguns isolados de *Xab*. Todos os isolados formaram ácidos a partir dessas fontes de carbono, porém alguns dos isolados apresentaram uma reação fracamente positiva. Deste modo, estes testes se mostram mais apropriados para a caracterização de isolados de *Xab*.

Quanto aos testes de tolerância às diferentes concentrações de NaCl e de TTC, e a formação de ácidos a partir de glicerol, inositol, rafinose e xilose, obtiveram-se resultados diferentes em relação ao descrito por Taylor *et al.* (1981). Estas diferenças são decorrentes da variabilidade natural entre isolados de uma dada espécie bacteriana. Por exemplo, Eichenlaub *et al.* (2006) observam que nas subespécies de *Clavibacter michiganensis*, caracteres fenotípicos tais como a pigmentação, o crescimento em diferentes meios de cultura ou o uso de diferentes fontes de carbono, é freqüentemente variável, em função do isolado ou do meio de cultura utilizado. Lima (2009) avaliou diferentes características bioquímicas de isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e verificou que algumas mostraram-se variáveis quando confrontadas com os relatos de outros autores. O conhecimento desta variabilidade é importante tanto para se entender melhor a interação patógeno-hospedeiro, quanto para o desenvolvimento de métodos diagnósticos eficientes. Características variáveis são mais adequadas aos procedimentos de caracterização do que de diagnóstico.

Por meio dos testes de patogenicidade observou que todos os isolados testados foram patogênicos a *B. elatior*, *B. rex*, *B. cucullata* e *B. semperflorens*. O primeiro relato desta doença, em 1920, nos Estados Unidos, foi na espécie *B. tuberhybrida* (Ark & Tompkins, 1939). No Brasil a presença dessa bacteriose foi observada no ano de 1943 em material originário do estado de São Paulo, sendo a etiologia confirmada por Robbs em 1954 (Robbs, 1955; Almeida & Beriam, 2007), mas a espécie de begônia não

foi definida. Harri *et al.* (1977) descreveram a infecção por *Xab* ocorrendo em *B. rieger* cv. “Aphrodite rose” e confirma a susceptibilidade de outras variedades de *B. rieger*, begônia fibrosa, begônia tuberosa e uma variedade de begônia Lorraine. Ornek *et al.* (2007) relataram a presença de *Xab* em *B. tuberhybrida* cvs. “Frutta”, “Kleo”, “Apricot” e “Red”. Jodon & Nichols (1974) observaram resistência à doença em variedades de *B. rex* e, posteriormente, esse resultado foi observado no trabalho de Harri *et al.* (1977). Chase (1992) estudou a susceptibilidade de oito cultivares de *B. rex* e concluiu que existem diferentes níveis de susceptibilidade a *Xab*, o que pode explicar o fato de *B. rex* ter sido suscetível à bactéria em nosso estudo. Podemos concluir então, que a bactéria pode ser patogênica a um grande número de espécies deste gênero.

A determinação de plantas indicadoras de HR é importante, pois auxilia na confirmação da patogenicidade em curto espaço de tempo, agilizando a identificação do agente etiológico da doença (Schaad *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2003). Sendo assim, pode-se recomendar a utilização de plantas de fumo e tomate para o teste de HR a fim de averiguar a patogenicidade de *Xab*.

Nem toda relação incompatível resulta em HR, como demonstrado em diversos trabalhos (Romeiro *et al.*, 1988, Romeiro *et al.*, 1994, Romeiro & Lima Junior, 1998) e também observado em nosso estudo para plantas de café.

Lelliott & Stead (1987), indicam condições ambientais específicas no uso de plantas de tomate e pimentão para HR em espécies de *Xanthomonas*. Eles recomendam manter estas plantas testes a 16°C durante quatro dias antes da inoculação e 30°C após a inoculação. Em nosso trabalho, não foi observado HR em plantas de pimentão e feijão mesmo mantidas nessas condições. O resultado foi considerado atípico, tendo se observado uma clorose, que não foi considerada uma resposta positiva de HR. A reação positiva para HR é dada pelo rápido colapso dos tecidos vegetais, 24-48 horas após a inoculação, sendo observadas lesões necróticas de coloração marrom clara (Lelliott & Stead, 1987).

Os cinco grupos de isolados formados pela análise de agrupamento não tiveram correlação com a origem geográfica dos isolados de *Xab*. A ocorrência de variabilidade entre populações bacterianas nem sempre está relacionada com a origem dos isolados. Nassar *et al.* (1994) realizaram um estudo de variabilidade baseado na seqüência do rRNA 16s e 23s, com isolados de *Erwinia chrysanthemi* provenientes de diferentes hospedeiros e regiões. Eles observaram que os grupos formados pela análise de agrupamento tiveram alta correlação com os patovares e biovares estabelecidos, mas

pouca correlação com a distribuição geográfica. Utilizando testes bioquímicos, Hayward (1964) também não conseguiu qualquer correlação entre os resultados de diversos testes realizados e a origem geográfica de 185 isolados de *Ralstonia solanacearum* avaliados em um estudo de caracterização. Nobrega *et al.* (2004) realizaram a caracterização fenotípica, morfológica, bioquímica e fisiológica em 72 isolados de bactérias diazotróficas associativas Gram-negativas (gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*) oriundos de áreas sob diferentes estratégias de reabilitação após a mineração da bauxita em Poços de Caldas (MG). Apesar da grande variabilidade nos testes bioquímicos, inclusive no teste de tolerância a NaCl, não houve relação entre os grupos formados pelas várias características estudadas com as áreas de origem dos isolados.

Acredita-se que a ocorrência da doença nas propriedades seja decorrente da aquisição de materiais propagativos contaminados. Como a disseminação planta a planta nos locais de produção é difícil, a variabilidade dos isolados na propriedade pode ser decorrente da chegada de material propagativo contaminado de diferentes fornecedores. A disseminação nos locais de produção é dificultada porque a maioria dos produtores de begônia utiliza subirrigação de enchente vazante (Ebb and Flow System). Com este sistema, as chances de disseminação da doença de uma planta para as vizinhas são pequenas (Atmatjidou *et al.*, 1991). A irrigação por gotejamento também é utilizada, conferindo menores taxas de disseminação da doença. Ambos os sistemas de irrigação possuem maior eficiência no controle fitossanitário, pois não molham a parte aérea dos vegetais (evitando a disseminação da bactéria) e permitem uma maior eficiência no uso de fungicidas protetores. A multiplicação de *B. elatior* é feita por meio de propagação vegetativa (Espino *et al.*, 2004) e, durante a execução deste procedimento, as chances de disseminação são extremamente elevadas. Como a maioria dos produtores opta pela aquisição de mudas junto a empresas especializadas, e devido ao fato da bactéria poder encontrar-se na forma latente nos tecidos vegetais (Digat & Vidalie, 1975), as mudas podem vir infectadas desde sua origem. Assim, a variabilidade pode estar relacionada aos locais onde as mudas são produzidas e não nos locais de cultivos.

Tendo em vista os resultados obtidos, podemos observar que a variabilidade está restrita a alguns isolados, sendo os testes de formação de ácidos a partir xilose, trealose, melibiose, rafinose, maltose e inositol e de tolerância a NaCl e TTC, os responsáveis pela variação entre os isolados avaliados. Resultados mais conclusivos sobre a

variabilidade dos isolados podem ser obtidos com a utilização de um maior número de isolados, de outros testes bioquímicos e com a utilização de técnicas moleculares.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, I.M.G.; BERIAM, L.O.S. Doenças bacterianas e controle. In: ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L. **Aspectos Fitopatológicos de Plantas Ornamentais**, São Paulo: Instituto Biológico, Boletim técnico n° 20, 1 ed, 2007. 73p.

ARK, P.A.; TOMPKINS, C.M. Bacteriosis of tuberous begonia. **Phytopathology**, 29:663-667, 1939.

ATMATJIDOU, V.P.; FYNN, R.P.; HOITINK, H.A. Dissemination and transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* in an ebb and flow irrigation system. **Plant Disease**, 75:1261-1265, 1991.

BRUNET, J-P.; TAMAYO, P.; GOLUN, T.R.; MESIROV.J.P. Metagenes and molecular pattern discovery using matrix factorization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101(12): 4164-4169, 2004.

CASTELLANI, A. Further research on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathology Mycology Applied**, 20:1-2, 1963.

CHASE, A.R. Resistance of some Rex begonia cultivar to *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae*. **Apopka Research Report Index**. Research Reports n°18, 1992. 3p.

CRUZ, C.D. **Programa genes**: versão Windows, aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. 648p.

DAUGHTREY, M.L.; WICK, R.L.; PETERSON, J.L. **Compendium of flowering potted plant diseases**. Saint Paul: APS Press, 1 ed, 1995. 90p.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: : ALFENAS, A.C. (Org.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**, Viçosa-MG: UFV, 2006. 405-475 p..

DIGAT, B.; VIDALIE, H. Cultivation of *Begonia x elatior* Rieger and phytosanitary problems. **Pepinieristes, Horticulteurs, Maraichers**, 162:13-22, 1975.

DYE, D.W. A taxonomic study of the genus *Erwinia*, 1. "amylovora" group. **New Zealand Journal of Science**, 11:590-607, 1968.

ESPINO F.J.; LINACERO R.; RUEDA J.; A.M. VÁZQUEZ. Shoot regeneration in four *Begonia* genotypes. **Biologia Plantarum**, 48(1): 101-104, 2004.

FAHY, P.C.; HAYWARD, A.C. Media and methods for isolation and diagnostic tests. In.: FAHY, P.C., PRESLEY, G.J. (Eds.) **Plant bacterial disease - a diagnostic guide**. Sidney: Academic Press, 1983. 393p

GONZALEZ, A.J.; RODICIO, M.R.; MENDOZA, M.C. Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. **Applied and Environmental Microbiology**, 69(5):2936-2941, 2003.

HARRI, J.A.; LARSEN, P.O.; POWELL JR, C.C. Bacterial leaf spot and blight of *Rieger* begonia: Systemic Movement of the pathogen, host range and chemical control trials. **Plant Disease Reporter**, 61(8):649-654, 1977.

HAYWARD, A.C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal Applied Bacteriology**, 27 (2), 265-277, 1964.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Caracterização do Setor Produtivo de Flores e Plantas Ornamentais no Brasil**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=244&id_pagina=1>. Acessado em: 5 de julho de 2009.

JODON, M.H.; NICHOLS, L.P. Bacterial leaf spot of begonia. **Pennsylvania Flower Grower Bulletin**, 272(1):8-9, 1974.

KADO, C.I., HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, 60: 969-976, 1970.

KARLSSON, M.G.; HEINS, R.D. Begonias In LARSON, R.A. **Introduction to floriculture**, New York: Academic Press, 2 ed, 1992. 409-428p.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. **Phytopathology**, 44:693-695, 1954.

KIRÁLY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYMOŠKY, E.; VOROS, J. **Methodos in plant pathology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1970. 509p.

KLEMENT, Z. Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonas. **Nature**, 199:209-300, 1964.

KLEMENT, Z.; RUDOLOH, K.; SANDS, D.C. (Eds.) **Methods in Phytobacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. 568p.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore/London: Williams & Wilkins, v1, 1984. 660p.

LARSON, R.A. Begonias. In: LARSON, R.A. (Ed.). **Introduction to floriculture**. New York: Academic Press, 1ed, 1980. 395-340p.

LELLIOT, R.A.; STEAD, D.E. **Methods for diagnosis of bacterial diseases of plants- Methods in Plant Pathology**, London: Brackwell Scientific Publications, v2, 1987. 216p.

NASSAR, A.; BERTHEAU, Y.; DERVIN, C.; NARCY, J-P.; LEMATTRE, M. Ribotyping of *Erwinia chrysanthemi* Strains in Relation to Their Pathogenic and Geographic Distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, 60(10):3781-3789, 1994.

NICHOLS, L.P.; JODON, M.H.; SCARBOROUGH, B. Longevity of *Xanthomonas begoniae*, the cause of bacterial leafspot on *Rieger* begonias. **Plant disease reporter**, 58(9):814, 1974.

NOBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; LIMA, A.S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 28(2): 269-279, 2004.

ORNEK, H.A.; AYSAN, Y.A.; MIRIK, M.B.; SAHIN, F.C. First report of bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*, on begonia in Turkey. **Plant Pathology**. 56(2):347, 2007.

QUALING, C. Preservation of *Xanthomonas* by freezing in glycerol broth. **Canadian Journal of Microbiology**, 6:475, 1960.

REYNOLDS, D.; DEVRIES, D.; CARNEY, L. Begonia. In: BALL, V. (Ed.). **Ball red book**. Batavia: Ball Publishing, 1998. 388-395p.

ROBBS, C.F. Algumas bactérias fitopatogênicas do Distrito Federal. **Agronomia**, 14(2):147-164, 1955.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279p.

ROMEIRO, R.S.; LIMA JUNIOR, V.B. Preliminary evidence for phytoalexin production by *Eucalyptus urophylla* leaves as a response to inoculation with the incompatible pathogen *Acidovorax avenae* pv. *avenae*. **Journal of Phytopathology**, 146:5-6, 1998.

ROMEIRO, R.S.; MUCHOVEJ, J.J.; KIMURA, O. Soft rot of peruvian carrot due to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in Brasil. **Plant Pathology**, 37:300-302, 1988.

ROMEIRO, R.S.; SIMÕES, A.R.; MUCHOVEJ, J.J.; OLIVEIRA, J.R.; SOUZA, R.M. Bacterial sudden yellow and soft rot of *Coriandrum sativum*. **Plant Pathology**, 43:944-946, 1994.

RUANGRUNGROTE, S.; INTASORN, A.; SINDERMSUK, J.; ATTASONGKROAH, M. The feasibility of gas pack envelope production for anaerobic bacteria cultivation. **Thammasat International Journal of Science and Technology**, 13 (3):1-7, 2008.

RYU, E. A simple method for differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. **Kitazato Archives of Experimental Medicine**, 17:58-63, 1940.

SCHAAD, N.W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. American Phytopathological Society Press: Saint Paul, 2 ed. 1988. 163p.

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 3 ed. 2001. 373p.

SCHAAD, N.W.; STALL, R.E. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N.W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2 ed. 1988. 163p.

STARR, M.P.; WEISS, J.E. Grow of phytopathogenic bacteria in a synthetic asparagum medium. **Phytopathology**, 33:314-318, 1943.

SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N.; ISAKA, M. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. **Phytopathology**, 72:917-918, 1982.

TAYLOR, E.H.; BRADBURY, J.F.; PREECE, T.F. *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae*. **Description of Fungi and Bacteria**, n° 70, 1981.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239p.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NO CONTROLE DA MANCHA FOLIAR BACTERIANA EM BEGÔNIA

RESUMO

A mancha foliar bacteriana em begônias, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*, é uma das doenças mais importantes nas produções comerciais de begônias, principalmente nos cultivos em ambientes protegidos e no verão, quando as condições ambientais são bastante favoráveis para a disseminação da bactéria. No Brasil, não existem produtos registrados para o controle da doença e pouco se conhece sobre a eficiência dos bactericidas disponíveis no mercado para o controle da mesma. Avaliou-se, portanto, a eficiência dos produtos oxiclreto de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso, sulfato de cobre, cloreto de benzalcônico, casugamicina, oxitetraciclina+estreptomicina e oxitetraciclina+sulfato de cobre nas concentrações recomendadas e 50% acima e abaixo destas. Todos os produtos tiveram efeito no controle da doença. A oxitetraciclina+estreptomicina e a oxitetraciclina+sulfato de cobre foram os produtos mais efetivos no controle da doença. O oxiclreto de cobre, o hidróxido de cobre e o óxido cuproso apresentaram uma eficiência intermediária, enquanto a casugamicina foi a menos efetiva. O sulfato de cobre e o cloreto de benzalcônico foram fitotóxicos para as plantas de begônia nas três concentrações testadas. A menor severidade da doença foi sempre proporcional ao aumento da concentração dos produtos.

CHAPTER 2

EVALUATION OF PESTICIDES IN THE CONTROL OF BACTERIAL LEAF SPOT AND BLIGHT IN BEGONIA

ABSTRACT

Bacterial leaf spot and blight of begonias, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae*, is one of the most important diseases in commercial production areas, especially in crops in greenhouses and summer season, when environmental conditions are quite favorable for bacteria spread. In Brazil, there are no products registered to control this disease and little is known on the effects of bactericides from the market to its control. In this study, it was evaluated the performance of the products copper oxychloride, copper hydroxide, cuprous oxide, copper sulphate, benzalkonium chloride, kasugamycin, oxytetracycline+streptomycin and oxytetracycline + copper sulfate in the recommended concentration, and 50% above and 50% below it. All products had an effect in controlling the disease. Oxytetracycline+streptomycin and oxytetracycline+copper sulfate showed the best disease control. Cuppic hydroxide, copper oxychloride and cuprous oxide had intermediate efficiency. Kasugamycin was less effective to control the disease. Copper sulphate and benzalkonium chloride leaf spot and blight of begonias were phytotoxic at the three concentrations tested. The lower disease severity was always proportional to the increase of products concentration.

1. INTRODUÇÃO

A begônia é umas das plantas ornamentais mais cultivadas e comercializadas no Brasil (Reynolds *et al.*, 1998). Segundo Wehlburg (1967) e Daughtrey *et al.* (1995), uma das doenças mais importantes da cultura é a mancha foliar bacteriana, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* Takimoto (1934) Vauterin *et al.* (1995) (*Xab*). Essa bacteriose encontra-se disseminada nos Estados Unidos, Canadá, São Vicente, Brasil, Índia, Irã, Japão, Austrália, Nova Zelândia, Turquia e parte da Europa Ocidental (Taylor *et al.*, 1981; Bradbury, 1986, Ornek *et al.*, 2007).

A presença desta bacteriose foi observada no Brasil, em 1943 em material originário do estado de São Paulo, sendo a etiologia confirmada por Robbs em 1954 (Robbs, 1955; Almeida & Beriam, 2007). Atualmente, ela encontra-se disseminada nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Malavolta Jr. *et al.*, 2008).

Algumas medidas preventivas são adotadas no controle da mancha foliar bacteriana da begônia, tais como uso de mudas sadias, medidas de sanitização - desinfestação de mudas, vasos, estacas, bancadas, ferramentas e das mãos após a manipulação de plantas doentes - e controle cultural - aumento do espaçamento ente as plantas para promover uma maior aeração e drenagem, evitando o acúmulo de água nas folhas, eliminação de plantas doentes, não manipulação de plantas com folhas úmidas e manejo da irrigação (Janse, 2005; Almeida & Beriam, 2007). Embora existam poucos bactericidas dentre o grande e crescente número de pesticidas fabricados, o tratamento químico é importante para a proteção das plantas contra esta doença. Uma das principais razões do baixo número de bactericidas comerciais está, provavelmente, relacionada com a preocupação causada pelo rápido desenvolvimento de isolados resistentes de bactérias patogênicas (Swings & Civerolo, 1993). Fujinawa *et al.* (2008), observaram a insensibilidade de *Xab in vitro* a alguns fungicidas cúpricos e antibióticos, demonstrando a possível seleção de populações bacterianas resistentes. De acordo com Lopes & Quezado-Durval (1997), o controle químico de doenças bacterianas apresenta resultados variáveis, pois os antibióticos e fungicidas cúpricos, usualmente empregados na tentativa de controlar a doença, têm apresentado certa eficiência somente quando as condições ambientais não são muito favoráveis ao desenvolvimento da doença e quando a população do patógeno prevalente na região não é resistente aos princípios ativos utilizados. No Brasil, não existem produtos registrados para o controle da mancha foliar bacteriana em begônias (Andrei, 2005; AGROFIT, 2009) e pouco se conhece da

eficiência dos bactericidas disponíveis no mercado para o controle da mesma. Face ao exposto, avaliou-se a sensibilidade de isolados de *Xab* a diversos agrotóxicos e a eficiência destes produtos no controle da mancha foliar bacteriana em begônia em condições de casa de vegetação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção, padronização e preservação dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*

Os isolados de *Xab* foram obtidos pela coleta de plantas doentes nas principais regiões produtoras de begônia do estado de São Paulo e da coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico de Campinas-SP (Tabela 1). Estes foram inoculados em begônias e posteriormente reisolados, utilizando-se o método padrão de isolamento de fitobactérias (Romeiro, 2001), a fim de eliminar diferenças de idade e averiguar a sua patogenicidade. As plantas foram inoculadas por meio de infiltração de suspensão bacteriana, com o uso de uma seringa hipodérmica (Klement, 1964). Depois de evidenciados os sintomas de mancha foliar bacteriana nas plantas inoculadas, efetuou-se o teste de exsudação em gota ao microscópio, seguido do isolamento da bactéria. Preservaram-se os isolados por diferentes métodos: repicagens periódicas em meio YDC (Yeast Extract-Dextrose CaCO₃) (Király *et al.*, 1970; Tuite, 1969, Schaad *et al.*, 2001), em tubos contendo água estéril (Castellani, 1963), criopreservação em glicerina 40% à -80°C (Qualing, 1960) e herborização de folhas sintomáticas (Nichols *et al.*, 1974; Romeiro, 2001).

2.2. Preparo de inóculo

Para o preparo de inóculo, os isolados foram semeados em meio 523 (Kado & Heskett, 1970), incubou-se a 28±1 °C. Após 48 horas, as bactérias foram suspendidas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e a turbidez da suspensão foi ajustada para O.D.₅₄₀ = 0,1 em espectrofotômetro Spectronic 20®, o que corresponde aproximadamente à 1x10⁸ ufc/mL (Schaad, *et al.* 2001).

Tabela1. Hospedeiro e procedência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* utilizados na avaliação de agrotóxicos para o controle da mancha foliar bacteriana em begônia.

N° Isolado	Hospedeiro	Procedência	Mês/Ano de coleta
1	<i>B. elatior</i> var. "Verônica"	Jacareí-SP	2/2008
2	<i>B. elatior</i> var. "Barkos"	Jacareí-SP	2/2008
3	<i>B. elatior</i> var. "Batik"	Jacareí-SP	2/2008
4	<i>B. elatior</i> var. "Borias"	Salesópolis-SP	3/2008
5	<i>B. elatior</i> var. "Barak"	Salesópolis-SP	3/2008
6	<i>B. elatior</i> var. "Barkos"	Salesópolis-SP	3/2008
7	<i>B. elatior</i> var. "Netja"	Salesópolis-SP	3/2008
8	<i>B. elatior</i> var. "Verônica"	Piedade-SP	3/2008
9	<i>B. elatior</i> var. "Batik"	Jacareí-SP	5/2008
10	<i>B. elatior</i> var. "Dragon"	Jacareí-SP	5/2008
11	<i>B. elatior</i> var. "Verônica"	Jacareí-SP	5/2008
12	<i>B. elatior</i> var. "Blitz"	Mairink-SP	6/2008
13	<i>B. elatior</i> var. "Carneval"	Mairink-SP	6/2008
14	<i>B. elatior</i> var. "Batik"	Jacareí-SP	7/2008
15	<i>B. elatior</i> var. Blitz	Jacareí-SP	7/2008
16	<i>B. elatior</i> var. "Carneval"	Jacareí-SP	7/2008
17	<i>B. elatior</i> var. "Verônica"	Jacareí-SP	7/2008
18	<i>Begonia</i> sp.	Nova Zelândia (IBSBF 2442)	1962
19	<i>Begonia</i> sp.	Piedade-SP (IBSBF 1475)	1999
20	<i>Begonia</i> sp.	Holambra-SP (IBSBF 1054)	1994
21	<i>Begonia</i> sp.	Holambra-SP (IBSBF 1138)	1995
22	<i>Begonia</i> SP	EUA (IBSBF620)	1994

2.3. Plantas de begônia

Foram utilizadas plantas de *Begonia elatior* da variedade "Batik" de 5 a 6 semanas, com três a quatro folhas bem desenvolvidas, cultivadas em substrato comercial (Rendimax®), contidos em vasos de 400mL. Estas foram mantidas em casas de vegetação com temperatura em torno de 28°C e alta umidade relativa (aproximadamente 90%).

2.4. Defensivos agrícolas

Foram avaliados nove defensivos agrícolas recomendados para o controle de fitobacterioses em outras culturas (Tabela 2). Estes foram avaliados em três dosagens: a recomendada (1), 50% acima (1,5) e 50% abaixo (0,5). A concentração recomendada foi determinada pela média da concentração recomendada para outras culturas. O produto OXI+SDC foi avaliado apenas na segunda repetição dos experimentos.

Tabela 2. Produtos químicos avaliados quanto à eficiência no controle da mancha foliar bacteriana em *Begonia elatior*.

Tratamentos	Princípio Ativo	Produto Comercial	Concentração recomendada
OXI+STR	Oxitetraciclina+Estreptomicina	Agrimicina®	3 g/L
CAS	Casugamicina	Hokko Kasumin®	3 mL/L
ODC1	Oxicloreto de cobre	Cobox®	2 g/L
ODC2	Oxicloreto de cobre	Cupravit®	3 g/L
HDC	Hidróxido de cobre	Kocide®	3 g/L
OCP	Óxido cuproso	Sandoz®	2,4 g/L
OXI+SDC	Oxitetraciclina+Sulfato de cobre	Agrimaicin®	3 g/L
CBZ	Cloreto de benzalcônio	Fegatex®	2,5 mL/L
SDC	Sulfato de cobre	Viça Café®	3,125 g/L

2.5. Sensibilidade *in vitro* dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* aos produtos químicos avaliados

Em meio 523 fundente, foram adicionadas alíquotas de cada um dos diferentes produtos, em quantidade necessária para se obter a concentração final de 1,5 vezes a concentração recomendada. A mistura foi vertida para placas de Petri e, após a solidificação, estas foram setorizadas externamente e em cada setor foi semeada uma alíquota de 10µL de suspensão bacteriana na concentração de 1×10^8 ufc/mL. O tratamento controle consistiu no semeio dos isolados em meio 523 sem a adição dos produtos. As placas foram mantidas a 28 ± 1 °C por 120 horas. Após este período, avaliou-se a presença ou não de crescimento bacteriano. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial (22 isolados x 10 tratamentos) e três repetições para cada tratamento.

2.6. Avaliação da eficiência dos produtos químicos para o controle da mancha foliar bacteriana em begônia

As plantas de begônia foram mantidas em casa de vegetação (temperatura máxima 30°C), onde foram pulverizadas com os diferentes produtos, nas concentrações de 0,5, 1,0, e 1,5 vezes a concentração recomendada, até o ponto de escorrimento. As plantas foram mantidas em câmara úmida por sete dias para permitir a penetração da bactéria através dos estômatos, hidatódios e lenticelas e ao final deste período, foram inoculadas com suspensão bacteriana de *Xab* na concentração de 1×10^8 ufc/mL. O

isolado escolhido para a inoculação foi aquele que se apresentou mais insensível aos produtos avaliados no item 2.5. A inoculação foi realizada com auxílio de um atomizador do tipo “De Vilbiss”, buscando-se a cobertura completa de todas as folhas pela suspensão, sem que houvesse escorrimento. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, com UR aproximada de 90%, onde foram avaliadas quanto ao progresso da doença. Os dados de temperatura e umidade relativa foram registrados a cada hora com o auxílio do aparelho HOBOTM Pro Series Temp RH, desde a pulverização dos produtos até a última avaliação da severidade da doença. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial (3 concentrações x 10 tratamento), e três repetições para cada tratamento. A parcela experimental constituiu-se de uma planta, sendo avaliadas três folhas por planta. A partir do aparecimento dos primeiros sintomas, avaliou-se a severidade da doença (percentual da área foliar lesionada) em cada folha. A área foliar lesionada foi estimada de forma visual, após o treinamento do avaliador no programa SEVERITY.PRO (Nutter & Litwiller, 1998) para auxiliar no treinamento de avaliadores, com base em imagens de diferentes doenças com diferentes níveis de severidades calculados automaticamente pelo computador. Utilizou-se a média da severidade das três folhas nas análises estatísticas. Para avaliar a intensidade da doença, foram observados o período de incubação (PI), a severidade máxima ao final da epidemia ($Y_{\text{máx}}$), a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e a taxa de progresso da doença (r). Esta última foi estimada após o ajuste dos modelos descritos por Campbell & Madden (1990) aos dados de progresso da doença nas análises de regressão linear e não-linear. Para seleção do melhor modelo, adotaram-se os critérios: menor valor do quadrado médio do resíduo, independência e homogeneidade dos resíduos e maior valor do coeficiente de determinação (R^2).

2.7. Local de realização da pesquisa e análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia e Patologia de Sementes e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, de agosto de 2008 à junho de 2009. Procedeu-se a análise de variância (ANOVA) e, quando da ocorrência de diferenças significativas (F , $p \leq 0,05$), comparou-se as médias de PI, $Y_{\text{máx}}$ e AACPD dos tratamentos pelo teste de Fisher LSD a 5 % de probabilidade. As estimativas das taxas de progresso da doença (r) entre

os tratamentos foram comparadas por meio do intervalo de confiança a 95% de probabilidade (Campbell & Madden, 1990). A avaliação dos fatores quantitativos foi realizada através da análise de regressão. Todas as análises foram realizadas com o programa SAS (versão 9.1). Todos os experimentos foram executados duas vezes para avaliar a repetibilidade dos resultados.

3. RESULTADOS

3.1. Sensibilidade *in vitro* dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* aos produtos avaliados

Os isolados 2, 6, 13, 14 e 18 foram insensíveis a CAS. Os isolados 2, 4, 6, 8, 12, 19 e 21 desenvolveram-se nos meios contendo CBZ. Para os demais produtos, nenhum dos isolados avaliados apresentaram crescimento (Tabela 3).

Pode-se observar que os isolados 2 e 6 foram insensíveis ao maior número de agrotóxicos. Todos os isolados cresceram no meio controle, sem a adição de qualquer produto. Como o isolado 2 apresentou-se mais insensível a 2 dos 9 agrotóxicos testados, optou-se pela sua utilização no experimento *in vivo*.

3.2. Avaliação da eficiência dos produtos químicos para o controle da mancha foliar bacteriana

As plantas tratadas com os produtos CBZ e SDC apresentaram sintomas de fitotoxidez logo nos primeiros dias após o tratamento, nas três concentrações avaliadas. Os demais produtos apresentaram acentuada diminuição no progresso da doença, em comparação a testemunha (Figura 1). Entretanto, houve diferença entre estes quanto à eficiência. No primeiro experimento, a temperatura média foi de 24,23° C e a umidade relativa foi de 81,04%. No segundo estes valores foram de 21,13° C e 75,55%, respectivamente.

Tabela 3. Sensibilidade *in vitro* dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* aos defensivos agrícolas avaliados.

N° do Isolado	Oxitetraciclina	Estreptomicina	Casugamicina	Oxicloreto de cobre	Oxicloreto de cobre	Hidróxido de cobre	Óxido cuproso	Oxitetraciclina Sulfato de cobre	Cloreto de benzalcônio	Sulfato de cobre	Testemunha
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
13	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
14	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
18	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
19	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
21	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(+) Presença de crescimento bacteriano em todas as repetições. (-) Ausência de crescimento bacteriano em todas as repetições.

Antes da ANOVA, testou-se a normalidade do erro (Kolmogorov-Smirnov, $p=0,15$), homogeneidade de variâncias (Bartlett's, $p=0,98$) e independência na distribuição do erro. Baseado nas variáveis AACPD e $Y_{m\acute{a}x}$, detectaram-se diferenças entre os produtos e concentrações utilizadas e interação significativa entre estes fatores ($P \leq 0,05$). Quanto ao PI, houve diferenças entre os produtos, entretanto, não houve diferença entre as concentrações e assim como interação entre os fatores ($P \leq 0,05$). O modelo de Gompertz foi o que melhor se ajustou aos dados de progresso da doença, sendo a taxa de progresso obtida pela análise de regressão linear utilizando este modelo. Desta forma, avaliaram-se os produtos em cada concentração e o efeito das concentrações de cada produto foi avaliado por meio da análise de regressão utilizando-se os dados de AACPD, os quais tiveram uma alta correlação com os valores de severidade final e taxa de progresso (Tabela 4).

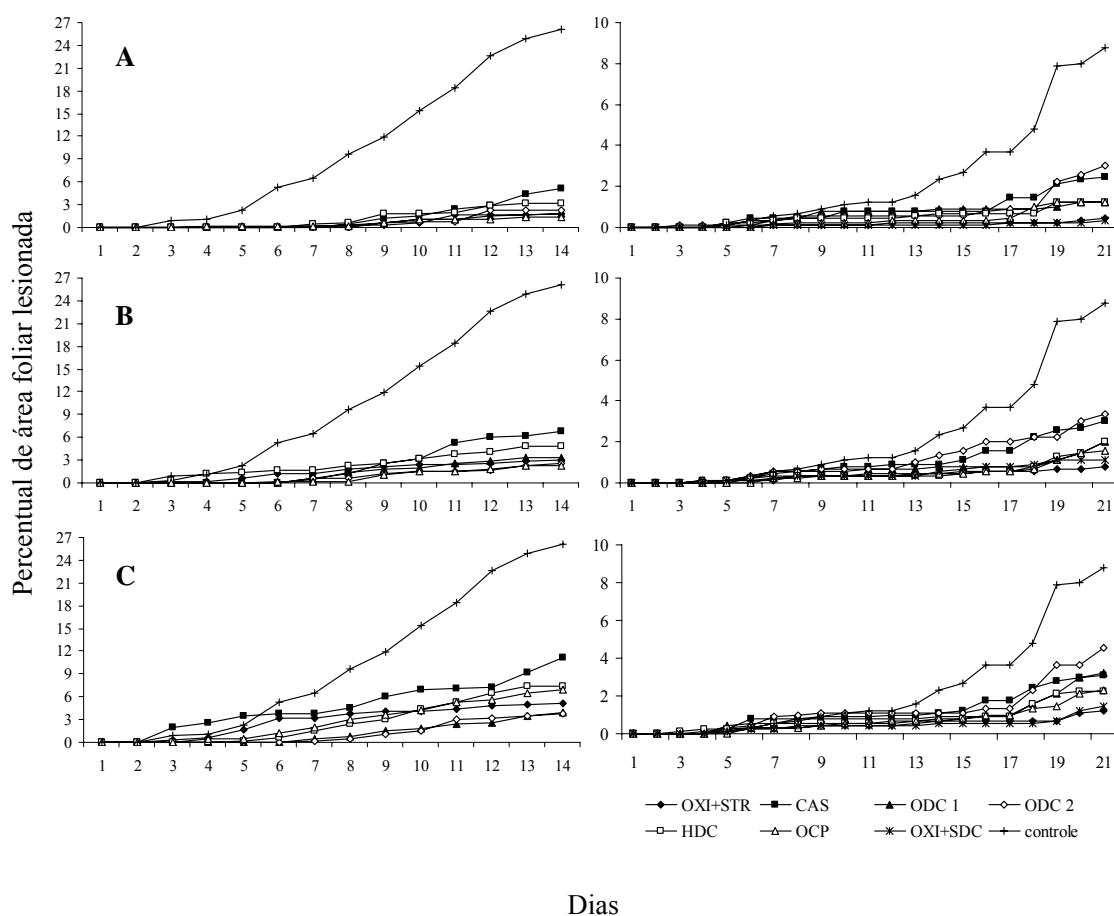


Figura 1 – Progresso da mancha foliar bacteriana em begônias tratadas com diferentes defensivos agrícolas na concentração de 1,5 vezes a recomendada (A), a recomendada (B) e metade da recomendada (C), observados no primeiro (coluna da esquerda) e segundo (coluna da direita) experimento.

Tabela 4 – Coeficientes de correlação de Pearson entre os valores das variáveis período de incubação (PI), severidade final (Ymáx), área abaixo da curva de progresso da doença e taxa de progresso da doença (r) observados nos experimentos.

	PI	Ymáx	AACPD	r
PI	1			
Ymáx	-0,0939	1		
AACPD	-0,1441	0,98865	1	
r	-0,1891	0,80316	0,8117	1

Em todas as concentrações avaliadas, todos os tratamentos diferiram da testemunha ($P \leq 0,05$), exceto no que diz respeito a PI (Tabela 5, 6 e 7). Quando as plantas foram tratadas com a metade da concentração recomendada, os melhores resultados foram obtidos com os produtos OXI+ STR, ODC1 e ODC2, e OXI+STR e OXI+SDC no primeiro e segundo experimento, respectivamente (Tabela 5). Nos tratamentos com a concentração recomendada, os melhores resultados foram obtidos com os produtos ODC2 e OCP, e OXI+STR, OCP e OXI+SDC, no primeiro e no segundo experimentos, respectivamente (Tabela 6). Nos tratamentos com 1,5 vezes a concentração recomendada, os melhores resultados foram obtidos com os produtos OXI+STR, ODC1, ODC2 e OCP, e OXI+STR e OXI+SDC, no primeiro e segundo experimento, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 5 - Resultados obtidos nos tratamentos com os diferentes produtos químicos aplicados com a metade da concentração recomendada referentes ao período de incubação (PI), severidade final ($Y_{\text{máx}}$), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e taxa de progresso da doença (r).

	Primeiro Experimento				Segundo Experimento			
	PI	$Y_{\text{máx}}$	AACPD	R	PI	$Y_{\text{máx}}$	AACPD	r
OXI+STR	6,67 ab ¹	5,07 ab	37,33 b	0,13 a ²	8,00 a	1,22 a	9,28 a	0,058a
CAS	6,67 ab	11,23 c	62,22 c	0,15 ab	5,00 ab	3,11 b	22,99 d	0,064 ab
ODC1	7,66 a	3,87 a	15,70 a	0,14 ab	6,00 ab	3,22 bc	18,16 c	0,066 ab
ODC2	8,00 a	3,80 a	14,67 a	0,14 ab	5,33 ab	4,55 c	25,05 d	0,066 ab
HDC	5,67 ab	7,33 b	35,00 b	0,15 ab	4,67 b	2,22 ab	15,10 bc	0,054 a
OCP	6,00 ab	6,90 b	35,62 b	0,15 ab	7,00 ab	2,33 ab	13,51 b	0,070 b
OXI+SDC	-	-	-	-	6,33 ab	1,45 a	11,83 ab	0,054 a
Testemunha	3,33 b	26,10 d	131,88 d	0,17 b	7,33 ab	8,78 d	45,06 e	0,095 c

¹ Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Fisher LSD ($P \leq 0,05$).

² Valores de r seguidos da mesma letra não diferem entre si, segundo o intervalo de confiança, a 95% de probabilidade, da diferença entre as estimativas do parâmetro.

Tabela 6 - Resultados obtidos nos tratamentos com os diferentes produtos químicos aplicados com a concentração recomendada referentes ao período de incubação (PI), severidade final (Y_{máx}), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e taxa de progresso da doença (r).

	Primeiro Experimento				Segundo Experimento			
	PI	Y _{máx}	AACPD	R	PI	Y _{máx}	AACPD	r
OXI+STR	5,67 ab ¹	3,03 ab	19,15 c	0,12 a ²	9,33 ab	0,78 a	6,40 a	0,058 a
CAS	7,67 a	6,77 c	28,48 d	0,16 b	5,33 b	3,00 b	19,49c	0,065 a
ODC1	7,67 a	3,33 ab	15,10 b	0,14 ab	9,00 ab	1,99 ab	11,88 b	0,064 a
ODC2	7,67 a	2,56 a	10,85 a	0,13 a	5,67 b	3,33 b	21,32 c	0,069 a
HDC	6,67 a	4,77 b	29,02 d	0,12 a	13,00 a	2,00 ab	11,57 b	0,054 a
OCP	8,00 a	2,33 a	9,2 a	0,13 a	10,00 ab	1,15 a	8,22 ab	0,063 a
OXI+SDC	-	-	-	-	9,67 ab	1,11 a	5,64 a	0,062 a
Testemunha	3,33 b	26,10 d	131,88 e	0,17 b	7,33 b	8,78 c	45,06 d	0,095 b

¹ Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Fisher LSD ($P \leq 0,05$).

² Valores de r seguidos da mesma letra não diferem entre si, segundo o intervalo de confiança, a 95% de probabilidade, da diferença entre as estimativas do parâmetro

Tabela 7 - Resultados obtidos nos tratamentos com os diferentes produtos aplicados com 1,5 vezes a concentração recomendada referentes ao período de incubação (PI), severidade final (Y_{máx}), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e taxa de progresso da doença (r).

	Primeiro Experimento				Segundo Experimento			
	PI	Y _{máx}	AACPD	R	PI	Y _{máx}	AACPD	r
OXI+STR	8,67 a ¹	1,80 a	7,4 a	0,12 a ²	6,00 ab	0,44 a	2,97 a	0,044 b
CAS	8,33 a	5,13 c	15,23 b	0,15 b	7,00 ab	2,44 b	15,33 d	0,076 c
ODC1	8,00 a	1,77 a	7,12 a	0,12 ab	6,67 ab	1,22 a	11,37 c	0,071 c
ODC2	9,67 a	2,30 ab	7,85 a	0,11 a	8,33 ab	3,00 b	14,28 d	0,066 bc
HDC	7,00 a	3,23 b	14,31 b	0,14 ab	8,33 ab	1,22 a	9,95 c	0,071 c
OCP	7,67 a	1,333 a	6,27 a	0,11 a	10,67 a	1,22 a	7,15 b	0,069 c
OXI+SDC	-	-	-	-	2,33 b	0,33 a	2,16 a	0,023 a
Testemunha	3,33 b	26,10 d	131,88 c	0,17 b	7,33 ab	8,78 c	45,06 e	0,095 d

¹ Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Fisher LSD ($P \leq 0,05$).

² Valores de r seguidos da mesma letra não diferem entre si, segundo o intervalo de confiança, a 95% de probabilidade, da diferença entre as estimativas do parâmetro

Na análise de regressão utilizando a AACPD (Figura 2), observou-se o efeito de concentração para todos os produtos avaliados com todos os parâmetros significativos (t, $P \leq 0,05$). Entretanto, em alguns tratamentos, pode-se observar ausência de efeito na

mudança do nível da concentração do produto, como nos tratamentos do segundo experimento com os produtos ODC 1 e HDC, onde pode-se observar baixos coeficientes de determinação. Como a análise de regressão foi significativa para todos os tratamentos ($f, P \leq 0,05$), a deve-se sempre optar pela maior concentração, no caso a de 1,5 vezes a recomendada.

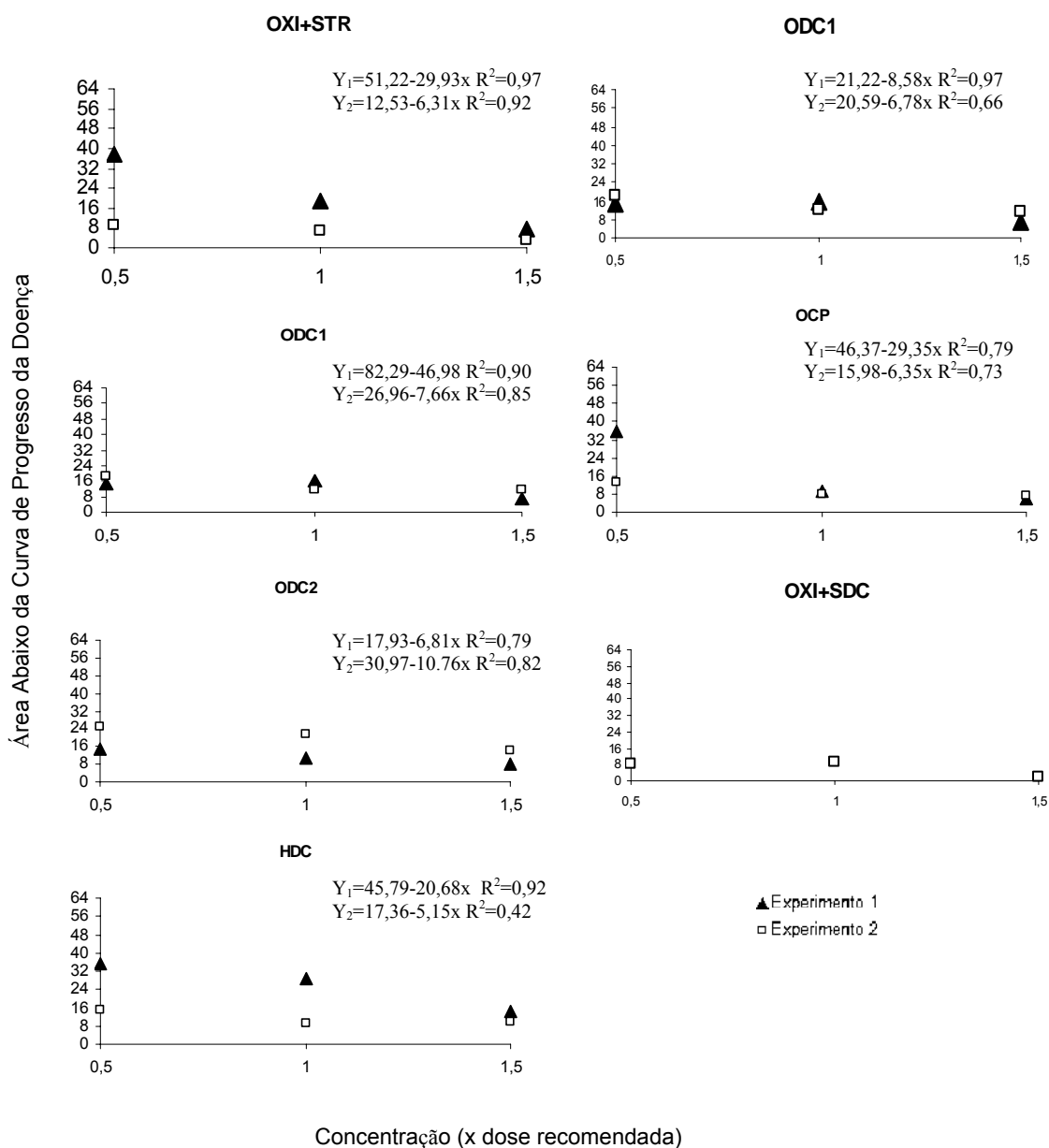


Figura 2. Valores de área abaixo da curva do progresso da doença observados nos diferentes tratamentos, nas três concentrações avaliadas. As equações foram geradas pela análise dos valores AACPD de cada produto nas concentrações de 0,5, 1,0, e 1,5 vezes a concentração recomendada. Todos os parâmetros da equação foram significativos ($p=0,05$).

4. DISCUSSÃO

Nos testes de sensibilidade *in vitro* dos isolados de *Xab* aos defensivos agrícolas avaliados, observou-se que houve crescimento bacteriano nos meios contendo CAS e CBZ e insensibilidade de todos os isolados aos demais defensivos agrícolas avaliados. A insensibilidade *in vitro* de *Xab* à produtos utilizados no controle da doença também foi observada por Harri *et al.* (1977) nos Estados Unidos, onde eles puderam observar moderada inibição do crescimento bacteriano em meio com estreptomicina e inibição do crescimento bacteriano por hidróxido de cobre. No trabalho de Fujinawa *et al.* (2008), também se observou insensibilidade de isolados de *Xab* a diversos cúpricos.

A maior severidade da doença no primeiro experimento pode ser resultado das condições de temperatura e umidade, as quais foram mais elevadas em comparação com o observado durante a execução do segundo experimento. A severidade da mancha foliar bacteriana em begônia está estreitamente relacionada às condições climáticas. Os relatos de grandes perdas ocasionadas por esta doença são observados principalmente nos períodos de temperatura mais elevada e em condições de excessiva umidade, as quais propiciam ótimo desenvolvimento da doença (Robbs, 1955, Atmatjidou *et al.*, 1991). Wehlburg (1967) observou a maior incidência da mancha foliar bacteriana no verão e descreveu que a irrigação por aspersão auxilia na disseminação do patógeno de planta a planta, levando a uma grande porcentagem de plantas inviáveis para a comercialização. Para evitar altas temperaturas, umidade excessiva e, conseqüentemente, diminuir a intensidade da doença, Wehlburg (1967) recomendou que as casas de vegetação devessem ser bem ventiladas e que as plantas fossem espaçadas umas das outras, para evitar a disseminação.

A utilização de produtos a base de CBZ e do SDC é recomendada para o controle de doenças bacterianas em diversas espécies de plantas (Andrei, 2005). Entretanto, o efeito fitotóxico pode ser um empecilho para a sua utilização, como observado em nosso estudo. Altas concentrações de CBZ afetam a permeabilidade de membranas, levando ao colapso das organelas da planta e à diminuição da atividade fotossintética, como observados por Vervliet-Scheebaum & Ritzenthaler (2008). Esta ação sobre a permeabilidade de membranas pode levar a sintomas de encharcamento, semelhantes aos observados em nosso trabalho. Doorn *et al.* (1989) não recomendaram o uso de CBZ nas flores de *Rosa* sp., pois este produto demonstrou ser fitotóxico. Já no caso do SDC o fato desta mistura ser rica em CuSO₄ pode justificar seu alto efeito fitotóxico, o

qual resultou em queima e queda das folhas em poucos dias. Rezende *et al.* (2008) observaram que o CuSO_4 apresentou maior fitotoxidez à frutos e inflorescências de goiabeira, sendo este efeito ainda mais severo que o ocasionado por outros cúpricos (HDC e ODC) e pelo CBZ.

Apesar da utilização de produtos a base CAS ser descrita como eficiente no controle de doenças bacterianas em plantas (Russo *et al.*, 2008), alguns dos isolados avaliados foram insensíveis a este produto. Theodoro & Maringoni (2000) observaram que isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* demonstraram baixa sensibilidade a este produto *in vitro*, pois a formação de halo de inibição foi observada apenas em concentrações superiores a 1000 $\mu\text{g/mL}$. Neste mesmo trabalho, CAS obteve pouca eficiência no controle do cancro bacteriano em tomateiro. Esta baixa eficiência também foi observada em nosso estudo, onde o produto a base deste químico apresentou os piores resultados.

Os fungicidas cúpricos são utilizados no controle de doenças bacterianas de plantas durante muitas décadas, e o fato de que a resistência de bactérias a estes produtos necessariamente desenvolve-se mais lentamente, pois eles possuem o modo de ação em diferentes sítios, pode explicar sua predileção como ferramenta para o controle de fitobacterioses (Cooksey, 1990).

De acordo com Strider (1975) a pulverização de hidróxido de cobre (6g/L) e sulfato de estreptomicina (2g/L) promoveu a redução da severidade da mancha foliar bacteriana em *B. elatior*. Os produtos utilizados em nosso estudo, ODC1, ODC2, HDC, OCP mostraram resultados variáveis no controle da mancha foliar bacteriana em begônias.

Avaliando-se de forma generalizada as variáveis estudadas, podemos considerar que OCP apresentou melhores resultados quanto ao controle da doença em relação aos demais cúpricos. Destes, o ODC2 demonstrou ser menos efetivo no controle da doença. Apesar do ODC1 também ter o mesmo princípio ativo, oxicloreto de cobre, a formulação do ODC2 faz necessário o uso de um espalhante adesivo para melhor cobertura do produto na folhagem (Andrei 1999; Andrei, 2005). Como para nenhum produto foi utilizado espalhante, os produtos que necessitam deste para ação adequada podem apresentar resultados insatisfatórios.

Apesar da eficácia do uso de cúpricos no controle de fitobacterioses, o uso contínuo pode selecionar populações bacterianas insensíveis ao produto (Crooksey, 1990; Mcmanus *et al.*, 2002; Beriam 2007). Esta é uma das principais hipóteses para a

diminuição da eficácia do controle dessas doenças com a utilização destes produtos observada nos últimos anos. Mirik *et al.* (2007) afirmaram que a baixa eficiência do controle químico de *Xanthomonas* pelo uso de cúpricos pode ser em decorrência de populações resistentes a estes, resultado da aplicação indiscriminada.

Os produtos OXI+STR e OXI+SDC foram os mais eficientes para o controle da doença, levando-se em consideração todas as variáveis estudadas. Apesar de existirem diversos relatos de isolados fitobacterianos com insensibilidade a componentes da formulação destes produtos ((Harri *et al.*, 1977; Crooksey, 1990; Mcmanus *et al.*, 2002), o uso combinado pode torná-los mais eficientes e dificultar a seleção de isolados resistentes. A combinação de produtos químicos pode ser eficiente no controle de fitobacterioses, como observado no estudo realizado por Alcaraz (1982), onde a combinação de sulfato de cobre (0,5%) e sulfato de estreptomicina (0,12%) possibilitou a proteção contra *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Formulações elaboradas a partir da mistura de cloridrato de oxitetraciclina e oxicloreto de cobre promoveram níveis sinérgicos de atividade antibacteriana e antifúngica contra uma ampla variedade de fitopatógenos (Alvarado, 2008).

Analisando a curva de progresso da doença, observou-se que a severidade aumentou significativamente a partir do sétimo dia após a inoculação da bactéria. Como este corresponde à 14 dias após aplicação dos produtos, pode ser necessária a reaplicação destes, não devendo o intervalo de aplicação dos produtos ser maior que 14 dias.

O estudo sobre a eficiência de produtos no controle de doenças de plantas é fundamental para a elaboração de um plano de manejo que seja capaz de minimizar as perdas ocasionadas pelos fitopatógenos. O controle de doenças bacterianas com a utilização de fungicidas e antibióticos é bastante difícil, devido a localização protegida dos patógenos (Romeiro, 2005). Entretanto, o conhecimento de produtos protetores, com efetiva atividade antimicrobiana pode servir como mais uma alternativa, devendo sempre estar associado a outras formas de controle da doença. Este conhecimento também possibilita o rodízio dos produtos a serem aplicados, o que pode evitar a ocorrência de uma pressão de seleção e, conseqüentemente, a seleção de populações bacterianas resistentes.

Observamos que o uso de defensivos agrícolas pode é útil no controle da mancha foliar bacteriana em begônias. Produtos a base de oxitetraciclina, misturados com cobre ou com antibióticos são boas opções de controle da doença. Estudos sobre a eficiência

desses produtos aplicados com espalhantes devem ser realizados, bem como a avaliação de intervalos de aplicação, de forma que o controle da mancha foliar bacteriana seja mais eficaz.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT Sistema de agrotóxicos fitossanitários
http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 13 de julho de 2009.

ALCARAZ, G.F. Control of citrus canker (*Xanthomonas citri* Hasse Dow.) on grapefruit. **Fitopatologia**, 17(1):48-53, 1982.

ALMEIDA, I.M.G.; BERIAM, L.O.S. Doenças bacterianas e controle. In: ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L. **Aspectos Fitopatológicos de Plantas Ornamentais** São Paulo: Instituto Biológico, Boletim técnico nº20,1 ed, 2007.

ALVARADO, L.M.E. (2008) Bactericidal-fungicidal composition for plants e.g. carnation, contains bacteriostatic or bacteriocidal amount of oxytetracycline hydrochloride, mycostatic or mycocidal amount of copper oxychloride, and inert particulate carrier. Patent No: US2008160059-A1 Assignee: Quimica Agronomica Mexico.

ANDREI, E. (Ed). **Compêndio de defensivos agrícolas..** São Paulo: Andrei, 6 ed, 1999. 672p.

ANDREI, E. (Ed). **Compêndio de defensivos agrícolas.** São Paulo: Andrei, 7 ed, 2005. 1141p.

ARK, P.A.; TOMPKINS, C.M. Bacteriosis of tuberous begonia. **Phytopathology**, 29:663-667, 1939.

ATMATJIDOU, V.P.; FYNN, R.P.; HOITINK, H.A. Dissemination and transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* in an ebb and flow irrigation system. **Plant Disease**, 75:1261-1265, 1991.

BERIAM, L.O.S. DOENÇAS BACTERIANAS EM HORTALIÇAS. **Biológico**, 6(2):81-84, 2007.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley & Sons, 1990.

COOKSEY, D.A. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 28: 201-219, 1990.

DAUGHTREY, M.L.; WICK, R.L.; PETERSON, J.L. **Compendium of flowering potted plant diseases**. 1.ed. Saint Paul: APS Press, 1995.

DOORN W.G.V.; WITTE Y.D.; PERIK R.R.J. Effect of antimicrobial compounds on the number of bacteria in stems of cut rose flowers. **Journal of Applied Microbiology**. 68(2):117-122, 2008.

FUJINAWA, M.F.; PONTES, N.C.; OLIVEIRA, J.R. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* a fungicidas cúpricos e antibióticos. **Tropical Plant Pathology** 33: S91, 2008.

HARRI, J.A.; LARSEN, P.O.; POWELL JR, C.C. Bacterial leaf spot and blight of *Rieger* begonia: Systemic movement of the pathogen, host range and chemical control trials. **Plant Disease Reporter**, 61(8):649-654, 1977.

JANSE, J.D. **Phytopathology: Principles and Practice**. CABI Publishing. 360 p, 2005.

KADO, C.I., HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, 60:969-976, 1970.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. **Phytopathology**, 44:693-695, 1954.

KIRÁLY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYOSKY, E.; VOROS, J. **Methodos in plant pathology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1970. 509p.

KLEMENT, Z. Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonas. **Nature**, 199:209-300, 1964.

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

MCMANUS, P.S.; Stockwell, V.O.; Sundin, G.W.; Jones A.L. Antibiotic use in plant agriculture. **Annual Review of Phytopathology**. 40: 443-465, 2002.

MIRIK, M.; AYSAN Y.; CINAR O. Copper-resistant strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye in the eastern Mediterranean region of Turkey. **Journal of Plant Pathology**, 89(1):153-154, 2007.

NICHOLS, L.P.; JODON, M.H.; SCARBOROUGH, B. Longevity of *Xanthomonas begoniae*, the cause of bacterial leafspot on *Rieger* begonias. **Plant disease reporter**, 58(9):814. 1974.

NUTTER JR., F.W.; LITWILLER, D. A computer program to generate standard area diagrams to aid raters in assessing disease severity. **Phytopathology**, 88: S117, 1998.

QUALING, C. Preservation of *Xanthomonas* by freezing in glycerol broth. **Canadian Journal of Microbiology**, 6:475, 1960.

REZENDE, A.M.F.A.; TOMITA, C.K.; UESUGI, C.H. Fungicidas cúpricos, cloretos de benzalcônio e composto bioativo líquido (Bokashi): fitotoxicidade e controle da seca dos ponteiros causada por *Erwinia psidii* em goiabeiras. **Tropical plant pathology**, 33(4):288-294, 2008.

ROBBS, C.F. Algumas bactérias fitopatogênicas do Distrito Federal. **Agronomia**, Rio de Janeiro, 14(2):147-164, 1955.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Editora UFV, 2 ed, 2005. 417p

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279p.

RUSSO, N.L.; BURR, T.J.; BRETH, D.I.; ALDWINCKLE, H.S. Isolation of streptomycinresistant isolates of *Erwinia amylovora* in New York. **Plant Disease**, 92:714-718, 2008.

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul:American Phytopathological Society Press, 3 ed, 2001. 373p.

STRIDER, D.L. Chemical control of bacterial blight of *Rieger elatior* begonias caused by *Xanthomonas begoniae*. **Plant Disease Reporter**, 59:66-70, 1975.

SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. *Xanthomonas*. London: Capman & Hall, 1993. 399p.

THEODORO, G.F.; MARINGONI, A.C. Ação de produtos químicos *in vitro* e *in vivo* sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal do cancro bacteriano do tomateiro. **Scientia Agricola**, 57(3):439-443, 2000.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239p.

VERVLIET-SCHEEBAUM, M.R.; RITZENTHALER, E.T. Short-term effects of benzalkonium chloride and atrazine on *Elodea canadensis* using a miniaturised microbioreactor system for an online monitoring of physiologic parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 69(2): 254-262, 2008.

WEHLBURG, C. Bacterial leaf spot of begonia. **Plant Pathology**, Florida Department of Agriculture, 62, 1967.

CONCLUSÕES GERAIS

Os isolados de *Xab* não apresentam relações da variabilidade encontrada com a origem geográfica do isolado.

O uso de defensivos agrícolas pode ser útil no controle da mancha foliar bacteriana em begônias. Os produtos oxitetraciclina+estreptomicina e oxitetraciclina+sulfato de cobre foram os que proporcionaram os melhores controles. Os produtos, oxiclreto de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso proporcionaram controle intermediário e a casugamicina foi o que apresentou o menor controle da doença. Os produtos cloreto de benzalcônio de sulfato de cobre foram fitotóxicos para begônia.

APÊNDICE

Protocolos dos testes bioquímicos realizados.

Reação de Gram com base na solubilidade em KOH (Ryu, 1940; Suslow *et al.*, 1982): Transferiu-se com o auxílio de uma alça de repicagem uma pequena quantidade de colônias bacterianas, cultivados em meio 523 sólido, para uma lâmina de microscopia, contendo uma gota de solução de KOH a 3%. O material foi homogeneizado por 10 segundos. Quando a preparação torna-se viscosa a bactéria é considerada Gram-negativa.

Produção de catalase (Klement *et al.* 1990): As colônias bacterianas cultivados em meio 523 sólido foram transferidas para uma lâmina de microscopia contendo uma gota de solução de peróxido de hidrogênio a 3%. O resultado é considerado positivo quando há produção de bolhas de gás na preparação, o que indica a produção da catalase pela bactéria.

Produção de oxidase (Schaad, 1988; Schaad *et al.*, 2001): As colônias bacterianas cultivados no meio 523 sólido foram friccionadas em tiras de papel filtro estéreis embebidas em solução de tetrametil parafenildiamino dihidroclorato a 1%, com auxílio de um bastão de vidro. No caso de resultado positivo para o teste, o papel mudará da cor branca para roxa, em um intervalo de 10 segundos e para o resultado negativo, o papel irá continuar na cor branca após 60 segundos.

Atividade nucleação do gelo (Fahy & Hayward, 1983): Preparou-se o meio sólido contendo os seguintes ingredientes: extrato de levedura (5g), peptona (5g), glucose (5g), ágar (15g) e H₂O destilada (1000ml), posteriormente adicionou-se 5 ml deste meio em tubos de ensaio, sendo em seguida submetido a autoclavagem a 121°C e 51lb de pressão por 20 minutos. Os isolados foram cultivados por 48 horas a 28°C e suspensos em água bidestilada em tubos com tampa de rosca. Posteriormente, esses tubos foram imersos em uma solução salina a 11,2% e colocados no congelador a -4°C. Para o resultado positivo observa-se o congelamento da suspensão após 5 min. Para o controle positivo utilizou-se um isolado de *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (ISBSF 579) e para o controle negativo foram utilizados tubos de ensaio contendo somente água destilada.

Utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio (Starr & Weiss, 1943): Preparou-se o meio líquido contendo os seguintes ingredientes: K₂HPO₄ (1g), KCl (0,2g), MgSO₄.7H₂O (0,2g), e H₂O destilada (1000ml), o pH foi ajustado para

6,4 e adicionou-se 4,5 ml do meio em cada tubo de ensaio, sendo em seguida submetido a autoclavagem a 121°C e 51lb de pressão por 20 minutos. Após a autoclavagem adicionou-se em cada tubo de ensaio 0,5ml de uma solução aquosa de asparagina a 5% esterilizada por filtração. As bactérias foram repicadas e incubadas por até 6 dias a 28°C. Para a testemunha utilizou-se um tubo de ensaio contendo meio sem ser semeado. A turbidez do meio indica a utilização da asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio.

Hidrólise da esculina (Schaad, 1988): Em meio líquido contendo seguintes ingredientes: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,5g), K_2HPO_4 (0,5g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2g), NaCl (5g), esculina (1g) e H_2O destilada (1000ml), com pH ajustado para 6,8. Foram colocadas 5 ml em cada tubo de ensaio e autoclavados a 121°C e 51lb de pressão por 20 minutos. Os isolados foram cultivados na BOD a 28°C por até 28 dias. Nos tubos onde ocorreu a hidrólise observa-se a mudança de coloração do meio para uma coloração marrom escura e também a perda da fluorescência quando observada na luz ultravioleta.

Liquefação da gelatina (Fahy & Hayward, 1983): Com auxílio de uma alça de platina aberta, repicaram as colônias em tubos de ensaio com meio contendo os seguintes ingredientes: extrato de levedura (3g), peptona (5g), gelatina (120g) e H_2O destilada (1000ml). Para o controle foi utilizado um tubo de ensaio contendo o meio sem ter sido semeado. Foram incubados a 28°C e avaliados após 3, 7 e 21 dias após o semeio. Para a avaliação, os tubos são colocados em geladeira por 30 minutos. Os tubos contendo isolados capazes de digerir a gelatina apresentaram o meio liquefeito após o período em refrigeração, sendo considerado resultado positivo.

Digestão de proteína (Fahy & Hayward, 1983): Os isolados de *Xab* foram repicados com auxílio de uma alça de platina aberta, para tubos de ensaio contendo 5 ml de meio líquido, composto de leite em pó desnatado (10g), púrpuro de bromocresol (0,04g) e água destilada (1000ml). Os tubos foram incubados a 28°C e avaliados no período de 7 dias. Se a bactéria possuir atividade de protease, observas-se o meio de cultura dividido em 2 fases (soro e o coágulo), obtendo o resultado positivo.

Produção de H_2S a partir de peptona (Schaad *et al.*, 2001): Os isolados de *Xab* foram repicados para tubos contendo 5 ml do meio composto por K_2HPO_4 (0,5g), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2g), NaCl (5g), extrato de levedura (5g) peptona (0,5g) e H_2O destilada (1000ml). Posteriormente, tiras de papel filtro previamente esterilizadas e umedecidas em uma solução de acetato de chumbo a 10% foram fixadas nos tubos a

2cm acima do meio, afixadas juntamente com o tampão de algodão que os vedava. Estes tubos foram incubados a 28°C e por até 14 dias. A produção de H₂S a partir da peptona é indicada pelo escurecimento do papel.

Hidrólise do amido (Fahy & Hayward, 1983): Para verificar se a *Xab* produz a enzima amilase, sendo capaz de digerir o amido, os isolados foram cultivados em placas de petri contendo o meio YNA contendo os seguintes ingredientes: extrato de levedura (5g), peptona (5g), extrato de carne (5g), amido (2g), ágar (17g) e H₂O destilada (1000ml). Foram incubados por 5 dias a 28°C e após o crescimento colocou-se uma solução de lugol (0,8g de iodo e 2g de KI em 100ml de água destilada) sobre os meios e se a bactéria foi capaz de digerir o amido, verifica-se uma descoloração em torno da colônia em contraste com o restante do meio que estará com uma coloração roxo-escuro.

Formação de levana (Fahy & Hayward, 1983; Schaad, 1988): Para verificar se a *Xab* é capaz de utilizar a sacarose como fonte de carbono e produzir a enzima levana sucrose para produção de levana, as bactérias foram semeadas em placas de petri contendo meio nutriente ágar com a seguinte composição: extrato de carne (3g), peptona (5g), sacarose (50g), ágar (15g) e H₂O destilada (1000ml) e o pH ajustado para 7,0. Semeados em zigzague e incubados a 28°C por 5 dias. O resultado é positivo se for encontrada colônias bacterianas convexas e mucóides.

Crescimento a 35°C (Fahy & Hayward, 1983): Os isolados de *Xab* foram semeados em meio 523 líquido e mantidos num aparelho denominado, Marconi incubadora refrigerada MA 830, sob a velocidade de agitação 150rpm e a temperatura ajustada a 35°C e a avaliação foi realizada após 48h após a inoculação. Foi utilizado um tubo sem que tenha sido feito o semeio como controle. O resultado positivo para desse teste observa-se a formação leitosa (turbidez).

Aerobiose (Ruangrungrrote *et al.*, 2008): Os isolados de *Xab* foram semeados em placas de petri contendo meio 523 sólido de e colocados na jarra de anaerobiose contendo o kit anaerocult. A avaliação foi realizada 48h após o semeio.

Produção de ácidos a partir de diversas fontes de açúcar (Dye, 1968): Para esse teste, foram testados as seguintes fontes de açúcar: adonitol, arabinose, celobiose, dulcitol, frutose, galactose, glicerol, glucose, inositol, inulina, lactose, maltose, manitol, manose, melibiose, rafinose, ranmose, salicina, sorbitol, sucrose trealose e xilose, para verificar quais, seriam utilizadas como fonte de carbono pelos isolados de *Xab*. Para

isto, foi preparado o meio C (Dye, 1968) líquido, contendo a seguinte composição: K_2HPO_4 (0,5g), $NH_4H_2PO_4$ (0,5g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2g), NaCl (5g), extrato de levedura (1g), H_2O destilada (1000ml). Foi preparada uma solução de azul de bromocresol a 1,5% em etanol, da qual 0,7mL foi adicionada aos 1000ml do meio de Dye e em seguida ajustou-se o pH do meio para 6,8. Após isto, adicionou-se 4,5 ml do meio em cada tubo de ensaio, que em seguida foram autoclavados. Após o resfriamento do meio, em condições assépticas, 0,5mL de cada fonte de carbono que foram previamente esterilizadas por tindalização em autoclave com a válvula aberta por 30 minutos, durante três dias consecutivos, foi adicionado aos tubos, com auxílio de uma micropipeta. Posteriormente, procedeu-se a repicagem de casa isolado de *Xab* para os tubos. Como controle tubos sem a bactéria, contendo cada tipo de fonte de carbono foram mantidas sob a mesmas condições como controle. A avaliação foi realizada durante 28 dias após a inoculação. A coloração amarela do meio caracteriza um resultado positivo caracterizando a produção de ácidos.

Avaliação de diferentes concentrações de NaCl (Fahy & Hayward, 1983) : Em tubos de ensaio foi adicionado 5ml de meio Ys, composto por $NH_4H_2PO_4$ (0,5g), K_2HPO_4 (0,5g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2g), extrato de levedura (5g), peptona (0,5g) e H_2O destilada (1000 ml) foram adicionados diferentes concentrações de NaCl (3%, 4% e 5%). Posteriormente as bactérias foram semeadas e avaliou-se o crescimento bacteriano durante 14 dias.

Crescimento a diferentes concentrações de TTC (Kelman, 1954): em meio de Kelman composto por peptona (10g), caseína hidrolisada (1g), glicose (5g), ágar (15g) e H_2O destilada (1000 ml) adicionou-se em meio fundente as concentrações de 0,01%; 0,02%; 0,03%; 0,04% de 2,3, 5- cloreto de trifetil tetrazólio (T.T.C.). Os isolados bacterianos foram semeados em meio 523 líquido e repicados para o meio Kelman com diferentes concentrações de (T.T.C.) e posteriormente colocados na incubadora. As avaliações foram realizadas após 72 horas.