



**Universidade de Brasília- UnB  
Instituto de Ciências Biológicas- IB  
Departamento de Fitopatologia- FIT  
Mestrado em Fitopatologia**

**Estudo sobre a resistência genética e produtos químicos no  
controle da bacteriose da goiabeira (*Psidium guajava*) causada  
por *Erwinia psidii***

**Adriana Magali de F.A. Rezende**

**Brasília- DF  
Abril 2006**

Estudo sobre a resistência genética e produtos químicos no controle da bacteriose da goiabeira (*Psidium guajava*) causada por *Erwinia psidii*

Adriana Magali de F.A. Rezende

Orientador: Dr. Carlos Hidemi Uesugi

Dissertação apresentada ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Fitopatologia.

Brasília-DF  
Abril 2006

**Trabalho apresentado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do Professor Carlos Hidemi Uesugi, com apoio da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**

**ESTUDO SOBRE A RESISTÊNCIA GENÉTICA E PRODUTOS QUÍMICOS NO  
CONTROLE DA BACTERIOSE DA GOIABEIRA (*Psidium guajava*) CAUSADA POR  
*Erwinia psidii***

ADRIANA MAGALI DE F.A. REZENDE

Aprovado por:

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Carlos Hidemi Uesugi  
Universidade de Brasília-UnB  
Orientador

---

Dra. Abi Soares dos Anjos Marques  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Marisa A. S. Velloso Ferreira  
Universidade de Brasília

**Aos meus pais Antônio e Ana**  
**Aos meus irmãos Antônio Jr. e Ana Cristina**  
**A meu esposo Ícaro**  
**Com todo amor**  
**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua maravilhosa graça e misericórdia. Por me conceder esta imensa vitória que permitiu o meu ingresso neste curso e dando-me condições necessárias para que eu concluísse, mesmo quando os obstáculos mostraram intransponíveis. A Ele toda honra e glória.

Ao meu orientador, Professor Carlos Hidemi Uesugi, pela atenção, pelos ensinamentos valiosos, pela paciência, por estar sempre presente e auxiliando todas as etapas deste trabalho.

À professora Marisa A.S.V. Ferreira e a Dra. Abi S.A. Marques, pela disponibilidade em participar da Banca Examinadora.

Ao Sr. Bunkiti Kimura, por ter cedido parte da propriedade, para a realização do experimento.

Ao Tomita, pela dedicação e ensinamentos e por ter contribuído para realização desta pesquisa.

À Empresa PRTrade, pela disponibilização do produto químico (Fegatex).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Aos funcionários do laboratório e da Estação experimental, pela amizade e colaboração.

À todos amigos que fiz nestes dois anos de curso, em especial à Andreza, Rita, Marlos, Ana Cristina, Débora, Mariana, Loise e Reinaldo.

À minha grande amiga Ednalva, pela inabalável amizade nos momentos de tristezas e alegrias, e pelo importantíssimo auxílio na realização das análises estatísticas.

Agradeço também a todos aqueles que não mencionei, mas que de uma forma ou de outra contribuíram para realização deste trabalho.

Aos meus sogros Valdivino e Aparecida, pelo carinho, compreensão e incentivo durante esta etapa da minha vida.

Aos meus pais Antônio e Ana, razão da minha existência, pelo apoio, o amor e o carinho, graças a vocês consegui cumprir mais uma conquista em minha vida. Aos meus irmãos Antônio Júnior e Ana Cristina, pela confiança em mim depositados. À Ana Beatriz e Isís Vitória, minhas sobrinhas, que representam um novo sentido para minha vida.

Finalmente agradeço à Deus pelo meu esposo, pelo companheirismo de jornada, compartilhando as alegrias e frustrações, pelo grande amor, pela compreensão e paciência nos momentos de desesperos, me incentivando a seguir em frente e acima de tudo por fazer parte dessa grande conquista.

## SUMÁRIO

	Página
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1- A cultura da goiaba.....	1
1.2- Importância da cultura.....	2
1.3- Problemas da cultura.....	4
1.4- A Bacteriose ou Seca dos Ponteiros.....	5
1.4.1- Distribuição geográfica.....	5
1.4.2- Etiologia.....	7
1.4.3- Sintomatologia.....	9
1.4.4- Epidemiologia.....	11
1.4.5- Controle.....	12
<b>2-OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1- Coletas de material infectado no campo e isolamento.....	15
3.2.- Isolados utilizados.....	16
3.3- Cultivo e Preservação dos isolados.....	17
3.4- Preparo da suspensão bacteriana para inoculação.....	17
3.5-Testes bioquímicos e fisiológicos.....	17
3.5.1-Oxidação/ Fermentação da glicose.....	17
3.5.2 Catalase .....	18
3.5.3- Oxidase.....	18
3.5.4- Teste de Podridão mole.....	18
3.5.5- Hipersensibilidade em folhas de fumo.....	18
3.6- Resistência genética de variedades de goiaba ( <i>Psidium guajava</i> ) à seca dos ponteiros causada por <i>Erwinia psidii</i> .....	19
3.6.1- Plantio e Variedades utilizadas.....	19
3.6.2- Inoculações.....	19

3.6.3- Avaliação.....	20
3.7- Sensibilidade de <i>Erwinia psidii</i> “ <i>in vitro</i> ” a diferentes formulações cúpricas e aos cloretos de benzalcônio.....	20
3.7.1- Meios de cultura e produtos utilizados.....	20
3.7.2- Plaqueamento.....	21
3.7.3- Avaliação.....	21
3.8- Sensibilidade de <i>Erwinia psidii</i> “ <i>in vitro</i> ” a diferentes tipos de antibióticos.....	21
3.8.1- Antibiose.....	21
3.8.2- Plaqueamento.....	22
3.8.3- Avaliação.....	23
3.9- Estudo do efeito de formulações de fungicidas cúpricos e de cloretos de benzalcônio, na incidência de <i>Erwinia psidii</i> e expressão de sintomas de fitotoxicidade em goiaba ( <i>Psidium guajava</i> ), em casa de vegetação.....	23
3.9.1- Inoculação e Pulverização.....	24
3.9.2- Avaliação.....	24
3.10- Estudo do efeito de formulações de fungicidas cúpricos e o de cloretos de benzalcônio, na incidência de <i>Erwinia psidii</i> e expressão de sintomas de fitotoxicidade em goiaba ( <i>Psidium guajava</i> ), no campo.....	25
3.10.1- Avaliação.....	26
<b>4-RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
4.1- Testes bioquímicos e fisiológicos.....	27
4.2- Resistência genética de variedades de goiaba ( <i>Psidium guajava</i> ) à seca dos ponteiros causada por <i>Erwinia psidii</i> .....	28
4.3- Sensibilidade de <i>Erwinia psidii</i> “ <i>in vitro</i> ” a diferentes formulações cúpricas e aos cloretos de benzalcônio.....	33
4.4- Sensibilidade de <i>Erwinia psidii</i> “ <i>in vitro</i> ” a diferentes tipos de antibióticos.....	44
4.5- Estudo do efeito de formulações de fungicidas cúpricos e de cloretos de benzalcônio, na incidência de <i>Erwinia psidii</i> e expressão de sintomas de fitotoxicidade em goiaba ( <i>Psidium guajava</i> ), em casa de vegetação.....	47

4.6- Estudo do efeito de formulações de fungicidas cúpricos e de cloretos de benzalcônio, na incidência de <i>Erwinia psidii</i> e expressão de sintomas de fitotoxicidade em goiaba ( <i>Psidium guajava</i> ) no campo.....	52
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>
<b>8- ANEXOS.....</b>	<b>82</b>
8.1- Caracterização bioquímica.....	83
8.2- Meios de cultura utilizados.....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

<b>Figura 1.</b> Distribuição geográfica da seca dos ponteiros da goiabeira. Modificado de Coelho <i>et al.</i> (2002a).....	6
<b>Figura 2.</b> Colônias de <i>Erwinia psidii</i> em meio 523 modificado de Kado & Heskett, após 48 horas.....	8
<b>Figura 3.</b> Sintomas de <i>Erwinia psidii</i> em plantas de goiabeira: (A)-Primórdio foliar infectado; (B)-Folhas com sintomas iniciando pela nervura central; (C)- Haste apresentando epiderme enegrecida; (D)-Frutos jovens apresentando aspecto “mumificado”; (E)-Botões florais e frutos jovens com sintomas de infecção; (F)- Ramo de goiabeira apresentando sintoma de seca.....	10
<b>Figura 4.</b> Esquema explicativo do procedimento para execução do teste de antibiose com discos de papel filtro. Modificado de Romeiro (1996).....	23
<b>Figura 5.</b> Escala de notas atribuídas para os sintomas de <i>Erwinia psidii</i> , nos 15 cm finais do ramo de brotação, em plantas de goiaba: (A) nota 0= sem sintomas; (B) nota 1= 0,1% a 25% de área lesionada; (C) nota 2= 25,1% a 50% de área lesionada; (D) nota 3= 50,1% a 75% de área lesionada; (E) nota 4= 75,1% a 100% de área lesionada .....	30
<b>Figura 6.</b> Concentração mínima inibitória (CMI) de Sulfato de cobre, em diferentes meios: (a) meio 523; (b) meio MMCC.....	35
<b>Figura 7.</b> Concentração mínima inibitória (CMI) de Oxiclreto de cobre, em diferentes meios: (a) meio 523; (b) meio MMCC.....	37
<b>Figura 8.</b> Concentração mínima inibitória (CMI) de Hidróxido de cobre, em diferentes meios: (a) meio 523; (b) meio MMCC.....	38
<b>Figura 9.</b> Concentração mínima inibitória (CMI) de Cloretos de benzalcônio, em diferentes meios: (a) meio 523; (b) meio MMCC.....	40
<b>Figura 10.</b> Níveis de tolerância, no meio 523, nos diferentes isolados: (a) UnB 1285; (b) UnB 1286; (c) UnB 1287; (d) UnB 1288; (e) UnB 1289.....	42
<b>Figura 11.</b> Níveis de tolerância, no meio MMCC, nos diferentes isolados: (a) UnB 1285; (b) UnB 1286; (c) UnB 1287; (d) UnB 1288; (e) UnB 1289.....	43

- Figura 12.** Halos de inibição dos antibióticos, do isolado UnB 1286: Cloranfenicol 3,42 cm; Ampicilina 3,80 cm; Gentamicina 1,05 cm e Oxacilina sem efeito.....44
- Figura 13.** Sintomas de *Erwinia psidii*, em plantas de goiaba, em diferentes tratamentos: (A) controle; (B) hidróxido de cobre; (C) oxiclreto de cobre; (D) cloretos de benzalcônio; (E) sulfato de cobre.....49
- Figura 14.** Eficiência de diferentes formulações de fungicidas na incidência de bacteriose causada por *Erwinia psidii*, em diferentes variedades: (a) Comum; (b) Pedro Sato; (c) Ogawa; (d) Bicudo; (e) Paluma.....51
- Figura 15.** Sintomas de fitotoxidez em frutos, ocasionado por diferentes fungicidas: (A) controle; (B) cloretos de benzalcônio; (C) oxiclreto de cobre; (D) hidróxido de cobre; (E) sulfato de cobre.....59

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Origem dos isolados de <i>Erwinia psidii</i> utilizados no presente trabalho .....	16
<b>Tabela 2.</b> Antibióticos utilizados na realização do teste de sensibilidade de <i>Erwinia psidii</i> .....	22
<b>Tabela 3.</b> Tratamentos, nome comercial, concentrações utilizadas e doses recomendadas na determinação da fitotoxicidade e controle de <i>Erwinia psidii</i> , em casa de vegetação.....	24
<b>Tabela 4.</b> Tratamentos, nome comercial, concentrações utilizadas e doses recomendadas na determinação da fitotoxicidade controle de <i>Erwinia psidii</i> , no campo.....	26
<b>Tabela 5.</b> Caracterização bioquímica, reação de hipersensibilidade e teste de podridão mole dos isolados de <i>Erwinia psidii</i> , procedentes de diferentes localidades.....	27
<b>Tabela 6.</b> Níveis de incidência da bacteriose em variedades de goiabeira, inoculadas com diferentes isolados de <i>Erwinia psidii</i> , por dois métodos de inoculação.....	31
<b>Tabela 7.</b> Sensibilidade de isolados de <i>Erwinia psidii</i> à ação de diferentes antibióticos.....	45
<b>Tabela 8.</b> Valores médios do raio do halo de inibição (cm) dos antibióticos, em diferentes isolados de <i>Erwinia psidii</i> .....	46
<b>Tabela 9.</b> Médias do desenvolvimento das brotações (cm) pelo efeito da fitotoxicidade de diferentes formulações, em diferentes variedades de goiaba, 29 dias após a poda.....	47
<b>Tabela 10.</b> Efeito de diferentes formulações de fungicidas, na avaliação da incidência de <i>Erwinia psidii</i> , em plantas de goiaba, em casa de vegetação.....	48
<b>Tabela 11.</b> Avaliação da incidência de <i>Erwinia psidii</i> , em diferentes variedades de goiaba, em casa de vegetação.....	52
<b>Tabela 12.</b> Efeito de diferentes formulações de fungicidas na expressão de sintomas de fitotoxicidade em frutos de diferentes tamanhos de goiabeira, variedade Pedro Sato, em condição de campo.....	54

<b>Tabela 13.</b> Efeito de diferentes formulações de fungicidas na expressão de sintomas de fitotoxicidade em frutos de diferentes tamanhos de goiabeira, variedade Comum, em condição de campo.....	56
<b>Tabela 14.</b> Efeito de diferentes formulações de fungicidas no controle da bacteriose causada por <i>Erwinia psidii</i> em ramos de frutificação de goiabeira em condição de campo, expresso em percentagem de ramos com sintomas.....	60

## RESUMO

A bacteriose da goiabeira (*Psidium guajava*) causada por *Erwinia psidii* Rodrigues Neto *et al.* (1987) foi identificada pela primeira vez no Brasil em 1982, nas regiões de Valinhos e Pindamonhangaba, no Estado de São Paulo. Atualmente a doença se encontra em outras regiões paulistas, nos Estados de Minas Gerais, no Espírito Santo, no Paraná e no Distrito Federal. Devido à sua distribuição geográfica restrita ao Brasil, pouco se conhece sobre um controle efetivo da bacteriose, visto que a maioria dos produtos cúpricos utilizados causam sintomas de fitotoxicidade nas plantas, assim como não se têm conhecimento do uso de variedades resistentes. O presente trabalho teve como objetivo estudar a resistência genética das variedades de goiaba comumente plantadas, assim como a utilização de produtos químicos no controle.

No estudo da resistência genética foram avaliadas cinco variedades de goiaba e diferentes isolados de *E. psidii*, em dois métodos de inoculação: por pulverização ( $1 \times 10^8$  ufc/ml) e por agulha ( $1 \times 10^9$  ufc/ml). No estudo do controle da doença foram utilizados produtos cúpricos e o Fegatex (cloretos de benzalcônio), nos meios 523 e MMCC, em testes “*in vitro*”, em casa de vegetação e no campo. Foi também avaliada a sensibilidade de isolados de *E. psidii* a diferentes antibióticos.

Verificou-se que na inoculação por agulha, dos isolados UnB 1285, 1288 e 1289, todas as variedades apresentaram 100% de plantas infectadas nas hastes, folhas e brotações (nota 4); enquanto que na inoculação por pulverização, os isolados UnB 1287 e 1288, apresentaram essa mesma percentagem de plantas infectadas, podendo ocorrer diferenças nos graus de agressividade entre os isolados.

Em testes “*in vitro*” verificou-se que todos isolados de *E. psidii* no meio 523 foram mais resistentes ao sulfato de cobre e hidróxido de cobre, enquanto que no meio MMCC (baixa capacidade de complexar o cobre) todos os isolados apresentaram maior resistência ao hidróxido de cobre. Resultados também mostraram que os cloretos de benzalcônio mostraram melhor eficiência no controle “*in vitro*” comparado aos produtos cúpricos.

Na avaliação dos antibióticos verificou-se que os isolados UnB 1285 e 1286 mostraram ser mais sensíveis à ação dos antibióticos. O princípio ativo oxacilina não apresentou efeito sobre a bactéria, para todos isolados testados.

Sob condição de casa de vegetação, o sulfato de cobre mostrou maior grau de fitotoxicidade nas folhas de goiabeira, reduzindo o desenvolvimento das brotações, no entanto, mostrou melhor eficiência no controle da bacteriose. O tratamento com cloretos de benzalcônio, não apresentou fitotoxicidade e mostrou bom desenvolvimento nas plantas, assim como bom controle da doença.

Em experimento de campo, verificou-se sintomas leves de fitotoxicidade no estágio de inflorescência, na variedade Pedro Sato, com todos os produtos, e na variedade Comum, com exceção dos cloretos de benzalcônio. Nos frutos pequenos, os sintomas severos foram percebidos na variedade Pedro Sato, no tratamento com sulfato de cobre e na variedade Comum, no tratamento com sulfato de cobre e oxiclreto de cobre. Nos frutos médios, foi verificada evolução dos sintomas severos, na variedade Pedro Sato, nos tratamentos com oxiclreto de cobre e sulfato de cobre; e na variedade Comum em todos os tratamentos cúpricos. Para o controle da doença, o tratamento com hidróxido de cobre mostrou melhor eficiência na variedade Pedro Sato; enquanto que na variedade Comum, o tratamento com Fegatex (cloretos de benzalcônios) foi melhor, não apresentando nenhum sintoma de fitotoxicidade.

## ABSTRACT

The bacterial disease of the guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* Rodrigues neto *et al.* (1987) was identified first time in Brazil in 1982, in the regions of Valinhos and Pindamonhangaba, in the State of São Paulo. Actually the disease is found in other regions of São Paulo, and the States of Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná and in the Federal District. Due to their geographical distribution restricted to the Brazil, little is known about an effective control of the disease; seen that the majority of the copper products utilized cause symptoms of phytotoxicity in the plants; as well as do not have knowledge of the use of resistant variety. The present work had the objective to study the genetic resistance of guava variety frequently planted, as well as the utilization of chemical products in the control.

In the study of the genetic resistance were studied five varieties of guava and different strains of *E. psidii*, in two methods of inoculation: by spraying ( $1 \times 10^8$  ufc/ml) and by needle ( $1 \times 10^9$  ufc/ml). In the study of the control of the disease were utilized copper products and the Fegatex (benzalconium chlorides), in the media, 523 and MMCC, in “in vitro” tests, in greenhouse and in the field. Also was evaluated the sensibility of strains of *E. psidii* to different antibiotic.

The inoculation by needle of strains UnB 1285, 1288 and 1289 it was verified that all variety presented 100% of plants infected in the twig, leaves and budding (note 4); whereas in the inoculation by spraying, the strains UnB 1287 and 1288 presented that same percentage to plant infected, being able to occur differences in the level of virulence of the strains.

In the “in vitro” tests it was verified that all of the stains of *E. psidii* in the medium 523 were more resistant to the copper sulfate and copper hydroxide, whereas in the medium MMCC (Medium Minimal Complexing Copper) all the strains presented more resistance to the copper hydroxide. Results also showed that the fegatex (benzalconium chlorides) presented better efficiency in the control “in vitro” compared to the copper products.

The evaluation of the antibiotics was variable and the strains UnB 1285 and 1286 showed to be more sensible. The oxacilin, did not present effect on the bacteria, for all strains studied.

Under greenhouse conditions, the copper sulfate showed more phytotoxicity in the leaves of guava, reducing the development of the budding, however showed better efficiency in the control of the bacteria. The treatment with fegatex (benzalconium clorides), did not present phytotoxicity and showed good development of the plants, as well as good control of the disease.

In the field condition it was verified light symptoms of phytotoxicity in the stadium of inflorescence, in the variety Pedro Sato, with all of the products and in the Comum variety, with the exception of the benzalconium clorides. In the small fruits, the severe symptoms were perceived in the variety Pedro Sato, in the treatment with copper sulfate and in the Common variety, in the treatment with copper sulfate and copper oxycloride. In the medium fruits, it was verified evolution of the severe symptoms, in the variety Pedro Sato, in the treatment with copper oxycloride and copper sulfate; and in the Common variety in all of the copper treatments. For the control of the disease, the treatment with copper hydroxide showed better efficiency in the variety Pedro Sato; whereas in the Common variety, the treatment with fegatex (benzalconum clorides) was better, presenting no symptom of phytotoxicity.

# 1-INTRODUÇÃO

## 1.1- A cultura da goiaba

A goiabeira (*Psidium guajava*, Lin.) pertence à família Myrtaceae (Medina, 1991), considerada a espécie mais importante dentro do gênero *Psidium* onde estão agrupadas mais de 150 espécies (Manica *et al.*, 2000). É a frutífera mais comum no país, pois cresce espontaneamente em terrenos baldios, pastos, beiradas de estradas, devido à ação de pássaros e mamíferos, eficientes disseminadores, através de sementes ingeridas com a polpa, inclusive o próprio homem (Medina, 1991).

A goiabeira é originária da América tropical, principalmente do Brasil. Embora seja planta tropical, resiste bem a climas subtropicais, apesar de ser muito prejudicada pelas geadas. Pode ser ainda encontrada no Norte e no centro da América do Sul, na América Central, México, Antilhas, Flórida, França, República Sul-africana, sudeste da Ásia, China, Índia e também na Oceania, principalmente na Austrália e Taiti (Gomes, 1982). No Brasil, a goiaba pode ser cultivada em todo território nacional, desenvolvendo-se em quase todos os tipos de climas e de solos, onde se encontram produções de goiabas em pomares domésticos de todos os estados e também pomares comerciais desde o Estado do Rio Grande do Sul até o Estado do Maranhão, com destaque para os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro e Pernambuco (Manica *et al.*, 2000).

Dentre as principais cultivares de goiaba exploradas no Brasil, destacam-se algumas de polpa branca que têm importância apenas para a exportação de frutos *in natura* como a Kumagai, Ogawa, Pedra Branca ou Branca-de-Valinhos e White Selection da Flórida. As cultivares de polpa vermelha são as preferidas pelo mercado interno para o consumo como fruta fresca e para a indústria, as quais respondem por quase a totalidade dos plantios comerciais no Brasil. Entre elas, destacam-se: Guanabara, Brune Vermelha, IAC-4, Ogawa n°1, Ogawa n°2, Ogawa n°3, Paluma, Pedro Sato, Rica, Pirassununga Vermelha, Riverside Vermelha, Sassaooka (Manica *et al.*, 2000), Australiana (Medina, 1991) e Ruby Supreme (Chitarra, 1996).

## 1.2- Importância da cultura

A goiaba, entre as frutas tropicais, ocupa o lugar de destaque por sua excelente qualidade, atribuída a três fatores: elevado teor nutritivo; excelentes propriedades organolépticas; e alto rendimento por hectare e de polpa de elevada qualidade industrial. Esta fruta é considerada uma das melhores fontes de vitamina C, com valores seis a sete vezes superiores aos dos frutos cítricos, e se destaca ainda pelo seu elevado conteúdo de açúcares, vitaminas A e B, como a tiamina e a niacina, além de conter bons teores de fósforo, ferro e cálcio (Manica *et al.*, 2000). Algumas variedades nacionais acusam em média um teor de ácido ascórbico de 80 miligramas por 100 gramas, sendo a goiaba branca e amarela mais rica que a vermelha; quando comparado com o limão que contém cerca de 40 miligramas por 100 gramas. Graças à descoberta do elevado teor de vitamina C, esta fruta foi, durante a Segunda Guerra Mundial, utilizada como o suplemento na alimentação dos soldados aliados nas regiões frias. Desidratada e reduzida a pó tinha por finalidade aumentar a resistência orgânica contra as infecções do aparelho respiratório (Souza *et al.*; 2005).

As propriedades organolépticas são: o sabor e aroma que são característicos da goiaba, a alta digestibilidade e ótima qualidade nutritiva, além de grande conteúdo de fibras, um fator muito favorável à saúde humana e foi classificada como sendo uma fruta excelente para o consumo ao natural e para o processamento. A elevada qualidade industrial da polpa de goiaba permite seu processamento como goiaba em calda ou fatias, goiabadas, geléias, sucos, néctar, sorvetes, bases para xaropes e bebidas (Manica *et al.*, 2000). Atualmente um novo produto, o guatchup, é desenvolvido pela empresa CNJ Internacional com a colaboração da Associação Brasileira de Produtores de Goiaba (GOIABRÁS), que apresenta alto valor nutricional, rico em licopeno, betacaroteno, vitamina C, ferro, cálcio, fibras e é menos calórico em relação ao seu concorrente feito de tomate (Francisco *et al.*; 2005).

Diante de todas essas qualidades, o Brasil tem ocupado a posição de maior produtor mundial de goiabas vermelhas e a Índia em primeiro lugar na produção de goiabas brancas. Em 2000 a produção de goiabas no Brasil foi estimada em

352.840 toneladas em uma área de 14.024 hectares. Esse montante foi maior que a produção de 2003, quando o País produziu 328.747 toneladas em uma área de 17.574 hectares (Agrianual, 2006), porém no ano de 2004 teve um aumento significativo na produção passando para 408.283 toneladas em uma área de 18.778 hectares, devido à intensificação de tecnologias utilizadas (IBGE, 2004). Embora o Brasil seja o maior produtor mundial de goiaba, a participação no mercado internacional da fruta *in natura* é inexpressiva. Segundo Choudbury *et al.* (2001) de 352 mil toneladas de goiaba produzida em 2000, somente 0,06% desse volume foi exportado, estando entre os maiores compradores a França, o Canadá, o Reino Unido e os Países Baixos. Dentre os fatores responsáveis por esse problema, destacam-se o pouco conhecimento do produto por parte dos consumidores dos mercados mais rentáveis economicamente e o alto grau de perecibilidade do fruto na fase de pós-colheita.

No Brasil, os goiabais comerciais concentram-se, principalmente, nas regiões Sudeste e Nordeste, sendo os Estados de São Paulo e Pernambuco os maiores produtores.

No Estado de São Paulo, as frutas produzidas são destinadas aos mercados de frutas frescas e para a industrialização. As principais regiões produtoras estão compostas pelos seguintes municípios: Taquaritinga, Monte Alto, Vista Alegre do Alto e Urupês, ocupando uma área de 4.215,4 hectares, participando com 75% da produção estadual, destinada principalmente para a indústria; o município de Valinhos ocupa uma área de 806,7 hectares, participando com 8% da produção estadual, destinada majoritariamente ao consumo *in natura* e o município de Mirandópolis, ocupando uma área de 397,4 hectares, contribuindo com 17% da produção estadual, destinada em sua maior parte ao consumo *in natura* (Francisco *et al.*; 2005).

No Distrito Federal, os plantios de goiaba concentram-se na região de Brazlândia que, em 2000, produziu 4,4 mil toneladas em cerca de 120 hectares, representando 70% da produção e 68% da área plantada. Outras importantes regiões produtoras são Alexandre Gusmão, Ceilândia, Taquara e Planaltina que juntas, neste mesmo ano, produziram 2 mil toneladas em 55 hectares (FrutiSéries 1, 2001).

### 1.3- Problemas da cultura

O cultivo da goiabeira (*Psidium guajava*), vem-se expandindo intensamente desde 1990, necessitando de muitas mudas e outros materiais de propagação por fruticultores de todas as regiões do Brasil, fato que tem favorecido a disseminação de doenças, como a bacteriose, verrugose e nematóides adquiridas através de mudas contaminadas. A entrada desses materiais de propagação e de frutas de outros países, mesmo sendo de outras espécies, sem as devidas medidas de segurança exigidas pelos órgãos de fiscalização, tem introduzido doenças exóticas e danosas no Brasil (Junqueira, 2000).

Apesar da sua rusticidade, a goiabeira está sujeita a diversos problemas fitossanitários, causados por fungos, nematóides, vírus e bactérias. As doenças causadas pelos fungos de importância no Brasil são citadas: a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), sendo problema em cultivos de goiaba para a indústria, em pomares mal conduzidos e em pós-colheita; a ferrugem (*Puccinia psidii* Wint), considerada uma das principais doenças da goiabeira (Piccinin & Pascholati, 1997) deixando os frutos mumificados e imprestáveis para a comercialização ou industrialização, resultando em perdas de 80% a 100% na produção (Junqueira, 2000). A podridão-do pedúnculo (*Phomopsis destructum* Rao, Agrawal & Saksena e o *Phomopsis psidii* de Câmara) e a podridão por *Botryodiplodia* (*Botryodiplodia theobromae* Pat) resultam em maiores danos nos pomares, quando a penetração do fungo ocorre pelo pedúnculo, causando grandes perdas nas frutas, assim como também na pós-colheita (Bleinroth, 1996). A podridão-de-fruto (*Phyllosticta psidicola* (Petr.) Van Der Aa.) e a podridão-parda (*Dothiorella dominicana*) ambas com origem em pomares comerciais, no Distrito Federal e também em pós-colheita, tem causado várias perdas na produção nesta região (Junqueira, 2000).

Outros problemas fitossanitários encontrados na cultura da goiabeira são as doenças causadas pelos nematóides (*Meloidogyne incógnita* raça 2, *Basiria* sp.; *Dolichodorus* sp.; *Helicotilenchus dihystra*, *Macroposthonia onoensis*, *Peltamigratus* sp.; *Rotylenchulus reniformis*, *Xiphinema* sp. e *Xiphinema vulgare*) causando desfolha, murcha, clorose de nervuras e queda na produção de maneira bastante acentuada (Piccinin & Pascholati, 1997). De acordo com Carneiro *et al.*

(2001), *Meloidogyne mayaguensis* é uma espécie descrita pela primeira vez no Brasil, no Rio Grande do Norte, causam danos severos em plantios comerciais de goiabeira, deixando as plantas com sintomas de amarelecimento e declínio, distribuindo-se em reboleiras. O patógeno apresenta uma alta virulência, com potencial de multiplicação superior a *Meloidogyne incógnita*. A verrugose, embora não se tenha ainda conhecimento do agente causal, vem causando prejuízos da ordem de 100% na produção em plantios de goiaba para o uso industrial. Entre as doenças de origem virótica, embora de importância secundária, cita-se o mosaico amarelo causado por um Caulimovírus (Piccinin & Pascholati, 1997).

Dentre as doenças de origem bacteriana, foi relatada a mancha bacteriana (*Pseudomonas* sp.) com grande importância em 1980. Segundo Tokeshi *et al.* (1980) a doença foi constatada nos goiabais de Mogi das Cruzes e Salto (SP), afetando pomares de frutos de mesa de elevado valor econômico. As plantas apresentavam sintomas de enrolamento das folhas, murcha, amarelecimento e posterior morte nos brotos novos, flores e frutinhos. A observação interna dos ramos mostrou um escurecimento da medula e uma exsudação bacteriana nos ramos, pecíolos e nervuras do limbo foliar. Em análise laboratorial, testes bioquímicos foram realizados mostrando que a bactéria pertencia ao gênero *Pseudomonas* do grupo não fluorescente. Este diagnóstico, mais tarde, gerou dúvidas com o surgimento de uma nova doença: a bacteriose ou seca dos ponteiros causada por *Erwinia psidii* Neto, Robbs & Yamashiro 1983 (Bradbury, 1986). Atualmente a seca dos ponteiros é considerada a doença mais importante da goiabeira no Brasil, pois provoca prejuízos expressivos, além de ser difícil o seu controle e de ter uma ampla capacidade de disseminação entre pomares e dentro do mesmo pomar (Junqueira, 2000).

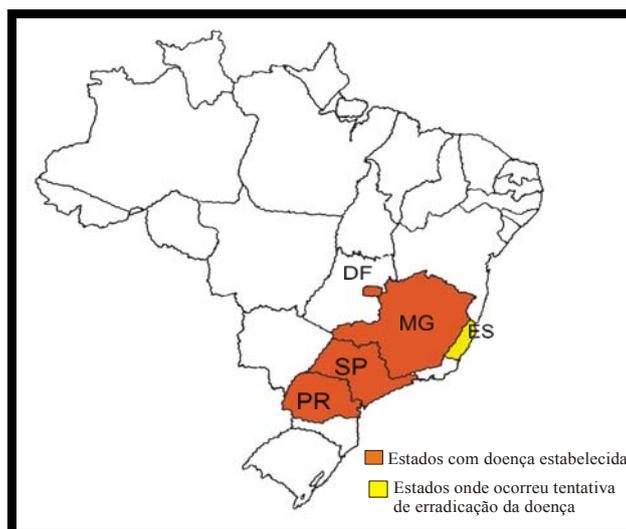
## **1.4- A Bacteriose ou Seca dos Ponteiros**

### **1.4.1- Distribuição geográfica**

Esta doença foi primeiramente descrita no ano de 1982, em goiabeiras (*Psidium guajava* L.) nas regiões de Valinhos e Pindamonhangaba, Estado de São

Paulo (Rodrigues Neto *et al.*, 1983 e 1987). Atualmente encontra-se disseminada nas regiões paulistas de Mogi das Cruzes, Campinas, Registro, Itariri, Jacareí, Auriflama e Santa Isabel (Piccinin & Pascholati, 1997).

Posteriormente, a doença foi encontrada nos Estados de Minas Gerais, no Espírito Santo, no Paraná, no Distrito Federal e em Goiás, mas precisamente na região de Luziânia (com dados não publicados) (Coelho *et al.*; 2002a) (Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição geográfica da seca dos ponteiros da goiabeira. Baseado em Coelho *et al.* (2002a).

Em 1993, a doença foi detectada no Estado de Minas Gerais, no município de Santos Dumont em duas plantações comerciais de goiaba (variedades “Kumagai” e “Pedro Sato”) uma enfermidade até então desconhecida neste estado. Testes bioquímicos, tintoriais e biológicos foram realizados para a identificação. A doença caracterizava-se pela morte dos ponteiros, indicando maior suscetibilidade dos órgãos jovens, com morte progressiva da planta, das pontas para a base. As mudas eram provenientes do Estado de São Paulo (Romeiro *et al.*; 1993, 2002). Segundo, o autor, várias propriedades dessa região que exploram comercialmente a goiabeira enfrentam problemas com a doença, que tem ocasionado perdas na produção em torno de 60-70% (Romeiro *et al.*; 1994).

Em maio de 1999, deu-se o primeiro registro da ocorrência da bacteriose no Estado do Espírito Santo, em pomares de goiabeira localizados na região de Tabocas, no município de Santa Tereza. A doença encontra-se aparentemente

restrita aos pomares dessa região, onde mudas provenientes de São Paulo foram utilizadas para o plantio, sugerindo sua introdução por meio de mudas contaminadas (Oliveira *et al.*; 2000).

Neste mesmo ano, a doença foi detectada e comprovada, no Distrito Federal, na região de Brazlândia, através de levantamentos em um pomar composto pelas variedades Paluma e Pedro Sato, com perdas de até 85% (Junqueira, 2000). Nos anos seguintes, 2000/2001 outros levantamentos foram realizados em 46 propriedades dessa mesma região, indicando através de testes bioquímicos a presença da bactéria (*Erwinia psidii*) em 41,3% das amostras coletadas, mostrando que a bactéria está bastante disseminada nesses pomares causando sérios prejuízos para os produtores (Uesugi *et al.*, 2001). A doença da goiabeira nesta região tem sido um problema tão sério, com perdas elevadas à cultura, que vários produtores já tem abandonado suas atividades, visto que, 56% das propriedades no DF já estão infectadas (Coelho *et al.*; 2002b).

#### **1.4.2- Etiologia**

A bacteriose ou seca dos ponteiros é causada por *Erwinia psidii*. A bactéria é classificada dentro do Domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Gammaproteobacteria, Ordem Enterobacteriales, Família Enterobacteriaceae e Gênero *Erwinia* (Garrity *et al.*, 2001).

*Erwinia psidii* foi classificada dentro do gênero *Erwinia* por apresentar células bastonetiformes, flagelos peritríquios, anaeróbias facultativas, gram-negativas e produção de ácidos a partir de frutose, glucose, galactose e sacarose (Schoroth & Hildebrand, 1994). Por outro lado, seus sintomas típicos de murcha, morte dos ponteiros, lesões necróticas secas em tecidos verdes, ausência de enzimas pectolíticas e outras propriedades bioquímicas permitiram enquadrá-las no grupo amylovora (*Erwinias* verdadeiras) (Dye, 1968 citados por Rodrigues Neto *et al.*; 1987). Suas principais características são: células em forma de bastonete, medindo de 1,0-2,7 x 0,5-0,8 µm, ausência de esporos, forma unicelulada mas podendo ser encontradas em pares ou em cadeias curtas. Colônias são circulares, brilhantes e de bordos lisos ou rugosos, gram-negativas com coloração esbranquiçada, ausência de pigmentos em meio King's B ou em meio GYCA e de

atividade de urease e oxidase, catalase positiva, reações negativas aos testes de podridão em batata e de hipersensibilidade em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*) (Rodrigues Neto *et al.*, 1987). Estudos realizados por Oliveira *et al.* (2000) comprovaram que esta reação não foi observada nas folhas de fumo infiltradas com os isolados da bactéria. Anaeróbicas facultativas, não requerem fator de crescimento, produção de H<sub>2</sub>S e redução de substâncias de sacarose positivas e produção de acetoína, redução de nitrato a nitrito, protopectinase, fenilalanina deaminase, utilização de vários carboidratos (ramnose, trealose, inositol, salicina, sorbitol e manitol (Rodrigues Neto *et al.*, 1983). Apresenta crescimento médio (entre 48 e 72 horas) numa ampla faixa de temperatura, sendo a ótima para o crescimento em torno de 33 °C, embora diverge do trabalho realizado por Rodrigues Neto *et al.* (1987), no qual a bactéria apresentou pouco crescimento à temperatura de 32 °C (Coelho *et al.*; 2002a).

Entretanto, os trabalhos realizados por Rodrigues Neto *et al.* (1983, 1987), mostraram que nenhuma das características mencionadas acima eram similares às de nenhuma outra espécie do grupo amylovora e que, portanto, o organismo isolado de goiabeira, tratava-se de uma nova espécie, designada *Erwinia psidii* sp.nov.



**Figura 2.** Colônias de *Erwinia psidii* em meio 523 modificado de Kado & Heskett, após 48 horas.

### 1.4.3- Sintomatologia

Na goiaba (*Psidium guajava*), a doença ataca todas as partes da planta, como: folhas, hastes, brotações, botões florais e frutos jovens ou maduros (Rodrigues Neto *et al.*; 1987) (Figura 3). Os primeiros sintomas da doença surgem nas extremidades dos ramos novos, onde a brotação sofre murchamento súbito, tomando coloração escura (Figura 3A). Nas folhas os sintomas iniciam pela nervura central (Figura 3B) ocorrendo um escurecimento do limbo foliar, que se expande por toda a folha, com seca progressiva. Esta seca progride até os ramos mais velhos, parando quando encontra os tecidos, já lignificados (Ribeiro *et al.*; 1985; Rodrigues Neto *et al.*; 1987; Piccinin & Pascholati, 1997; Robbs & Rodrigues Neto, 1999; Oliveira *et al.*; 2000; Romeiro *et al.*; 2002). De um modo geral, a infecção não progride para as folhas e ramos mais velhos, ficando restrita à região dos ponteiros (Junqueira, 2000).

Nos ramos próximos ao ponteiro seco, observa-se, através de corte transversal, um escurecimento da medula, seguida de uma destruição dos tecidos; e nas hastes um escurecimento da epiderme (Figura 3C), (Piccinin & Pascholati, 1997; Robbs & Rodrigues Neto, 1999). Esse sintoma, juntamente com a murcha e morte da parte aérea da planta, ocorrem quando a bactéria entra, multiplica e se move através dos vasos do xilema, destruindo as suas células, interferindo no processo de translocação de água e nutrientes, ocasionando a murcha das folhas e a morte da parte aérea (Agrios, 1997). A descoloração vascular aparece com frequência na medula dos ramos jovens, no pecíolo das folhas e no pedúnculo dos frutos (Junqueira, 2000). Em infecções muito severas, pode-se perceber a exsudação da bactéria na superfície dos ramos (Rodrigues Neto *et al.*; 1987; Robbs & Rodrigues Neto, 1999).

Os frutos e botões florais também são afetados, ficando escurecidos, apresentando necrose, secando e tornando-se mumificados (Figura 3D e E). A presença de frutos mumificados pode ocorrer sem a observação de sintomas nos ramos e folhas. Plantas afetadas pela bacteriose, ainda que severamente, não chegam a morrer, porém, o prejuízo causado pela perda dos frutos é bastante grande (Piccinin & Pascholati, 1987; Robbs & Rodrigues Neto, 1999; Oliveira *et al.*; 2000; Uesugi *et al.*; 2001).



**Figura 3.** Sintomas de *Erwinia psidii* em plantas de goiabeira. (A)- Primórdio foliar infectado; (B)- Folhas com sintomas iniciando pela nervura central; (C)- Haste apresentando epiderme enegrecida; (D)- Frutos jovens apresentando aspecto “mumificado”; (E)- Botões florais e frutos jovens com sintoma de infecção; (F)- Ramo de goiabeira apresentando sintoma de seca.

#### 1.4.4- Epidemiologia

A penetração da bactéria pode ocorrer através de aberturas naturais nos botões florais, quando estes caem após a fecundação; através de ferimentos causados por tratamentos culturais como a poda ou desbrota; chuvas de pedras; abrasões por grãos de areia, insetos ou injúrias naturais (Piccini & Pascholati, 1997; Medina, 1991; Junqueira, 2000). A bactéria pode ser beneficiada por adubações nitrogenadas em excesso (Junqueira, 2000), em condições de temperatura e umidade elevada, sendo a água, pela prática de irrigação, seu importante agente disseminador, principalmente em viveiros e dentro de uma mesma área. De acordo com trabalho realizado por Romeiro *et al.* (2002), em Minas Gerais, a disseminação a curta distância (entre órgãos de uma mesma planta, de uma planta para as vizinhas e entre pomares de propriedades limítrofes), o principal agente de disseminação foi a tesoura de poda, sendo comum e freqüente o empréstimo de implementos agrícolas entre propriedades vizinhas. A disseminação a longas distâncias ocorre principalmente por mudas infectadas, contaminadas via enxertia, pelo uso de material propagativo infectado, ferramentas de poda ou ferimentos (Piccinin & Pascholati, 1997).

Segundo Junqueira (2000), em Brasília, DF, durante o período seco e frio, a incidência da doença diminui nos plantios irrigados por aspersão e, praticamente estabiliza ou desaparece nos plantios com irrigação localizada ou não irrigada. Outros fatores como características climáticas da região de cultivo e o sistema de produção empregado, também contribuem para o desenvolvimento e a severidade da doença (Romeiro *et al.*; 1994).

De acordo com o trabalho realizado por Rodrigues Neto *et al.* (1983,1987), constatou-se, por inoculações artificiais, que além da goiabeira, a bactéria também foi patogênica a outras espécies da família Myrtaceas como: jambolão (*Eugenia jambolana* Lamb.), melaleuca (*Melaleuca viridiflora* Brogn. & Gris) e araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), e não patogênica quando inoculadas em limão siciliano, mamoeiro (*Carica papaya* L.), milho doce (*Zea mays* L. var. *rugosa* Bonaf.), cana-de-açúcar (*Saccharum officianarum* L.), e eucalipto, também da família Myrtacea (*Eucalyptus citriodora* Hook. & *E. saligna* Sm.).

#### 1.4.5- Controle

Conforme relatado anteriormente, a bactéria *Erwinia psidii* se dissemina com eficiência, principalmente por mudas e, por este motivo, seu controle envolve uma série de medidas preventivas, visando impedir a sua chegada e estabelecimento nos locais de cultura da goiabeira. Assim, as medidas gerais de controle da bacteriose incluem: utilização de mudas sadias, produzidas em viveiros fiscalizados, evitando-se estacas, sementes ou mudas oriundas de locais onde existe a bacteriose (Junqueira, 2000); cuidados com a qualidade da água de irrigação; conduzir a copa de modo a permitir bom arejamento da mesma; podar todos os ramos das plantas atacadas, retirar do pomar e queimar; evitar podas contínuas que induzirão brotações novas durante os períodos quentes e úmidos; aplicar pasta cúprica nos locais de corte de ramos; realizar a poda nas horas mais quentes do dia, nos períodos de seca, sem chuva; uso de quebra-ventos ao redor das plantas; desinfecção de ferramentas de poda em solução 1:3 de água e hipoclorito de sódio ou de amônia quaternária; aplicar adubos nitrogenados de acordo com a análise do solo e foliar na época certa; evitar plantios em solos mal drenados ou sujeitos ao encharcamento (Ribeiro *et al.*; 1985; Medina, 1991; Piccinin & Pascholati, 1997; Junqueira, 2000; Romeiro *et al.*; 2002).

Conforme Romeiro *et al.* (1994, 2002) as tentativas de controle no Estado de Minas Gerais foram inefetivas. Cerca de um ano após a identificação do problema, as recomendações técnicas não foram seguidas, em sua totalidade e de forma correta pelo agricultor, nem continuaram a ser aplicadas nas podas subseqüentes, conseqüentemente a percentagem de infecção, antes limitada a 60%, por ocasião da primeira constatação, aumentou para 100%.

A utilização de variedades resistentes é o meio mais eficaz e econômico para o controle da doença, mas na literatura, entretanto, não foram encontrados trabalhos de seleção para essa característica, apesar das indicações de sua importância. De acordo com Piccinin & Pascholati, (1997) as variedades de polpa branca apresentam maior tolerância à bactéria em relação às de polpa vermelha. Observações no campo sugerem que algumas cultivares como Ogawa, Pedro Sato são mais suscetíveis ao patógeno que outras. No levantamento da ocorrência da bacteriose em Brazlândia, DF, visitas realizadas em 19 propriedades rurais, 10

apresentaram sintomas de doenças nos pomares de goiaba formados com mudas provenientes do estado de São Paulo com as seguintes variedades: Paluma, Pedro Sato, Ogawa, Australiana e Comum. A partir deste levantamento não foi possível determinar diferenças de suscetibilidade entre as cultivares plantadas na região. Entretanto, a variedade Australiana, aparentemente, mostrou ser mais tolerante à infecção pela bactéria que as demais cultivares (Coelho *et al.*; 2002a).

Assim, o controle químico se torna a forma mais viável atualmente de redução de perdas. Podem ser feitas pulverizações preventivas com fungicidas cúpricos ou, no caso de pomares já infectados, devem-se aplicar fungicidas a cada 15 dias, desde o início da brotação até os frutos atingirem um tamanho de aproximadamente 3 cm, a partir do qual passam a ser sensíveis ao cobre. Apenas o oxiclreto de cobre está registrado para o uso contra a bacteriose (Piccinin & Pascholati, 1997).

## 2- OBJETIVOS

Atualmente, a seca dos ponteiros, considerada a doença mais importante da cultura da goiaba e restrita algumas regiões do país, foi recentemente incluída como uma praga quarentenária A2 (aquelas que ocorrem no país, mas são de distribuição restrita a áreas limitadas e estão sobre o controle ativo). Segundo Coelho *et al.* (2002a), dada a importância da cultura da goiaba para a sobrevivência de pequenas propriedades rurais, assim como, grande potencial para a exportação; dada a severidade da doença e sua distribuição ainda restrita a algumas das regiões produtoras do Brasil, o Laboratório de Quarentena Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia elaborou um pedido, para o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para incluir *Erwinia psidii* como Praga Quarentenária do tipo A2 para o país. De acordo com Oliveira *et al.* (2000), a erradicação da doença no Estado do Espírito Santo, foi aplicada, com medidas legislativas e de prevenção da doença, recomendadas aos produtores.

Devido a sua restrita distribuição geográfica, no Brasil, pouco se conhece sobre um controle químico mais efetivo da bacteriose, e que não cause sintomas de fitotoxicidade aos frutos. Da mesma forma, não se tem muito conhecimento sobre as variedades resistentes à bacteriose. Considerando estes aspectos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, em casa de vegetação, a resistência genética de algumas variedades de goiaba a diferentes isolados de *Erwinia psidii*, assim como, a utilização de produtos químicos no controle da bacteriose da goiabeira.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília (UnB), em casa de vegetação; na região de Brazlândia-DF, na propriedade do produtor Bunkiti Kimura, e no Laboratório de Fitopatologia, situado no Campus Universitário Darcy Ribeiro-UnB.

#### **3.1- Coletas de material infectado no campo e isolamento**

As coletas foram realizadas nos meses de setembro e novembro de 2004 e janeiro de 2005, em diferentes propriedades: na chácara 3-281 em Alexandre Gusmão foram coletadas amostras das variedades Pedro Sato e Ogawa; na chácara A do Sítio Mundo Novo, Pedro Sato; na chácara B, Comum e Paluma e, na chácara 2-246 em Alexandre Gusmão, Pedro Sato (Tabela 1). Segundo informações obtidas dos produtores locais, os goiabais das áreas de coleta de material foram formados aproximadamente sete a oito anos, com mudas enxertadas procedentes de viveiros de São Paulo.

Os materiais coletados consistiram de ramos jovens, de onde se observava a medula enegrecida no ponto de corte transversal. Os ramos continham frutos mumificados, ou ainda verdes com manchas negras, ponteiros e folhas adultas com sintomas. Esses materiais foram acondicionados em sacos plásticos e preservados em câmara fria (15 °C), até o isolamento.

Para o isolamento da bactéria, os materiais coletados foram submetidos ao processo de desinfecção superficial, que consiste da limpeza com papel toalha embebida com etanol 70% seguido de uma flambagem. Após este processo de desinfecção, partes de tecido vegetal contaminado, ou seja, descolorido, foram retirados com estilete dos frutos, hastes e folhas. Dos frutos com manchas negras na casca, mas ainda esverdeados, ou dos frutos totalmente verdes por fora, mas com interior amarronzado, os fragmentos foram tirados do mesocarpo. Das amostras que continham frutos pequenos, mumificados e secos, foram extraídos fragmentos do interior dos pedúnculos (Tabela 1). As hastes foram cortadas deixando a medula amarronzada exposta para obtenção do material. As folhas foram retiradas de nervuras com coloração avermelhada, ou de ponteiros enegrecidos.

Em lâminas de vidro, esterilizadas, juntamente com água destilada e estéril, os fragmentos foram macerados com bastão de vidro e a suspensão obtida foi transferida com uma alça flambada, para placa de Petri contendo meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) (ver anexos), e diluído em estrias por esgotamento.

**Tabela 1.** Origem dos isolados de *Erwinia psidii* utilizados no presente trabalho.

Propriedade	Variedade	Parte retirada	Isolados	Localidade
Chácara 3-281	Pedro Sato	Haste	(7)*-UnB 1285	Alexandre Gusmão-DF
Chácara 3-281	Ogawa	Haste	(8)- UnB 1286	Alexandre Gusmão-DF
Chácara A	Pedro Sato	Fruto	(10)-UnB 1287	Sítio M. Novo- Vendinha-GO
Chácara B	Paluma	Fruto	(12)-UnB 1288	Sítio M. Novo- Vendinha-GO
Chácara 2-246	Pedro Sato	Fruto	(13)-UnB 1289	Alexandre Gusmão-DF
Chácara B	Comum	Haste	(1)- UnB 1290	Sítio M. Novo- Vendinha-GO

\* Isolados que posteriormente foram incluídos na Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Depto. de Fitopatologia-UnB.

### 3.2- Isolados utilizados

Seis isolados de diferentes procedências foram utilizados no presente trabalho: UnB 1285, 1286, 1287, 1288, 1289, 1290, além do isolado tipo IBSBF 435, cedido pela Unidade de Bacteriologia do Laboratório de Quarentena Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen). A amostra do isolado tipo foi cedida ao LQV pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico.

### 3.3- Cultivo e Preservação dos isolados

Para repicagens de rotina e preparo do inóculo para realização dos testes bioquímicos, *Erwinia psidii* foi cultivada em meio de cultura 523 (Kado & Heskett,

1970) modificado e mantido a uma temperatura de 28 °C. A cultura utilizada para inoculação e realização dos testes foi de 48 horas após a repicagem. Os isolados foram preservados em tubos contendo 10 ml de água destilada e estéril a temperatura ambiente.

### **3.4- Preparo da suspensão bacteriana para inoculação**

A suspensão bacteriana foi preparada a partir de culturas em meio sólido crescidas por 48 horas (item 3.3), em tubos de ensaio contendo 10 ml de água destilada e esterilizada. A concentração obtida foi de aproximadamente  $1 \times 10^9$  ufc/ml, determinada pelo método de diluição seriada e plaqueamento.

### **3.5- Testes bioquímicos e fisiológicos**

A partir do isolamento e caracterização cultural, os isolados utilizados (item 3.2) foram submetidos aos seguintes testes: oxidação/fermentação da glicose; catalase; oxidase; teste de podridão mole em batatas (*Solanum tuberosum*), reação de hipersensibilidade em plantas de fumo (cultivar TNN), e observação das características morfológicas. Os testes foram realizados de acordo com os protocolos convencionais de Dickey & Kelman (1994), Schaad *et al.* (2001), e Mariano *et al.* (2005).

#### **3.5.1- Oxidação/ Fermentação da glicose**

O meio OF (ver anexos) é usado para diferenciar metabolismo fermentativo de oxidativo de carboidrato. Os tubos com este meio ficaram conservados em geladeira até a inoculação das bactérias. Estas foram retiradas com alça dos meios de cultura e introduzidas na posição vertical nos tubos de ensaio com o meio. Em seguida, foram incubadas a 28 °C e observados após 2 dias. A bactéria que possui o metabolismo fermentativo produz mudança na coloração do meio para amarela. Como controle negativo, foi utilizada a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (UnB 1113).

### **3.5.2-Catalase**

Catalase é uma enzima que desdobra a água oxigenada em água e oxigênio. Para realização deste teste, gotas de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 volumes) foram aplicadas sobre massa bacteriana crescida em meio de cultura (mencionada no item 3.3) e espalhada em lâminas de vidro, previamente esterilizadas. A formação de bolhas é considerada resposta positiva.

### **3.5.3- Oxidase**

Após o preparo da solução (ver anexos), foi feito o teste, utilizando-se um conta gotas, o reagente foi colocado sobre tiras de papel filtro. Com a alça de platina, uma pequena massa do crescimento bacteriano, por isolado, foi colocada sobre o papel preparado. A formação de cor vermelha indica uma reação positiva. Como controle positivo foi usada a espécie *Ralstonia solanacearum* (UnB 1169).

### **3.5.4- Teste de Podridão mole**

Batatas foram cortadas em pedaços de mais ou menos 2 cm de comprimento e largura, e 0,5 cm de altura, de maneira asséptica. Os pedaços foram dispostos em placa de Petri sobre pequenos suportes de metal, com a finalidade de evitar o contato dos papéis umedecidos no fundo da placa. Nas superfícies dessas fatias de tubérculos foram depositadas pequenas quantidades de culturas bacterianas (item 3.3). As placas foram incubadas a 28 °C por 72 horas. Como controle positivo foi usado o isolado UnB 1172 de *Erwinia carotovora*.

### **3.5.5- Hipersensibilidade em folhas de fumo**

Foram preparadas suspensões bacterianas (mencionadas no item 3.4), e infiltradas sob a epiderme da folha no espaço interneval da face inferior de uma folha de fumo, por meio de uma seringa hipodérmica sem agulha. A reação de hipersensibilidade foi observada até o quarto dia após a infiltração, traduzindo-se

por necrose e dessecação da região infiltrada. Como controle positivo utilizou-se *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (UnB 1174).

### **3.6- Resistência genética de variedades de goiaba (*Psidium guajava*) à seca dos ponteiros causada por *Erwinia psidii*.**

#### **3.6.1- Plantio e Variedades utilizadas**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com temperaturas oscilando de 25 °C e 31 °C. O plantio foi feito em bandejas plásticas de 0,29 x 0,43 x 0,08 cm de altura, com aproximadamente sete sulcos, com 10 a 15 sementes. O transplante das mudas para vasos foi feito com 49 dias, quando estas apresentavam a primeira folha não cotiledonar.

As variedades utilizadas foram: Bicudo e Comum, obtida na propriedade do Sr. Takao Kimura, com frutos apresentando polpa vermelha e branca, respectivamente; Pedro Sato e Ogawa, da propriedade do Sr. Takimi Hoshi, ambas de polpa vermelha e a Paluma, da propriedade do Sr. Bunkiti Kimura, também de polpa vermelha.

Foram utilizados os seguintes isolados: UnB 1285, 1286, 1287, 1288, 1289 e 1290. Em todas as variedades foram utilizadas duas repetições, representadas por vasos (sendo cada um com duas plantas).

#### **3.6.2-Inoculações**

Foram utilizados dois diferentes métodos, para testar a resistência varietal das plantas de goiaba. O primeiro método utilizado foi o de pulverização, realizado aos 27 dias após o transplante das mudas. A concentração da suspensão utilizada foi de  $1 \times 10^8$  ufc/ml. Para manter a umidade após a pulverização, as plantas foram cobertas por 18 horas com sacos plásticos transparente, para facilitar a penetração da bactéria via estômatos.

O segundo método de inoculação foi o de picada na haste, com o objetivo de comprovar a resistência das variedades com os isolados já testados pelo método

anterior. O método consistiu em fazer picadas, nas hastes, com agulhas estéreis mergulhada na suspensão de  $1 \times 10^9$  ufc/ml (item 3.4).

Aos 10 dias após a inoculação foi realizado o isolamento das hastes (item 3.1), de todas as variedades, para comprovação da infecção bacteriana.

### **3.6.3- Avaliação**

As avaliações foram iniciadas 15 dias após as inoculações. Foram feitas leituras, semanalmente, do nível de severidade, verificando-se a percentagem de áreas lesionadas nos 15 cm finais do ramo de brotação, através de uma escala de notas onde, 0= nenhum sintoma observado; 1= 0,1% a 25% de área lesionada; 2= 25,1% a 50% de área lesionada; 3= 50,1% a 75% de área lesionada e 4= 75,1% a 100% de área lesionada. Para o método de inoculação por pulverização, foram feitas duas avaliações, e para o método por agulha, cinco avaliações.

## **3.7- Sensibilidade de *Erwinia psidii* “in vitro” a diferentes formulações cúpricas e aos cloretos de benzalcônio.**

### **3.7.1- Meios de cultura e produtos utilizados**

A seleção de isolados resistentes a cobre e aos cloretos de benzalcônio foi feita utilizando-se os meios de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) e o MMCC (Medium Minimal Complexing Copper) (Pohronezny *et al.*; 1992) (ver anexos), que possui baixa capacidade de complexar o cobre. Os isolados utilizados foram UnB 1285, 1286, 1287, 1288 e 1289, obtidos de isolamento, conforme descrição no item 3.1.

Os produtos utilizados foram o sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), 20% do produto ativo (P.A.), com nome comercial de Cupro-Dimy; o oxiclreto de cobre ( $\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$ ), 35% P.A., com nome comercial de Agrinose; o hidróxido de cobre ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ), 35% P.A., com nome comercial de Kocide e o Fegatex (10% de cloretos de benzalcônio). As concentrações finais dos três produtos foram as seguintes: 0, 50, 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  no meio 523 e de 0, 10, 20, 30,

40, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/ ml no meio MMCC, com exceção do hidróxido de cobre, neste mesmo meio, em que foi utilizado nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/ ml. Os cloretos de benzalcônio foram testados nas concentrações de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300 e 400 µg/ ml, em ambos os meios.

Todos os produtos foram suplementados aos meios, asépticamente, no momento de vertê-los em placas de Petri. Para isto, foram preparadas, para os produtos cúpricos, soluções estoques. Cada produto foi previamente pesado de acordo com a percentagem do P.A. e dissolvido em um frasco com 100 ml de água destilada e esterilizada, agitados a 200 golpes/ minuto por 10 minutos.

### **3.7.2- Plaqueamento**

Após o preparo das suspensões na concentração de  $1 \times 10^9$  ufc/ml (item 3.4), alíquotas de 10 µl de suspensões foram depositadas e riscadas, com a alça flambada, sobre os meios 523 e MMCC de acordo com as concentrações desejadas, conforme citado anteriormente. Após a inoculação as placas foram incubadas a 28 °C. Para cada isolado e controle foram realizadas três repetições. O experimento foi realizado duas vezes.

### **3.7.3- Avaliação**

A avaliação foi feita após 72 horas de incubação, através da contagem de colônias, expressas em **ufc** (unidades formadoras de colônias) de cada placa.

## **3.8- Sensibilidade de *Erwinia psidii* “in vitro” a diferentes tipos de antibióticos.**

### **3.8.1- Antibiose**

Testou-se vinte diferentes antibióticos, mediante a realização de antibiograma (Tabela 2), com a finalidade de verificar a sensibilidade dos isolados

de *E. psidii* UnB 1285, 1286, 1287, 1288, 1289 e o isolado tipo IBSBF 435, ao tratamento químico.

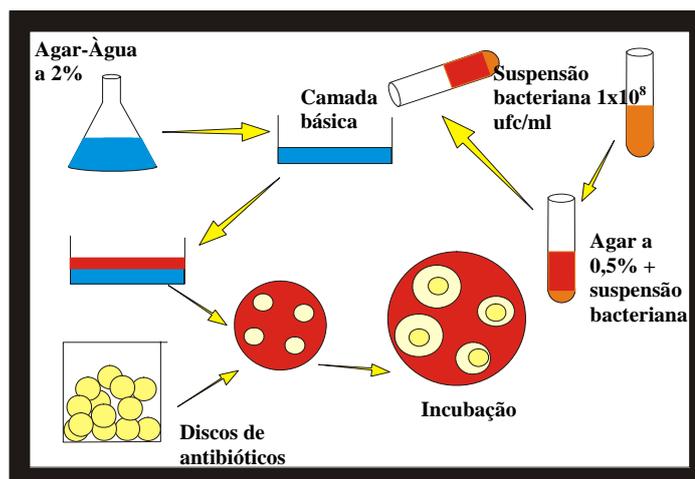
**Tabela 2.** Antibióticos utilizados na realização do teste de sensibilidade de *Erwinia psidii*.

Antibióticos	Concentração/disco	Antibióticos	Concentração/disco
Rifampicina	5 µg	Oxacilina	1 µg
Cefalotina	30 µg	Tetraciclina	30 µg
Estreptomicina	10 µg	Lincomicina	2 µg
Bacitracina	10 un.	Ácido Nalidíxico	30 µg
Eritromicina	15 µg	Clindamicina	2 µg
Clorafenicol	30 µg	Gentamicina	10 µg
Penicilina	10 un.	Sulfonamida	300 µg
Ampicilina	10 µg	Amicacina	30 µg
Vancomicina	30µg	Sulfazotrina	25 µg
Nitrofurantoina	300µg	Neomicina	30 µg

### 3.8.2- Plaqueamento

Para realização deste ensaio, utilizou-se bactérias recuperadas de meio de cultura sólido (item 3.3), para o preparo das suspensões com concentração de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/ ml. Desta suspensão retirou-se uma alíquota de 50 µl a qual foi adicionada a 5 ml de meio 523 (Kado & Heskett, 1970), com 0,5% de agar, homogeneizada e em seguida, vertida sobre o meio 523 contendo 2% de agar (Figura 4).

Os discos com os antibióticos utilizados foram discos comerciais com antibióticos em diferentes concentrações pré-estabelecidas e padronizadas para este tipo de teste. Após a solidificação da mistura sobreposta, os discos com antibióticos foram colocados nas placas, sendo que cada placa foi dividida em quatro quadrantes e cada dois receberam o mesmo princípio ativo. As placas foram incubadas a 28 °C.



**Figura 4.** Esquema explicativo do procedimento para execução do teste de antibiose com discos de papel filtro. Modificado de Romeiro (1996).

### 3.8.3- Avaliação

A avaliação foi feita com 48 horas, utilizando-se uma régua comum, medindo-se o raio do halo de inibição do crescimento bacteriano em torno de cada disco, indicando a sensibilidade da bactéria ao antibiótico. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e a análise estatística aplicado foi o Teste de Tukey a 5% de probabilidade. O experimento constou de vinte tratamentos, cada tratamento foi constituído de quatro repetições, sendo duas repetições por placa.

### 3.9- Estudo do efeito de formulações de fungicidas cúpricos e de cloretos de benzalcônio, na incidência de *Erwinia psidii* e expressão de sintomas fitotoxicidade em goiaba (*Psidium guajava*), em casa de vegetação.

Para realização deste experimento foram utilizadas as variedades: Bicudo, Pedro Sato, Ogawa, Comum e Paluma em vasos conforme mencionado (item 3.6.1). O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com cinco tratamentos (produtos químicos e controle), com oito repetições por variedade (dois vasos com duas plantas em cada e duas brotações por planta). Os produtos

utilizados encontram-se na Tabela 3. No estudo da incidência da doença o isolado foi o UnB 1288.

**Tabela 3.** Tratamentos, nome comercial, concentrações utilizadas e doses recomendadas na determinação da fitotoxicidade e controle de *Erwinia psidii*, em casa de vegetação.

Tratamentos	Nome Comercial	Concentrações	Doses recomendadas
Sulfato de cobre	Cupro-Dimy	5,0 g/l	500 g/100L
Oxicloreto de cobre	Agrinose	3,5 g/l	350 g/100L
Hidróxido de cobre	Kocide	3,0 g/l	300 g/100L
Cloreto de benzalcônio	Fegatex	3,0 ml/l	200 ml/100L
Controle	—	—	—

### 3.9.1- Inoculação e Pulverização

No estudo da fitotoxicidade as pulverizações com os produtos químicos iniciaram-se aos 20 dias após a poda, quando as plantas se apresentavam as primeiras folhas. Foram realizadas cinco pulverizações semanais, utilizando-se um pulverizador costal, com pressão de 50 lb/ pol<sup>2</sup>, dotado de bico cônico, vazão tipo D-2. O experimento foi realizado três vezes.

Já no estudo da incidência da doença, a suspensão preparada (item 3.4) foi adicionada a 100 ml de água e inoculada nas plantas, dois dias antes da primeira pulverização. Após a inoculação, as plantas foram cobertas com sacos plásticos por 18 horas (item 3.6.2). As plantas controle foram pulverizadas com água, mantendo a umidade. O experimento foi realizado uma vez.

### 3.9.2- Avaliação

No estudo da fitotoxicidade foram feitas quatro leituras semanalmente para todos os produtos, com exceção dos cloretos de benzalcônio que foi realizada somente uma leitura, com a finalidade de verificar a influência dos produtos sobre o tamanho das brotações após a poda.

No estudo da incidência da doença foi verificado o nível de severidade, determinado através de uma escala de notas de 0, 1, 2, 3 e 4 conforme a descrição no item 3.6.3. As avaliações foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação. Os dados gerados foram submetidos à análise estatística utilizando o software SAS, onde se empregou a análise de variância pelo Teste F e as médias foram comparadas através do Teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro de 5%.

### **3.10- Estudo do efeito de formulações de fungicidas cúpricos e o de cloretos de benzalcônio, na incidência de *Erwinia psidii* e expressão de sintomas de fitotoxicidade em goiaba (*Psidium guajava*), no campo.**

O experimento foi realizado em pomar comercial, com espaçamento de 2,5 x 6,0m, de aproximadamente 7 a 8 anos de idade, com as cultivares Pedro Sato e Comum, localizado no município de Brazlândia-DF. Os estádios avaliados foram os seguintes: 1- inflorescência ou frutinhos com diâmetro inferior ou igual a 15 mm; 2- frutos pequenos com diâmetro entre 16 e 30 mm; 3- frutos médios, com diâmetro maior ou igual a 31 mm. Foram testadas diferentes formulações de fungicidas cúpricos e cloretos de benzalcônio (Tabela 4). Foram realizadas quatro pulverizações semanais com um pulverizador costal, cuja vazão é de 2 l por planta, o mesmo utilizado no estudo em casa de vegetação.

Empregou-se o delineamento experimental com blocos ao acaso, com cinco tratamentos e quatro repetições, considerando cada quadrante de uma planta, uma repetição.

**Tabela 4.** Tratamentos, nome comercial, concentrações utilizadas e doses recomendadas na determinação da fitotoxicidade e controle de *Erwinia psidii*, no campo.

Tratamentos	Nome Comercial	Concentrações	Doses recomendadas
Sulfato de cobre	Cupro-Dimy	25,0 g/5 l	500 g/100 l
Oxicloreto de cobre	Agrinose	17,5 g/5 l	350 g/100 l
Hidróxido de cobre	Kocide	15,0 g/5 l	300 g/100 l
Cloretos de benzalcônio	Fegatex	15,0 ml/5 l	200 ml/100 l
Controle	—	—	—

### 3.10.1- Avaliação

Foram realizadas três leituras semanais, nos quatro quadrantes por planta, na qual foram marcados 10 botões e 10 frutos para cada um dos estágios de desenvolvimento pré-estabelecidos. O critério de avaliação constituiu-se dos sintomas de fitotoxicidade, usando-se a escala de notas (Goes *et al.*, 2004): 0= ausência de sintomas; 1= sintomas leves (frutos com leves pontuações diminutas, pouco perceptíveis, sem restrição ao mercado de frutas frescas); 2= sintomas moderados (frutos com pontuações pequenas e visíveis, porém aceitos com restrição para o mercado de frutas frescas); 3= sintomas severos (pontuações escuras bem visíveis, ocupando espaços variáveis nos frutos, rejeitados para o mercado de frutas frescas).

A avaliação da incidência da doença foi feita em 10 ramos da frutificação em cada quadrante da planta, cujo desenvolvimento foi acompanhado nas semanas subsequentes. As avaliações consistiram em inspeção visual, em intervalos semanais, após as aplicações dos fungicidas, determinando-se o número de ramos com sintomas da doença. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística empregando o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Testes bioquímicos e fisiológicos

De todos materiais infectados, coletados na região de Brazlândia e submetidos ao isolamento, somente seis isolados foram confirmados pelos testes bioquímicos, fisiológicos e características morfológicas tratar-se da bactéria *Erwinia psidii*. Os demais materiais estudados foram descartados por apresentarem resultados incompatíveis e características morfológicas bem distintas, àquelas descritas por Rodrigues Neto *et al.* (1987). Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Caracterização bioquímica, reação de hipersensibilidade e teste de podridão mole dos isolados de *Erwinia psidii*, procedentes de diferentes localidades.

Testes	UnB 1285	UnB 1286	UnB 1287	UnB 1288	UnB 1289	UnB 1290
Oxidação / Fermentação glicose	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Podridão mole da batata	-	-	-	-	-	-
Reação de hipersensibilidade em fumo	-	-	-	-	-	-

(+) reação positiva; (-) reação negativa; (F) fermentativo.

No teste O/F, todos os isolados apresentaram metabolismo fermentativo, indicando a característica anaeróbia facultativa, ou seja, a utilização de glicose na ausência ou presença de oxigênio. Bactérias fermentativas produzem reação ácida, na ausência de oxigênio, indicando uma coloração amarela do meio. Apenas *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihots* (UnB 1113) apresentou metabolismo oxidativo.

O teste de catalase mostrou uma reação positiva em todos os isolados. A reação positiva foi evidenciada pela presença de bolhas formadas à partir do

crescimento bacteriano. O borbulhamento foi ocasionado pelo desdobramento da água oxigenada, pela enzima catalase, em água e oxigênio conforme a reação:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  (Mariano *et al.*, 2005).

Em relação ao teste de oxidase, todos os isolados foram negativos quando comparado com *Ralstonia solanacearum* (UnB 1169) utilizada como controle positivo, que apresentou coloração vermelha púrpura dentro de 10 a 15 segundos, quando em contato com o reagente. Após esse período, o isolado UnB 1285 apresentou uma coloração cor de rosa claro, a qual foi considerada como negativa. Para os demais isolados não houve mudança na coloração.

O teste de podridão mole, como já era esperado, apresentou resultado negativo para todos os isolados; visto que a bactéria *Erwinia psidii* pertence ao grupo “amylovora”, não causadoras de podridão mole.

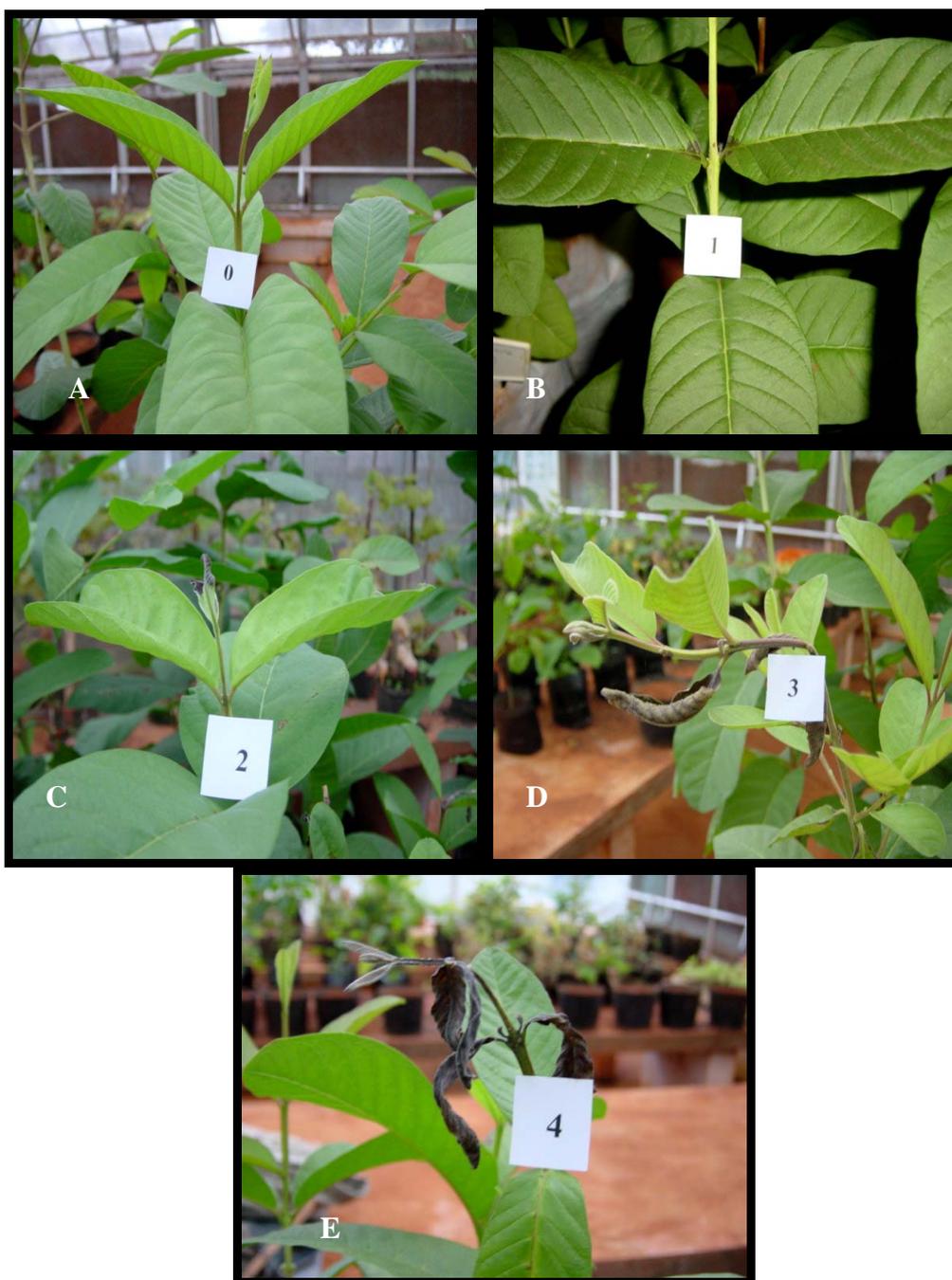
No teste de hipersensibilidade em folhas de fumo, todos os isolados apresentaram reação negativa 24 horas após a inoculação. Apenas o isolado *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (UnB 1174) mostrou reação positiva caracterizada por necrose local e dessecamento do tecido, após 24 horas.

E em relação às características morfológicas das colônias, alguns isolados como UnB 1285 e 1286 apresentaram colônias com formatos circulares e bordos lisos, enquanto os demais isolados apresentaram o mesmo formato, porém, com bordos rugosos; coloração branca e brilhante.

#### **4.2- Resistência genética de variedades de goiaba (*Psidium guajava*) à seca dos ponteiros causada por *Erwinia psidii*.**

Para ambas as metodologias de inoculação, os resultados foram analisados conforme as percentagens (%) de plantas com sintomas visíveis de necrose ou morte nas hastes, folhas e brotações de acordo com a escala de notas citadas no item 3.6.3, para cada isolado estudado (Figura 5). Os resultados foram obtidos da última avaliação onde se observou uma pequena progressão do percentual de plantas com sintomas nas diferentes épocas de avaliação. De acordo com os dados coletados para os dois métodos de inoculação (Tabela 6), pode-se constatar que

todas as variedades testadas foram suscetíveis à quase todos os isolados apresentando nota 4, com 75,1 a 100% de área lesionada. Com os dois métodos de inoculação, observou-se graus diferentes de agressividade entre os isolados sugerindo a existência de variabilidade na habilidade patogênica entre os isolados de *Erwinia psidii*. O conhecimento da variabilidade entre esses isolados quanto à agressividade é bastante importante em relação ao desenvolvimento de estratégias de controle, como a aplicação de produtos químicos e a resistência genética.



**Figura 5.** Escala de notas atribuídas para os sintomas de *Erwinia psidii*, nos 15 cm finais do ramo de brotação, em plantas de goiaba: (A) nota 0= sem sintomas; (B) nota 1= 0,1% a 25% de área lesionada; (C) nota 2= 25,1% a 50% de área lesionada; (D) nota 3= 50,1% a 75% de área lesionada; (E) nota 4= 75,1% a 100% de área lesionada.

**Tabela 6.** Níveis de incidência da bacteriose em variedades de goiabeira, inoculadas com diferentes isolados de *Erwinia psidii*, por dois métodos de inoculação.

Variedades	Inoculação por Agulha						Inoculação por Pulverização					
	UnB 1285	UnB 1286	UnB 1287	UnB 1288	UnB 1289	UnB 1290	UnB 1285	UnB 1286	UnB 1287	UnB 1288	UnB 1289	UnB 1290
Comum	*100% **(4)	100% (4)	50% (4)	100% (4)	100% (4)	100% (0)	100% (4)	75% (4)	100% (4)	100% (4)	100% (0)	100% (0)
Pedro Sato	100% (4)	100% (4)	100% (4)	100% (4)	100% (4)	25% (1)	100% (4)	75% (4)	100% (4)	100% (4)	100% (4)	100% (0)
Paluma	100% (4)	100% (4)	75% (4)	100% (4)	100% (4)	75% (4)	100% (4)	50% (4)	100% (4)	100% (4)	25% (1)	25% (1)
Ogawa	100% (4)	75% (4)	100% (4)	100% (4)	100% (4)	50% (4)	50% (4)	75% (4)	100% (4)	100% (4)	25% (4)	100% (0)
Bicudo	100% (4)	100% (4)	100% (4)	100% (4)	100% (4)	100% (0)	100% (4)	50% (1)	100% (4)	100% (4)	100% (0)	100% (0)

\* % de plantas que receberam as seguintes notas, nos 15 cm finais do ramo de brotação:

0= sem nenhum sintoma observado;

1= 0,1 a 25% de área lesionada;

2= 25,1 a 50% de área lesionada;

3= 50,1 a 75% de área lesionada;

4= 75,1 a 100% de área lesionada.. Concentração do inóculo: agulha ( $1 \times 10^9$  ufc/ ml); pulverização ( $1 \times 10^8$  ufc/ ml).

Com o método de inoculação por agulha, para quase todos os isolados, as variedades apresentaram alta suscetibilidade à bactéria *Erwinia psidii*, com exceção do isolado UnB 1290 nas variedades Comum e Bicudo, que não apresentaram nenhum sintoma visível. Comparando com o método de pulverização essa mesma reação esteve presente nas plantas face aos isolados UnB 1289 e 1290; porém neste último isolado a suscetibilidade foi observada somente na variedade Paluma, sendo 25% das plantas com nota 1 (Tabela 6).

Na inoculação por agulha, para os isolados UnB 1285, 1288 e 1289, todas as variedades apresentaram 100% das plantas recebendo a nota 4. Nesse último isolado, na variedade Ogawa, 25% das plantas mostraram uma evolução na doença passando da nota 1 para a nota 4. Comparando com o método de pulverização, somente com os isolados UnB 1287 e 1288 todas as variedades apresentaram 100% das plantas obtendo nota 4. Isso mostrou o quanto a inoculação por agulha é drástica, forçando a penetração da bactéria dentro dos vasos condutores, enquanto que no método de pulverização, o inóculo é depositado na superfície da folha e fica sujeito às intempéries climáticas, e impedindo a penetração da bactéria dentro dos vasos condutores (Tabela 6).

A variedade Ogawa apresentou certa resistência, quando inoculada com os isolados UnB 1286 e 1290, pelo método de agulha. Ao comparar com o método de pulverização, essa mesma variedade apresentou resistência para quase todos isolados, com exceção dos isolados UnB 1287 e 1288. A variedade Pedro Sato apresentou alta suscetibilidade à quase todos isolados, em ambas metodologias de inoculação, com exceção do isolado UnB 1290 que apresentou baixa agressividade, fazendo com que a planta obtesse alta resistência (Tabela 6). A variedade Paluma também apresentou alta suscetibilidade pelos dois métodos de inoculação, com exceção a alguns isolados. Na inoculação por agulha com o isolado UnB 1286, as plantas apresentaram evolução da doença passando da nota 1 para a nota 4 (Tabela 6).

Em relação à agressividade dos isolados, avaliada pelos dois métodos de inoculação, o menos agressivo a todas as variedades foi o isolado UnB 1290. Entretanto, na variedade Paluma, na inoculação por agulha, 75% das plantas apresentaram sintomas por esse isolado. Por outro lado, nesse mesmo método os

mais agressivos a todas as variedades, atacando 100% das plantas foram os isolados UnB 1285, 1288 e 1289. O isolado UnB 1286 também pode ser considerado bastante agressivo; visto que 75% das plantas, na variedade Ogawa, apresentaram sintomas da bacteriose, quando comparado com as demais variedades que tiveram 100% das plantas infectadas. No entanto, no método de pulverização esses resultados mostraram algumas diferenças indicando que os mais agressivos a todas as variedades, com 100% de morte nas hastes, folhas e brotações foi o isolado UnB 1287 e 1288; visto que o isolado UnB 1289 apresentou alta agressividade somente nas variedades Pedro Sato e Ogawa (Tabela 6). O isolamento das hastes de todas as variedades confirmou a presença da bactéria.

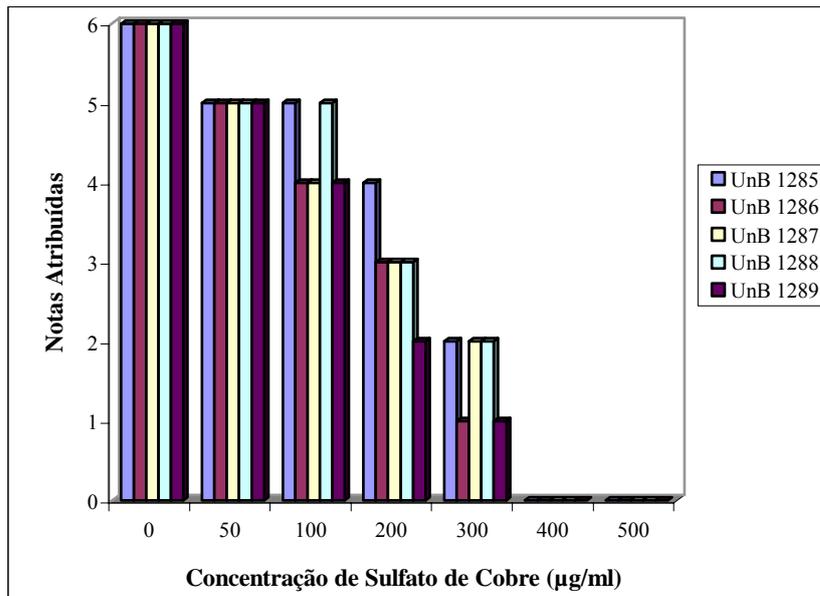
#### **4.3- Sensibilidade de *Erwinia psidii* “*in vitro*” a diferentes formulações cúpricas e aos cloretos de benzalcônio.**

Através da contagem de colônias em cada repetição de duplicatas, obteve-se um valor médio de ufc/ml, para cada tratamento, nos diferentes meios. De acordo com os resultados obtidos foi atribuída a seguinte escala de notas: 0= não houve formação de colônias; 1= de 1 a 100 colônias; 2= de 101 a 200 colônias; 3= de 201 a 300 colônias; 4= de 301 a 400 colônias; 5= de 401 a 500 colônias e 6 = acima de 501 colônias.

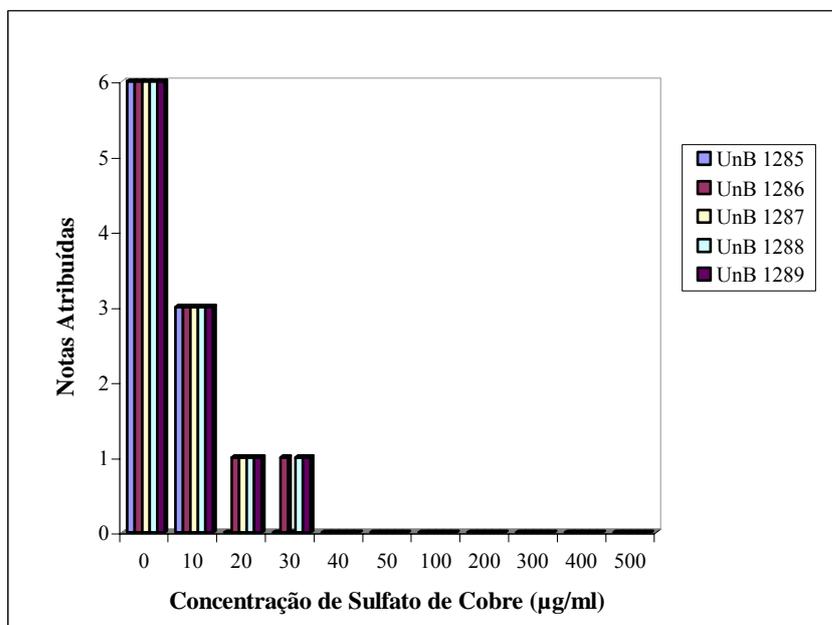
Em todos os tratamentos, em ambos os meios houve um decréscimo do número de colônias bacterianas, com o aumento da concentração do produto, quando comparado com o controle que recebeu nota máxima por conter mais de 501 colônias. Observando-se o crescimento ou inibição das colônias considerou-se como concentração mínima inibitória (CMI), a menor concentração do produto que impediu o crescimento bacteriano.

No tratamento com sulfato de cobre, a CMI para todos os isolados no meio 523 foi de 300 µg/ ml, onde houve maior tolerância ao cobre quando comparado ao meio MMCC que apresentou a CMI de 30 µg/ ml para os isolados UnB 1286, 1288 e 1289. No meio 523, a partir de 100 µg/ ml observou-se pequena diferença no crescimento bacteriano entre os isolados UnB 1286, 1287 e 1289, comparados aos

demais isolados. Essa diferença, porém, deixou de existir em relação ao isolado UnB 1288 em 200 µg/ ml, destacando-se dos isolados UnB 1285 e 1289. Em 300 µg/ ml o número de colônias bacterianas foi bastante reduzido para todos os isolados, principalmente no UnB 1286 e 1289 que receberam nota 1. A partir da concentração de 400 µg/ ml não se verificou crescimento em nenhum isolado. No meio MMCC com 10 µg/ ml os isolados apresentaram nota 3, com crescimento reduzido, comparado ao controle. Com 20 µg/ ml somente o isolado UnB 1285 mostrou ser sensível ao cobre. Com 30 µg/ ml os isolados UnB 1286, 1288 e 1289 mostraram ser tolerantes ao cobre, com pouco crescimento bacteriano. Concentrações superiores, não foram verificadas o crescimento (Figura 6).



(a)

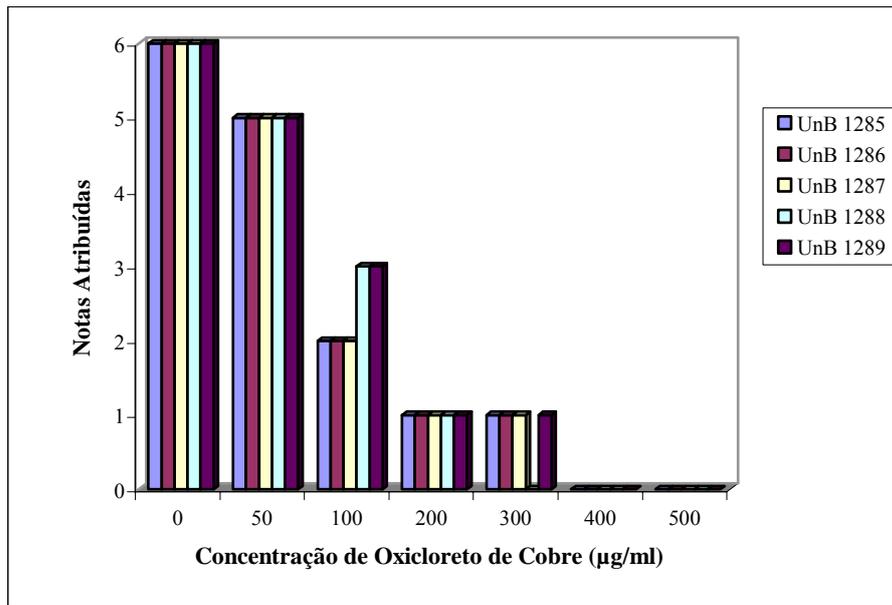


(b)

**Figura 6.** Concentração mínima inibitória (CMI) de Sulfato de cobre, contra *Erwinia psidii*, em diferentes meios: (a) meio 523; (b) meio MMCC.

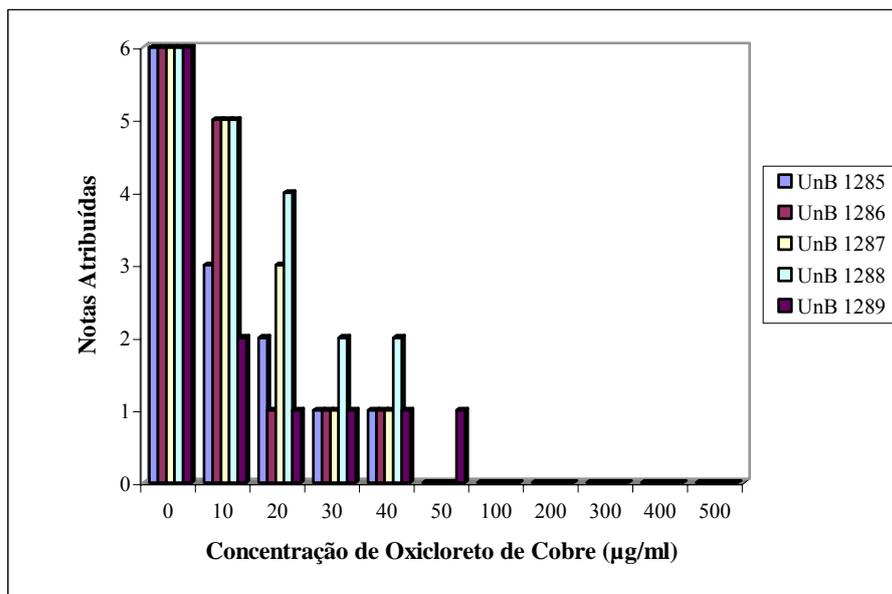
No tratamento com oxiclóreto de cobre no meio 523, a CMI para todos isolados, com exceção do UnB 1288 foi de 300 µg/ ml, enquanto que no meio MMCC, a CMI foi de 50 µg/ ml no isolado UnB 1289. No meio 523, na concentração de 50 µg/ ml todos isolados apresentaram nota 5, com pequena diferença do controle. Em 100 µg/ ml houve redução no crescimento de colônias, principalmente nos isolados UnB 1285, 1286 e 1287 recebendo nota 2; enquanto que os isolados UnB 1288 e 1289 apresentaram crescimento superior a esses. A partir de 200 µg/ ml, todos os isolados receberam nota 1, diferenciando da concentração de 300 µg/ ml, onde apenas o isolado UnB 1288 mostrou ser sensível ao cobre. No meio MMCC, a partir de 10 µg/ ml os isolados UnB 1285 e 1289 mostraram diferenças no crescimento bacteriano, em relação aos demais. Entretanto, o isolado UnB 1288 se destacou nas concentrações de 20, 30 e 40 µg/ ml apresentando maior crescimento bacteriano; porém, o isolado UnB 1289 foi o único a mostrar tolerância ao cobre na concentração de 50 µg/ ml (Figura 7).

No tratamento com hidróxido de cobre no meio 523, a CMI foi de 400 µg/ ml no isolado UnB 1286; enquanto que no meio MMCC a CMI foi de 100 µg/ ml, para os isolados UnB 1287 e 1288. No meio 523, em 50 µg/ ml houve diferenças no crescimento bacteriano entre os isolados, principalmente no UnB 1286 e 1287, quando comparado ao controle. O isolado UnB 1288 destacou-se dos demais, apresentando maior crescimento bacteriano até a concentração de 300 µg/ ml, porém somente o isolado UnB 1286 apresentou tolerância ao cobre em 400 µg/ ml, obtendo nota 1. No meio MMCC, com 50 µg/ ml houve crescimento bacteriano reduzido em todos os isolados comparando-se ao controle. Entretanto em 100 µg/ ml somente os isolados UnB 1287 e 1288 mostrou algum crescimento. Ao comparar com os tratamentos cúpricos anteriores, somente neste tratamento, no meio MMCC a tolerância ao cobre foi em concentrações superiores a 50 µg/ ml (Figura 8).



**Meio 523**

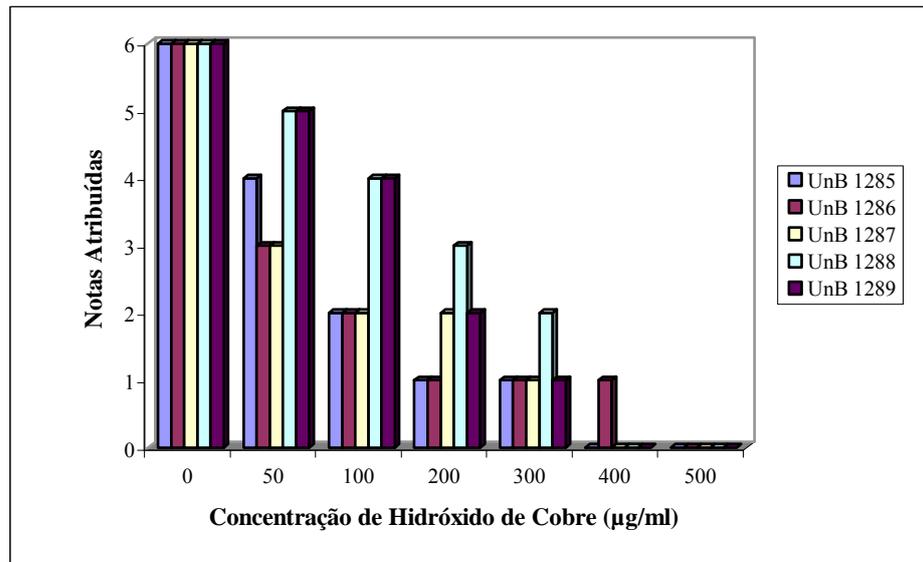
**(a)**



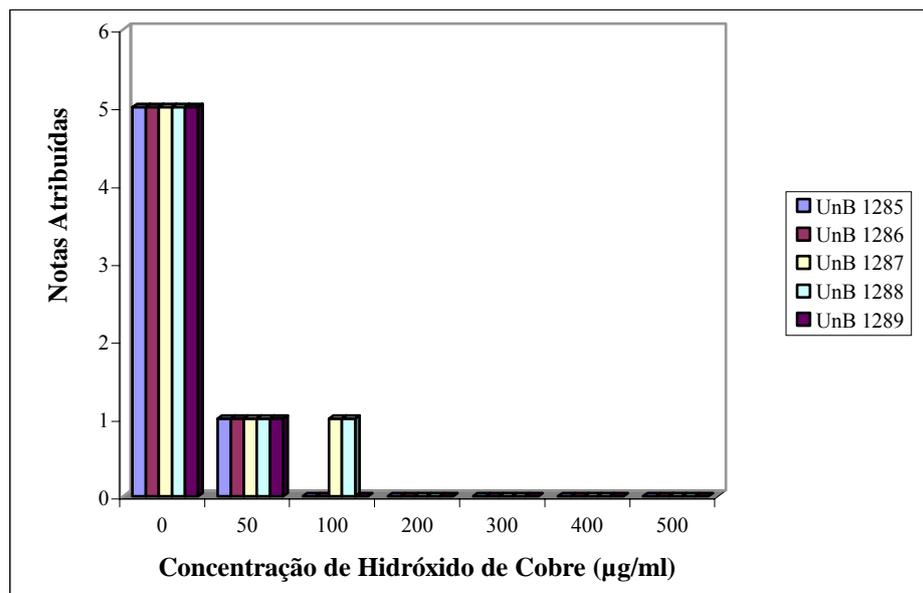
**Meio MMCC**

**(b)**

**Figura 7.** Concentração mínima inibitória (CMI) de Oxicloreto de cobre, contra *Erwinia psidii*, em diferentes meios: **(a)** meio 523; **(b)** meio MMCC.



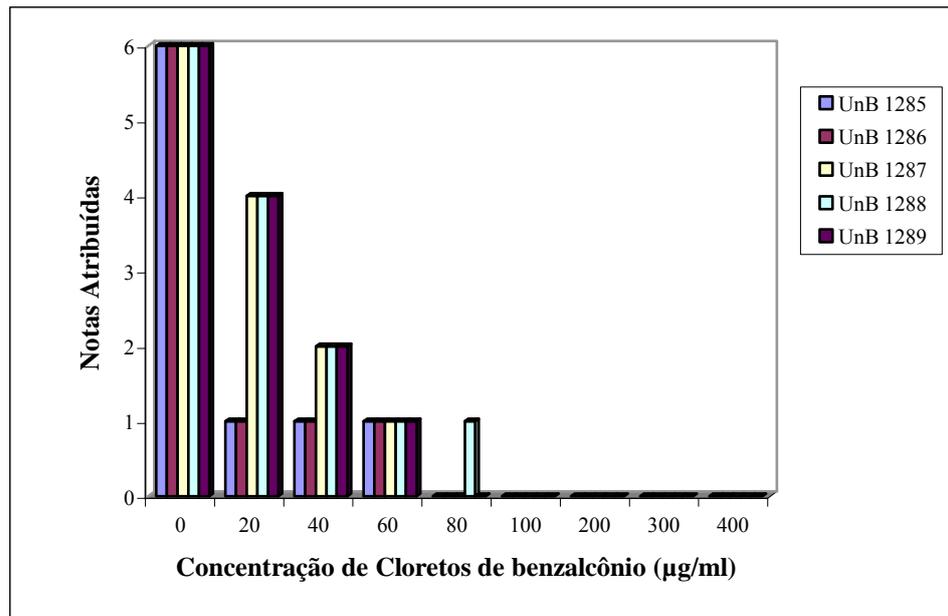
(a)



(b)

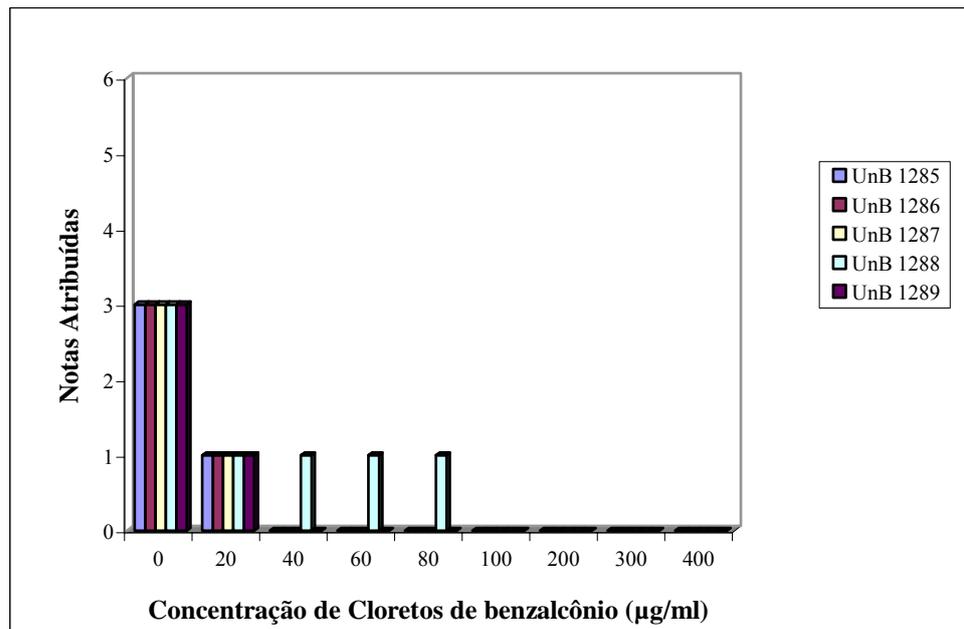
**Figura 8.** Concentração mínima inibitória (CMI) de Hidróxido de cobre, contra *Erwinia psidii*, em diferentes meios: (a) meio 523; (b) meio MMCC.

No tratamento com cloretos de benzalcônio, em ambos os meios a CMI foi de 80 µg/ ml para o isolado UnB 1288. No meio 523, na concentração de 20 µg/ ml observaram-se diferenças bastante significativas no número de colônias bacterianas para os isolados UnB 1285 e 1286, ao comparar com o controle e demais isolados. Em 60 µg/ ml todos os isolados se mostraram, aproximadamente, a mesma quantidade de colônias bacterianas recebendo nota 1. Em concentrações superiores a esta, somente o isolado UnB 1288 foi resistente. No meio MMCC, na concentração de 20 µg/ ml todos os isolados apresentaram baixo crescimento, incluindo o controle com nota 3, diferindo dos demais tratamentos. A partir de 40 µg/ ml até 80 µg/ ml observou que todos os isolados, com exceção do UnB 1288 mostraram ser suscetíveis ao produto. Em concentrações superiores, não foi verificado nenhum crescimento bacteriano (Figura 9).



Meio 523

(a)



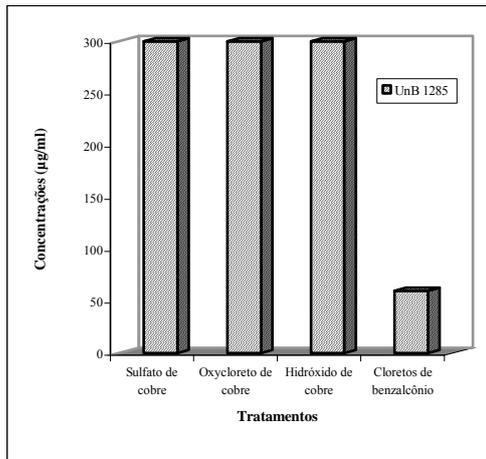
Meio MMCC

(b)

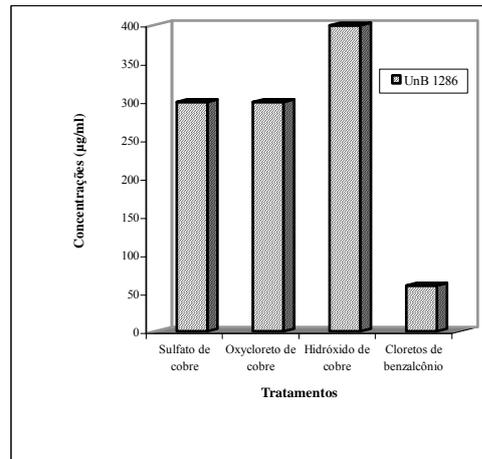
**Figura 9.** Concentração mínima inibitória (CMI) de Cloretos de benzalcônio, contra *Erwinia psidii*, em diferentes meios: (a) meio 523; (b) meio MMCC.

A diferença existente no crescimento e CMI, entre os isolados de *E. psidii* em ambos os meios, pode ser atribuída à variabilidade na tolerância ao cobre. O isolado UnB 1285, no meio 523 mostrou resultados semelhantes aos do isolado UnB 1286, diferindo no produto hidróxido de cobre, onde este último apresentou tolerância em concentrações maiores. Isso pode estar relacionado ao fato de ambos isolados procederem da mesma localização geográfica, embora terem sido obtidos de variedades distintas. O mesmo pode ter acontecido com os isolados UnB 1287 e 1289 que apresentaram os mesmos resultados, e embora sejam de propriedades diferentes, estas eram próximas, e pode ter havido a troca de mudas; visto que os isolados foram obtidos da mesma variedade. O isolado UnB 1288 mostrou resultados distintos dos demais isolados, tendo origem de pomar diferente, foi o que mostrou maior tolerância ao sulfato e hidróxido de cobre (Figura 10).

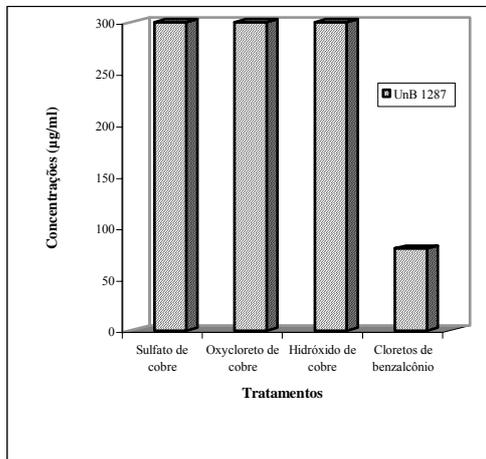
No meio MMCC, a variabilidade na tolerância ao cobre entre isolados também foi observada. O isolado UnB 1285 comparado ao UnB 1286 mostrou diferenças somente no sulfato de cobre, mostrando maior tolerância o último isolado; porém, a tolerância dos isolados UnB 1287 e 1289 aos diferentes produtos foi bastante diversificada, sendo que a tolerância do primeiro isolado, foi maior em hidróxido de cobre, enquanto que a tolerância do segundo, foi maior em oxiclreto de cobre e em hidróxido de cobre. O isolado UnB 1288 apresentou maior tolerância ao hidróxido de cobre (Figura 11).



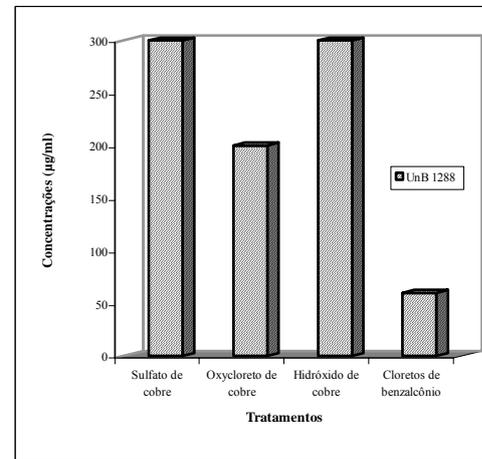
(a)



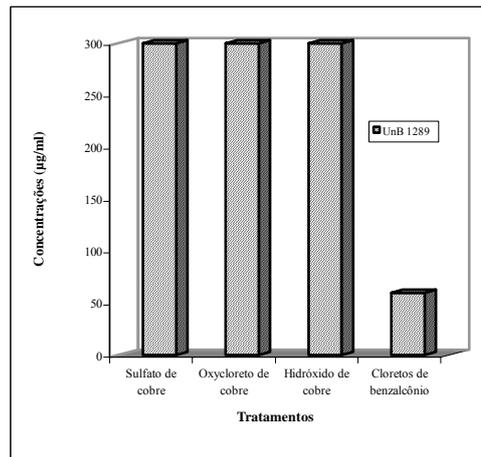
(b)



(c)

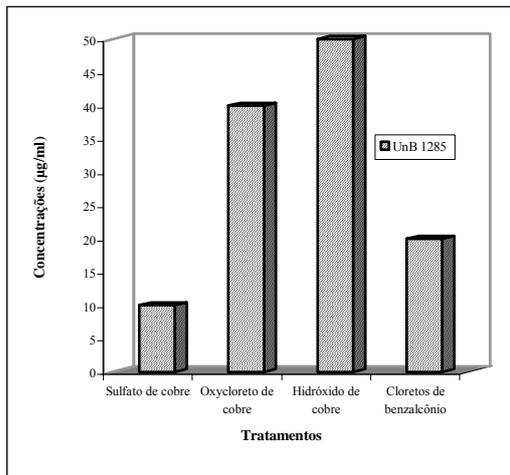


(d)

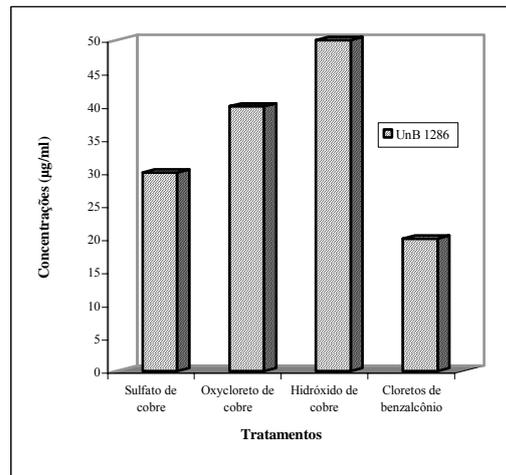


(e)

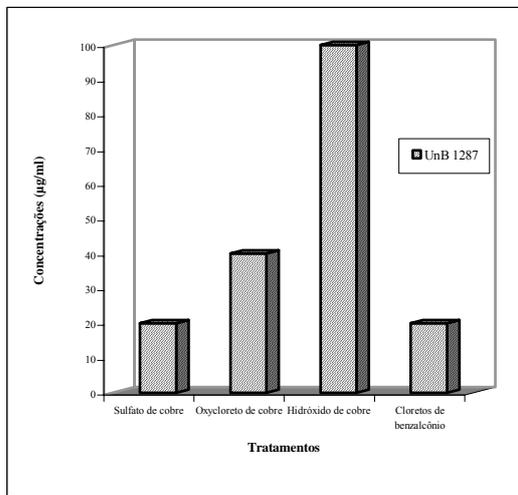
**Figura 10.** Níveis de tolerância, no meio 523, nos diferentes isolados: (a) UnB 1285; (b) UnB 1286; (c) UnB 1287; (d) UnB 1288; (e) UnB 1289.



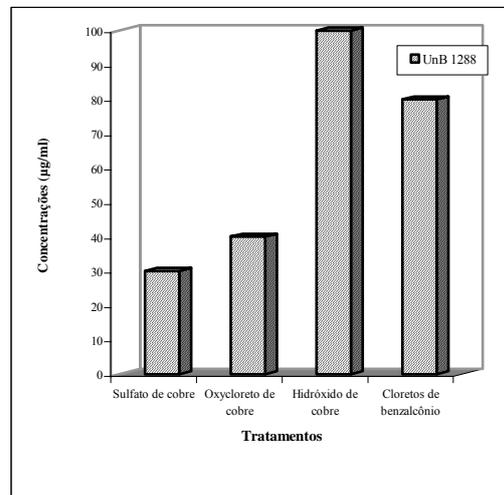
(a)



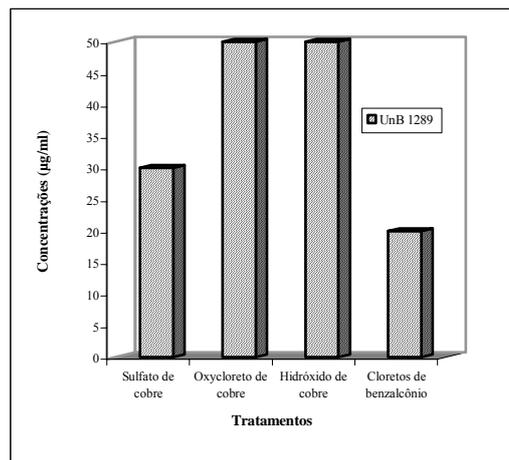
(b)



(c)



(d)



(e)

**Figura 11.** Níveis de tolerância, no meio MMCC, nos diferentes isolados: (a) UnB 1285; (b) UnB 1286; (c) UnB 1287; (d) UnB 1288; (e) UnB 1289.

#### 4.4- Sensibilidade de *Erwinia psidii* “*in vitro*” a diferentes tipos de antibióticos.

Em relação à sensibilidade dos isolados de *E. psidii* UnB 1285, 1286, 1287, 1288, 1289 e o isolado tipo IBSBF 435 houve diferença estatística significativa entre os diferentes princípios ativos testados.

Para o isolado UnB 1285, o antibiótico Rifampicina foi o mais eficiente apresentando maior raio do halo de inibição, seguido por Ampicilina. No isolado UnB 1286 os princípios ativos Sulfonamida, Rifampicina e Ampicilina foram mais eficientes (Tabela 7). Em todos os isolados observaram-se diferentes tamanhos no raio do halo de inibição, mostrando diferentes níveis de ação (Figura 12). Nos isolados UnB 1285 e 1286, verificou-se que o princípio ativo Ácido Nalidíxico não apresentou nenhum efeito sobre o crescimento bacteriano. Já nos demais isolados, observou-se que o mesmo princípio ativo apresentou maior raio do halo de inibição. Observou-se também que os isolados UnB 1285 e 1286, foram mais sensíveis à ação dos antibióticos.



**Figura 12.** Halos de inibição dos antibióticos, do isolado UnB 1286: Cloranfenicol 3,42 cm; Ampicilina 3,80 cm; Gentamicina 1,05 cm e Oxacilina sem efeito.

**Tabela 7.** Sensibilidade de isolados de *Erwinia psidii* à ação de diferentes antibióticos.

Antibióticos	Concentração	RHI*(cm)	Antibióticos	RHI (cm)	Antibióticos	RHI(cm)						
	(µg/ disco)	UnB 1285		UnB 1286		UnB 1287		UnB 1288		UnB 1289		IBSBF
	(un/ disco)											435
Rifampicina	5µg	4,10a**	Sulfonamida	3,90a	Ácido Nalidíxico	4,50a	Cloranfenicol	3,62a	Ácido Nalidíxico	3,85a	Ácido Nalidíxico	4,27a
Ampicilina	10µg	3,80ab	Rifampicina	3,85a	Cloranfenicol	4,10b	Ácido Nalidíxico	3,45a	Sulfonamida	3,62b	Cloranfenicol	3,75b
Tetraciclina	30µg	3,55bc	Ampicilina	3,80a	Tetraciclina	3,20c	Tetraciclina	3,17b	Tetraciclina	3,37c	Tetraciclina	3,47c
Sulfonamida	300µg	3,52bc	Cloranfenicol	3,42b	Amicacina	2,70d	Sulfonamida	2,90c	Cefalotina	3,17cd	Sulfazotrina	3,02d
Penicilina	10un	3,45bc	Tetraciclina	3,37bc	Ampicilina	2,70d	Cefalotina	2,60d	Cloranfenicol	3,15d	Ampicilina	2,72e
Cloranfenicol	30µg	3,25cd	Penicilina	3,35bc	Sulfonamida	2,55d	Ampicilina	2,55d	Ampicilina	3,12d	Cefalotina	2,67e
Vancomicina	30µg	2,92d	Cefalotina	3,20bc	Sulfazotrina	2,17e	Nitrofurantoína	2,10e	Sulfazotrina	2,62e	Nitrofurantoína	1,82f
Eritromicina	15µg	2,55e	Vancomicina	3,12c	Cefalotina	2,12ef	Amicacina	1,30f	Lincomicina	2,22f	Gentamicina	1,17g
Clindamicina	2µg	2,22ef	Sulfazotrina	3,12c	Neomicina	1,92fg	Rifampicina	1,22fg	Nitrofurantoína	2,20f	Rifampicina	1,17g
Nitrofurantoína	300µg	2,00fg	Eritromicina	2,75d	Gentamicina	1,87g	Neomicina	1,10gh	Rifampicina	1,65g	Amicacina	1,10g
Bacitracina	10un	1,80g	Clindamicina	2,50d	Rifampicina	1,57h	Gentamicina	1,00h	Amicacina	1,17h	Bacitracina	0,00h
Cefalotina	30µg	1,75g	Lincomicina	1,80e	Nitrofurantoína	1,50h	Estreptomicina	0,97h	Estreptomicina	1,02h	Clindamicina	0,00h
Lincomicina	2µg	1,75g	Amicacina	1,60ef	Estreptomicina	1,02i	Bacitracina	0,00i	Neomicina	1,00h	Eritromicina	0,00h
Amicacina	30µg	1,15h	Bacitracina	1,60ef	Bacitracina	0,00j	Clindamicina	0,00i	Gentamicina	1,00h	Estreptomicina	0,00h
Sulfazotrina	25µg	1,07h	Nitrofurantoína	1,42f	Clindamicina	0,00j	Eritromicina	0,00i	Bacitracina	0,00i	Lincomicina	0,00h
Gentamicina	10µg	1,07h	Estreptomicina	1,10g	Eritromicina	0,00j	Penicilina	0,00i	Clindamicina	0,00i	Neomicina	0,00h
Estreptomicina	10µg	1,05h	Gentamicina	1,05g	Penicilina	0,00j	Vancomicina	0,00i	Eritromicina	0,00i	Penicilina	0,00h
Neomicina	30µg	1,02h	Neomicina	1,02g	Vancomicina	0,00j	Lincomicina	0,00i	Penicilina	0,00i	Vancomicina	0,00h
Ácido Nalidíxico	30µg	0,00i	Ácido Nalidíxico	0,00h	Lincomicina	0,00j	Sulfazotrina	0,00i	Vancomicina	0,00i	Sulfonamida	0,00h
Oxacilina	1µg	0,00i	Oxacilina	0,00h	Oxacilina	0,00j	Oxacilina	0,00i	Oxacilina	0,00i	Oxacilina	0,00h

\*RHI- Raio do Halo de Inibição

\*\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os antibióticos Penicilina, Vancomicina e Bacitricina foram bastante eficientes no controle de *E. psidii*, somente nos isolados UnB 1285 e 1286; enquanto que a Cefalotina e Ampicilina foram eficientes contra todos os isolados, de acordo com o raio do halo de inibição (Tabela 7). O antibiótico Oxacilina foi o único que não exerceu nenhum efeito sobre o crescimento bacteriano, em todos os isolados (Tabela 7). Já os princípios ativos Neomicina, Estreptomicina, Gentamicina e Amicacina, apresentaram baixo efeito para todos isolados, com exceção do isolado tipo IBSBF 435; enquanto que Amicacina apresentou efeito mediano para o isolado UnB 1287 (Tabela 7).

Houve diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey entre todos isolados, e verificou-se ainda que os antibióticos estudados apresentaram melhor eficiência no controle do isolado UnB 1286 de *E. psidii*, por apresentar maior média do raio do halo de inibição (Tabela 8). Os isolados UnB 1289 e 1287 foram significativamente semelhantes, o mesmo tendo acontecido com os isolados UnB 1288 e o tipo IBSBF 435, que apresentaram menor média do raio do halo de inibição (Tabela 8).

**Tabela 8.** Valores médios do raio do halo de inibição (cm) dos antibióticos, em diferentes isolados de *Erwinia psidii*.

Isolados de <i>Erwinia psidii</i>	Médias do *RHI (cm) dos antibióticos
UnB 1286	2,30a**
UnB 1285	2,10b
UnB 1289	1,66c
UnB 1287	1,60c
UnB 1288	1,30d
IBSF 435	1,26d

\*RHI- Raio do Halo de Inibição

\*\* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**4.5- Estudo do efeito de formulações de fungicidas cúpricos e de cloretos de benzalcônio, na incidência de *Erwinia psidii* e expressão de sintomas de fitotoxicidade em goiaba (*Psidium guajava*), em casa de vegetação.**

No estudo da fitotoxicidade foi verificado que os produtos cúpricos causaram esses sintomas nas folhas de goiabeira, principalmente o tratamento com sulfato de cobre. Verificou-se ainda que a fitotoxicidade causada pelos produtos influenciaram o crescimento das plantas. Os resultados foram analisados conforme o desenvolvimento das brotações (aproximadamente 29 dias após a poda) nas variedades de goiaba, após a aplicação semanal dos fungicidas. Segundo os resultados, houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade na análise de variância das médias, do tamanho das brotações (cm), entre os tratamentos (fungicidas), em diferentes variedades (Tabela 9).

**Tabela 9.** Médias do desenvolvimento das brotações (cm), pelo efeito da fitotoxicidade de diferentes formulações de fungicidas, em diferentes variedades de goiaba, 29 dias após a poda.

Tratamentos	Comum	Pedro Sato	Ogawa	Bicudo	Paluma
Cloretos de benzalcônio	22,53a*	21,93a	24,05a	26,78a	19,22a
Oxicloreto de cobre	20,87a	20,61a	18,62ab	27,66a	20,68a
Hidróxido de cobre	20,61a	19,85ab	18,15ab	24,99a	16,70ab
Controle	17,79a	16,23ab	18,78ab	27,20a	17,59ab
Sulfato de cobre	15,71a	11,13b	14,07b	15,30b	8,95b

Médias originais das brotações, medidas em centímetros.

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na variedade Comum, não houve diferença significativa na média do tamanho das brotações, entre os tratamentos. No entanto, nas demais variedades foi observada diferença significativa ao nível de 5% no teste de Tukey. Na variedade Pedro Sato e Paluma, o tratamento com sulfato de cobre foi estatisticamente

diferente dos tratamentos com cloretos de benzalcônio e oxiclureto de cobre; entretanto foram estatisticamente semelhantes aos demais tratamentos. Na variedade Ogawa houve diferença significativa entre os tratamentos com cloretos de benzalcônio e sulfato de cobre, no entanto foram estatisticamente semelhantes entre todos os tratamentos. Na variedade Bicudo, observou-se diferença significativa entre o tratamento com sulfato de cobre e os demais tratamentos, mostrando melhor desenvolvimento nas brotações comparado com todas as variedades (Tabela 9).

No tratamento com sulfato de cobre, verificou-se maior grau de fitotoxicidade nas folhas de goiabeira, reduzindo significativamente o crescimento das brotações em todas as variedades. No entanto, os tratamentos com oxiclureto de cobre e hidróxido de cobre foram significativamente semelhantes ao controle (Tabela 9). O tratamento com cloretos de benzalcônio não induziu problemas de fitotoxicidade, além de ter sido observado um melhor desenvolvimento das brotações nas variedades Comum, Pedro Sato e Ogawa, enquanto que o oxiclureto de cobre mostrou ser menos tóxico para as variedades Bicudo e Paluma (Tabela 9).

No estudo da incidência da doença observou-se diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade na análise de variância das porcentagens de plantas infectadas no nível 4, entre os tratamentos. O tratamento com sulfato de cobre mostrou menor porcentagem de plantas doentes, comparada com o controle. No entanto, foi estatisticamente semelhante aos demais tratamentos. O tratamento com hidróxido de cobre foi significativamente semelhante ao controle, apresentando 13,2% de plantas doentes (Tabela 10) (Figura 13).

**Tabela 10.** Efeito de diferentes formulações de fungicidas, na avaliação da incidência de *Erwinia psidii*, em plantas de goiaba, em casa de vegetação.

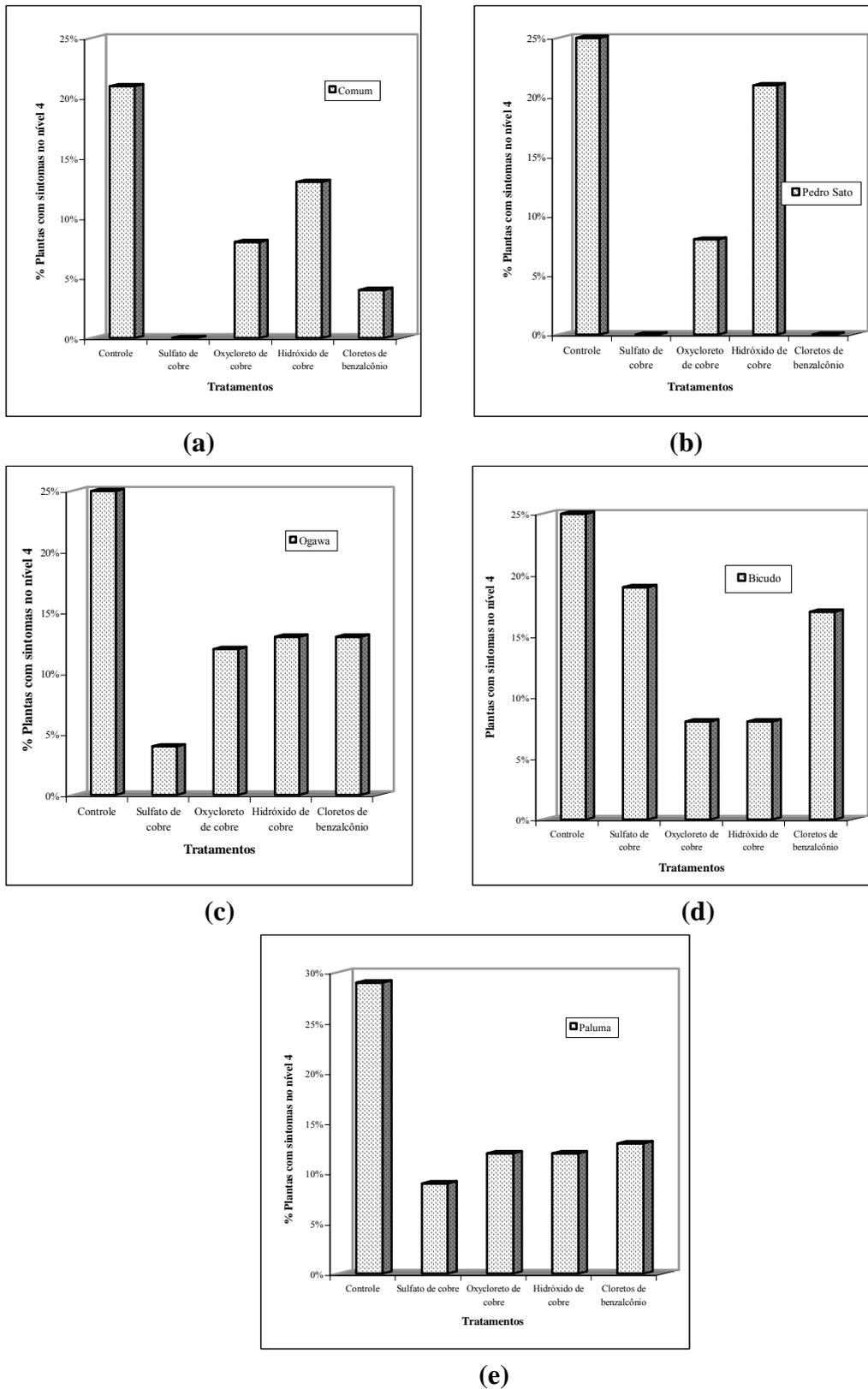
<b>Tratamentos</b>	<b>% de plantas infectadas no nível 4</b>
Controle	24,87a*
Hidróxido de cobre	13,20ab
Oxycloreto de cobre	9,86b
Cloretos de benzalcônio	9,83b
Sulfato de cobre	9,07b

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 13.** Sintomas de *Erwinia psidii*, em plantas de goiaba, em diferentes tratamentos: **(A)** controle; **(B)** Hidróxido de cobre; **(C)** Oxiclreto de cobre; **(D)** Cloretos de benzalcônio; **(E)** Sulfato de cobre.

Em todas as variedades, com exceção do Bicudo, o tratamento com sulfato de cobre mostrou ser mais eficiente no controle da doença; enquanto que na variedade Bicudo os tratamentos com oxiclureto de cobre e hidróxido de cobre mostraram melhores resultados. Na variedade Pedro Sato, o tratamento com cloretos de benzalcônio mostrou ser tão eficiente, quanto o tratamento com sulfato de cobre. Já na variedade Paluma o sulfato de cobre foi o mais eficiente, enquanto que os cloretos de benzalcônio mostrou resultados semelhantes aos demais tratamentos (Figura 14).



**Figura 14.** Eficiência de diferentes formulações de fungicidas na incidência de bacteriose causada por *Erwinia psidii*, em diferentes variedades: (a) Comum; (b) Pedro Sato; (c) Ogawa; (d) Bicudo; (e) Paluma.

De um modo geral, todas as variedades apresentaram baixa taxa de infecção, quando tratadas e não tratadas com fungicidas. Na análise de variância das médias de percentagens de plantas infectadas no nível 4, não houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade, entre as variedades, em todos os tratamentos (Tabela 11).

**Tabela 11.** Avaliação da incidência de *Erwinia psidii*, em diferentes variedades de goiaba, em casa de vegetação.

Variedades de goiaba	% de plantas infectadas
Bicudo	18,33a*
Paluma	14,93a
Ogawa	13,20a
Pedro Sato	10,80a
Comum	9,07a

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### **4.6- Estudo do efeito de formulações de fungicidas cúpricos e de cloretos de benzalcônio, na incidência de *Erwinia psidii* e expressão de sintomas de fitotoxidade em goiaba (*Psidium guajava*), no campo.**

Foram observados sintomas de fitotoxidade nos frutos, em todos os estádios avaliados diferenciando nos níveis de fitotoxidez e tratamentos (Tabela 12). Em ambas variedades, no estádio de inflorescência ou frutos com diâmetro menor ou igual a 15 mm, não foram observados sintomas severos, cujos frutos apresentam pontuações escuras e visíveis, sendo rejeitados pelo mercado (nota 3). Houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade na análise de variância, das médias de percentagens de plantas entre os tratamentos (fungicidas) e entre os níveis de fitotoxidez.

Na variedade Pedro Sato, no estádio de inflorescência ou frutos com diâmetro menor ou igual a 15 mm foi observada diferença significativa ao nível de

5% no teste de Tukey entre os tratamentos do nível 0 (sem sintomas) e nível 1 (sintomas leves); no entanto não houve diferença significativa entre os tratamentos dos níveis 2 (sintomas moderados) e 3 (sintomas severos). Ao analisarmos os níveis de fitotoxidez, verificou-se que ocorreu diferença significativa nos níveis 0 e 1 em relação os níveis 2 e 3. De um modo geral, os frutos apresentaram sintomas leves mostrando-se superficiais, sendo 28% ocasionado pelo sulfato de cobre (Tabela 12).

No estágio subsequente, frutos pequenos ou com diâmetro entre 16 e 30 mm foi observada diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey entre todos os tratamentos, em todos níveis. Em todos tratamentos cúpricos foram observadas evoluções dos sintomas de fitotoxidade, passando de leve para moderado; somente no tratamento com sulfato de cobre houve um incremento no número de frutos com fitotoxidade, variando de 8,5% para 68,25% de frutos com sintomas severos. No nível 1, no tratamento com oxiclreto de cobre diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, apresentando 58,25% de frutos com sintomas leves. No nível 2, todos os tratamentos cúpricos foram estatisticamente semelhantes, sendo que os tratamentos com cloretos de benzalcônio e controle diferiram estatisticamente do sulfato de cobre. Em relação aos níveis de fitotoxidez, foi verificada diferença significativa entre todos os níveis, com exceção do nível 3 que foi estatisticamente semelhante aos níveis 1 e 2 (Tabela 12).

**Tabela 12.** Efeito de diferentes formulações de fungicidas na expressão de sintomas de fitotoxidade em frutos de diferentes tamanhos de goiabeira, variedade Pedro Sato, em condição de campo.

Tratamentos	Porcentagem de Frutos com Fitotoxidade											
	Estádios Avaliados nos Frutos											
	Inflorescência ( $\leq 15$ mm)				Frutos pequenos ( $16 \geq 30$ mm)				Frutos médios ( $\geq 31$ mm)			
	0*	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Hidróxido de Cobre	98,25aA	1,75bB	0,00aC	0,00aC	80,00aA	14,75bB	5,00abC	0,00bBC	55,00bA	40,00aB	5,00bB	0,00bB
Oxicloreto de Cobre	88,50aA	11,50bB	0,00aC	0,00aC	26,75bA	58,25aB	15,00abC	0,00bBC	13,50cA	40,50aB	37,00aB	9,25bB
Sulfato de Cobre	72,00bA	28,00aB	0,00aC	0,00aC	2,50bA	8,50bB	20,75aC	68,25aBC	0,00cA	0,75bB	7,75bB	91,50aB
Cloretos de benzalcônio	99,25aA	0,75bB	0,00aC	0,00aC	85,75aA	14,25bB	0,00bC	0,00bBC	80,25aA	19,75abB	0,00bB	0,00bB
Controle	100,00aA	0,00bB	0,00aC	0,00aC	100,00aA	0,00bB	0,00bC	0,00bBC	100,00aA	0,00bB	0,00bB	0,00bB

Médias seguidas da mesma letra, minúscula (na coluna) e maiúscula (na linha), não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\*níveis de fitotoxidez:

0- sem sintomas

1- sintomas leves

2- sintomas moderados

3- sintomas severos

No estágio de frutos médios ou com diâmetros maior ou igual a 31 mm, observou-se que todos os tratamentos e entre os níveis houve diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey. No nível 0, os tratamentos com cloretos de benzalcônio e controle foram estatisticamente semelhantes apresentando maior percentagem de frutos sem sintomas, comparado com os demais tratamentos. No nível 1, o tratamento com sulfato de cobre foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos cúpricos e semelhante aos tratamentos controle e com cloretos de benzalcônio, este último não diferiu estatisticamente dos tratamentos cúpricos. No nível 2, o tratamento com oxiclureto de cobre foi significativamente diferente dos demais tratamentos, apresentando 37% de frutos com sintomas moderados; porém aceitos com restrição para o mercado de frutas frescas. No nível 3, o tratamento com sulfato de cobre foi estatisticamente diferente de todos os tratamentos, ocorrendo uma evolução na percentagem de frutos com fitotoxidez do nível 1 para o nível 3, variando de 0,75% para 91,5% de frutos com sintomas severos, com pontuações escuras bem visíveis, sendo rejeitados pelo mercado de frutas frescas. Analisando os níveis de fitotoxidez, verificou-se que ocorreu diferença significativa do nível 0 em relação aos demais níveis (Tabela 12).

Na variedade Comum, no estágio de inflorescência ou frutos com diâmetro menor ou igual a 15 mm, foi observada diferença significativa ao nível de 5% no teste de Tukey em todos os tratamentos do nível 0 e 1; no entanto os níveis 2 e 3 foram estatisticamente semelhantes. No nível 0, os tratamentos com oxiclureto de cobre e sulfato de cobre diferiram estatisticamente entre si e entre os demais tratamentos. No nível 1, o tratamento com sulfato de cobre foi estatisticamente diferente de todos os tratamentos, enquanto que os tratamentos com hidróxido de cobre, cloretos de benzalcônio, juntamente com o controle foram semelhantes. No nível 2 houve 2,5% de frutos com sintomas moderados, ocasionados pelo sulfato de cobre. Analisando os níveis de fitotoxidez, verificou-se que ocorreu diferença significativa no nível 0 e 1, em relação aos níveis 2 e 3 (Tabela 13).

**Tabela 13.** Efeito de diferentes formulações de fungicidas na expressão de sintomas de fitotoxicidade em frutos de diferentes tamanhos de goiabeira, variedade Comum, em condição de campo.

Tratamentos	Porcentagem de Frutos com Fitotoxicidade											
	Estádios Avaliados nos Frutos											
	Inflorescência ( $\leq 15$ mm)				Frutos pequenos ( $16 \geq 30$ mm)				Frutos médios ( $\geq 31$ mm)			
	0*	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Hidróxido de Cobre	99,25aA	0,75cB	0,00aC	0,00aC	71,75bA	25,75bB	2,50bcC	0,00bB	15,75bA	52,50aC	25,00bC	6,50cB
Oxícloreto de Cobre	82,50bA	17,50bB	0,00aC	0,00aC	32,00cA	51,75aB	15,75aC	0,75bB	8,25bA	30,75bC	43,25aC	17,50bB
Sulfato de Cobre	46,00cA	51,50aB	2,50aC	0,00aC	5,00dA	8,25cB	11,00abC	75,75aB	0,00bA	0,00cC	2,50cC	97,50aB
Cloretos de benzalcônio	100,00aA	0,00cB	0,00aC	0,00aC	98,25aA	1,75cB	0,00cC	0,00bB	85,00aA	6,75cC	0,00cC	0,00cB
Controle	100,00aA	0,00cB	0,00aC	0,00aC	100,00aA	0,00cB	0,00cC	0,00bB	100,00aA	0,00cC	0,00cC	0,00cB

Médias seguidas da mesma letra, minúscula (na coluna) e maiúscula (na linha), não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\*níveis de fitotoxidez:

0- sem sintomas

1- sintomas leves

2- sintomas moderados

3- sintomas severos

No estágio subsequente, (frutos pequenos) foi observada diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey entre todos os tratamentos, em todos os níveis. No nível 0, os tratamentos cloretos de benzalcônio, juntamente com o controle foram significativamente semelhantes, o mesmo sendo observado na variedade Pedro Sato, diferindo dos demais tratamentos. No nível 1, os tratamentos com hidróxido de cobre e oxiclreto de cobre foram estatisticamente diferentes entre si e entre os demais tratamentos. No nível 2, o tratamento com oxiclreto de cobre foi estatisticamente diferente de todos os tratamentos, com exceção do sulfato de cobre, este por sua vez foi estatisticamente semelhante ao hidróxido de cobre e este estatisticamente semelhante aos demais tratamentos. No nível 3, como têm ocorrido na variedade Pedro Sato houve aumento na porcentagem de frutos com sintomas severos, no tratamento com sulfato de cobre; e também aumento na porcentagem de frutos com esses sintomas, no tratamento com oxiclreto de cobre. Em relação aos níveis de fitotoxidez houve diferença significativa entre os níveis 0, 1 e 2, sendo que o nível 3 foi estatisticamente semelhante ao nível 1 em todos os tratamentos (Tabela 13).

No estágio de frutos médios foi observada diferença significativa ao nível de 5% no teste de Tukey entre os tratamentos, em todos os níveis. No nível 0, os tratamentos com cloretos de benzalcônio e controle foram estatisticamente semelhantes, o mesmo sendo observado na variedade Pedro Sato diferindo dos demais tratamentos. No nível 1, os tratamentos com hidróxido de cobre e oxiclreto de cobre diferiram estatisticamente entre si e entre os tratamentos, mostrando que a maior porcentagem de frutos com fitotoxidade ocorreu no tratamento com hidróxido de cobre, indicando 52,5% de frutos com sintomas leves. No entanto, no nível 2 essa maior porcentagem ocorreu no tratamento com oxiclreto de cobre, indicando 43,25% de frutos com sintomas moderados. Houve diferença significativa entre os tratamentos com oxiclreto de cobre e hidróxido de cobre; enquanto que os tratamentos com sulfato de cobre, cloretos de benzalcônio e juntamente com o controle foram estatisticamente semelhantes. No nível 3, o tratamento com sulfato de cobre apresentou maior porcentagem de frutos com sintomas severos de fitotoxidade, diferindo estatisticamente do tratamento com

oxicloreto de cobre e dos demais tratamentos. Ao analisarmos os níveis de fitotoxidez, entre os tratamentos, verificou-se diferença significativa entre os níveis 0 e 3 em relação aos níveis 1 e 2 (Tabela 13).

Com base nos resultados, pode-se dizer que houve diferença de níveis de fitotoxidez entre os tratamentos e entre os estádios avaliados (Figura 15).



**Figura 15.** Sintomas de fitotoxidade em frutos, ocasionados por diferentes fungicidas: (A) controle; (B) Cloretos de benzalcônio; (C) Oxicloreto de cobre; (D) Hidróxido de cobre; (E) Sulfato de cobre.

No estudo da incidência da doença, verificou-se que houve diferença significativa ao nível de 5% no teste de Tukey para variedade Pedro Sato, e na variedade Comum, todos os tratamentos foram estatisticamente semelhantes (Tabela 14). Na variedade Pedro Sato, o tratamento com cloretos de benzalcônio foi estatisticamente diferente do tratamento com sulfato de cobre e hidróxido de cobre, mostrando maior percentagem de ramos de frutificação com a doença (35,75%). O tratamento com oxiclreto de cobre, juntamente com o controle foi estatisticamente semelhante a todos os tratamentos (Tabela 14).

**Tabela 14.** Efeito de diferentes formulações de fungicidas no controle da bacteriose, causada por *Erwinia psidii*, em ramos de frutificação de goiabeira em condição de campo, expresso em percentagem de ramos com sintomas.

Tratamentos	Pedro Sato	Comum
Cloretos de benzalcônio	35,75a*	14,50a
Controle	13,25ab	31,75a
Oxiclreto de cobre	12,50ab	27,25a
Sulfato de cobre	10,75b	17,50a
Hidróxido de cobre	9,25b	20,75a

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## 5- DISCUSSÃO

Os seis isolados caracterizados quanto às propriedades bioquímicas e fisiológicas foram classificados como *Erwinia psidii* de acordo com Rodrigues Neto *et al.* (1987), Oliveira *et al.* (2000), Uesugi *et al.* (2001) e Coelho *et al.* (2002a). Com relação ao teste de podridão mole em batata, a reação foi negativa para todos os isolados; visto que a bactéria *E. psidii* pertence ao grupo “amylovora”, não causadoras de podridão mole. Rodrigues Neto *et al.* (1987), em seu trabalho original de caracterização de *Erwinia psidii*, mostraram que a bactéria deveria ser incluída no grupo “amylovora” por induzir lesões necróticas secas em tecidos verdes e ausência de enzimas pectolíticas, confirmando, portanto, o resultado desse teste.

No estudo da resistência genética, verificou-se que todas as variedades foram suscetíveis à bactéria *E. psidii*, pelos dois métodos de inoculação e que os isolados diferem quanto ao grau de agressividade. As variedades Pedro Sato, Ogawa e Paluma mostraram alta suscetibilidade à quase todos isolados, em ambos métodos de inoculação. No trabalho de Coelho *et al.* (2002a), foram reproduzidos os sintomas de *Erwinia psidii* através de inoculação em mudas sadias e jovens das variedades Ogawa e Pedro Sato, consideradas suscetíveis. A suscetibilidade da variedade Paluma também foi observada em pesquisas com nematóides. Torres *et al.* (2004) verificaram a suscetibilidade dessa variedade em plantios comerciais de goiabeira, devido ao ataque de *Meloidogyne mayaguensis* causando deficiência dos sistemas radiculares. Entretanto Rossi *et al.* (2002) mostraram resistência da mesma após a inoculação de 5000 ovos por planta de *Meloidogyne incognita* raça 2 e *Meloidogyne javanica*, não apresentando deformidade na raiz.

Visando a obtenção de cultivares resistentes à bacteriose, pesquisas adicionais são necessárias. De acordo com Nakazone e Paull (1998), citado por Ribeiro & Pommer (2004), a goiaba pode ter hibridação controlada visando a resistência a pragas ou doenças, pois é possível a obtenção de várias sementes da fruta, e afirmam ainda, que progênies resultantes de polinização aberta podem ser adequadas para programas de desenvolvimento de novas cultivares.

Quanto aos resultados do estudo “*in vitro*”, da sensibilidade da bactéria a diferentes formulações cúpricas e aos cloretos de benzalcônio, houve diferenças no crescimento bacteriano em meio contendo cobre e cloretos de benzalcônio, dos isolados de *E. psidii*, bem como diferença no grau de tolerância a esses produtos, de acordo com meio de cultura utilizado. Resultado semelhante foi obtido por Oliveira (2003) que, estudando 5 isolados de *E. psidii* de diferentes localidades, mostrou que somente um isolado foi resistente a 100 µg/ ml de sulfato de cobre no meio MMCC e 3 isolados resistentes a 400 µg/ ml no meio 523. Uesugi *et al.* (2005), estudando a sensibilidade de diferentes estirpes de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ao cobre, verificaram que em sulfato de cobre, no meio 523, houve crescimento até 400 µg/ ml e no meio MMCC, 40 µg/ ml; em oxiclreto de cobre, no meio 523 até 500 µg/ ml e no meio MMCC, 50 µg/ ml e com hidróxido de cobre, no meio 523 até 800 µg/ ml e no meio MMCC, 100 µg/ ml. Esses dados confirmam resultados de Silva & Lopes (1995), em estudo com outra espécie de bactéria, que verificaram a variação no crescimento de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em diferentes meios de cultura contendo cobre. Menkissoglu & Lindow (1991) concluíram que íons de cobre adicionados aos meios de cultura podem formar complexos não tóxicos para as bactérias. Trevors (1987), Zevenhuizen *et al.* (1979), concluíram por sua vez, que alguns meios de cultura têm maior capacidade de complexar o cobre adicionado aos mesmos. Por esta razão utilizou-se o meio MMCC, o qual Pohronezny *et al.* (1992) afirmam ter baixa capacidade de complexar o cobre.

De acordo com os resultados, quatro isolados (80%) cresceram no meio MMCC, suplementados com sulfato de cobre em 20 µg/ ml e somente três isolados cresceram na concentração de 30 µg/ ml (Figura 6). Resultados semelhantes foram mostrados por Silva & Lopes (1995), em que 74% dos isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* se desenvolveram a 100 µg/ ml de sulfato de cobre, neste mesmo meio e somente um isolado foi capaz de se desenvolver a 350 µg/ ml.

No presente trabalho, todos os isolados apresentaram CMI de cobre mais baixa no meio MMCC, quando comparado ao meio 523, confirmando os resultados apresentados por Silva & Lopes (1995). Estudos realizados por Bird *et al.* (1985), mostraram que o cobre pode ser modificado na presença de agar, e que

provavelmente podem existir outros fatores e componentes que influenciam na capacidade de complexar cobre, além da composição do meio. Por estes motivos, meios de crescimento não podem ser tratados como um sistema quimicamente inerte com função de suportar o crescimento biológico, e a possibilidade de encontrar interações adversas entre metais e meio de cultura é muito alta (Silva & Lopes, 1995). Segundo os autores o meio MMCC é o mais adequado a estes estudos por complexar pouco o cobre, quando comparado aos outros meios.

A tolerância dos isolados ao cobre foi observada no presente trabalho, confirmando os resultados obtidos por alguns autores, com outras espécies de bactérias. Marco & Stall (1983) foram os primeiros a relatar a resistência a cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, na Flórida. No México, em 1984, também detectou-se a presença dos isolados resistentes, onde a eficácia das pulverizações foi reduzida (Adaskaveg & Hine, 1985).

No tratamento com sulfato de cobre, no meio 523 os isolados foram tolerantes ao cobre na concentração de 300 µg/ ml (Figura 6). Resultados semelhantes foram observados com outras espécies de bactéria, onde se observou o crescimento bacteriano até 200 µg/ ml em isolados de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana do pimentão e tomate (Ritchie & Dittapongpitch, 1991). Aguiar *et al.* (2000) mostraram em trabalhos com pimentão, a ocorrência natural no Brasil, de populações de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* com alta resistência ao cobre de até 1800 µg/ ml. Entretanto, a resistência a teores baixos de sulfato de cobre também foi mostrada por alguns autores. Quezado-Duval *et al.* (2003) observaram a resistência de isolados de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana do tomate, na concentração de 50 µg/ ml; Spotts & Cervantes, (1995) mostraram que no estudo com 323 isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em pomares de pêra, 99% não cresceram em 2,0 µM de sulfato de cobre; Geider (1999), no estudo da toxicidade de sulfato de cobre à *Erwinia amylovora*, mostrou que a concentração de 15 µM desse produto foi suficiente para reduzir o crescimento da bactéria em 50%; Gitaitis *et al.* (1985) estudando a reação do cobre em 150 isolados de bactérias observaram que *Pseudomonas cepacia*, *P. viridiflava* e *X. campestris* pv. *vesicatoria* cresceram na presença de 128 µg/ ml de sulfato de cobre e que *P. syringae* pv. *tomato* e *P.cichorii* toleraram a 32 µg/ ml, enquanto

que isolados de *X. campestris* pv. *pruni* e pv. *vignicola* foram sensíveis a 8 e 4 µg/ml de sulfato de cobre, respectivamente .

No tratamento com hidróxido de cobre e oxiclreto de cobre, como foi mencionada, a CMI no meio 523 foi de 400 µg/ml, e 300 µg/ml, respectivamente. No primeiro produto, a tolerância foi eficaz somente para um isolado (20%), enquanto que no segundo foi eficiente em 80% dos isolados. De acordo com Maringoni & Kimati (1987) em estudo com outra espécie de bactéria, mostraram que a concentração de 100 µg/ml desses fungicidas foi suficiente para inibir todos os isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Entretanto Kurozawa *et al.* (1983) verificaram concentrações inibitórias de 31,25 µg/ml ou 125 µg/ml para oxiclreto de cobre entre os isolados *X. vesicatoria* do tomateiro.

No tratamento com cloretos de benzalcônio a CMI para um isolado foi de 80 µg/ml, o que podemos atribuir o efeito erradicante do produto, proporcionalmente ao aumento da concentração, tendo efeito inibidor, *in vitro*, sobre o crescimento bacteriano. Resultados semelhantes, embora com fungos patogênicos, mostraram que isolados de *Colletotrichum*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus* sp. apresentaram a CMI em níveis superiores a 1000 µg/ml; enquanto que *P. digitatum*, *Botrytis cinerea* e *Lasiodiplodia theobromae* mostraram que o crescimento micelial foi inibido na concentração de 300 µg/ml (ITAL/ Fruthotec, 1997).

A tolerância aos produtos cúpricos nos isolados de *E. psidii*, pode estar relacionado ao uso consecutivo de pulverizações foliares em pomares de goiaba, utilizados pelos produtores. Esses dados podem ser comprovados, com o aumento de isolados resistentes de *Xanthomonas* spp., resultante da pressão de seleção exercida pelo emprego continuado de produtos cúpricos. O mesmo não foi constatado para lavoura de tomate onde houve menor número de pulverizações com os produtos (Quezado-Duval *et al.*; 2003). Silva & Lopes (1995), também observaram que a resistência verificada nos isolados de *P. syringae* pv. *tomato* tenha sido resultado do uso intensivo de compostos cúpricos nas áreas estudadas, podendo ter levado à seleção de população resistente.

Com base nos resultados pode-se afirmar que todos os isolados de *E. psidii*, no meio 523 foram mais resistentes ao sulfato de cobre e hidróxido de cobre;

enquanto que no meio MMCC todos os isolados apresentaram maior tolerância ao hidróxido de cobre. Com relação a CMI de todos isolados, toda atenção deve-se ter, pois a ocorrência de populações de bactéria com elevada resistência ao metal poderá comprometer seriamente seu controle químico no campo.

Os resultados também mostraram que os isolados de *E. psidii* apresentaram maior tolerância aos produtos cúpricos do que aos cloretos de benzalcônio, que teriam melhor eficiência no controle *in vitro*.

Com relação aos resultados do estudo “*in vitro*”, dos diferentes tipos de antibióticos, observou-se que todos os isolados apresentaram respostas de sensibilidade diferente aos diversos antibióticos, confirmando os resultados de Romeiro *et al.* (1988). Segundo Chambers & Sande (1996), os antibióticos podem diferir nitidamente quanto as suas propriedades físicas, químicas, farmacológicas, espectro antibacteriano e mecanismo de ação. De acordo com os autores, os antibióticos podem ser classificados quanto à estrutura química e o mecanismo de ação, podendo ser dividido em alguns grupos: o primeiro, que inibe a síntese da parede celular bacteriana, teve os seguintes representantes nesse trabalho: Penicilina, Vancomicina, Bacitracina, Cefalotina, Ampicilina e Oxacilina. Esse último foi o único que não exerceu nenhum controle sobre o crescimento bacteriano, em todos os isolados; sendo, portanto apropriado para o estudo de meio seletivo. Entretanto, Evangelista & Uesugi (2001), estudando os mesmos antibióticos em diferentes isolados de *E. psidii*, verificaram que os princípios ativos Bacitracina, Vancomicina, Clindamicina, Oxacilina, Eritromicina e Penicilina, não tiveram quaisquer efeitos sobre a bactéria.

O segundo grupo de antibióticos, de acordo com a classificação de Chambers & Sande (1996), afeta as funções das subunidades ribossômicas, causando inibição reversível da síntese protéica. Representantes deste grupo são os antibióticos Cloranfenicol e Tetraciclina que foram bastante eficazes no controle de *E. psidii*, contra todos os isolados estudados. Segundo os autores a Eritromicina exerce efeito sobre as bactérias, interferindo com a síntese de proteínas, mas não com a síntese de ácidos nucléicos. No presente trabalho o antibiótico foi eficaz somente nos isolados UnB 1285 e 1286, o mesmo ocorrendo com a Clindamicina (Tabela 7). O efeito diferenciado entre os isolados pode indicar variação na

resistência das bactérias, visto que os isolados UnB 1285 e 1286 são oriundos da mesma propriedade, sendo diferentes dos demais isolados.

Um outro grupo de antibióticos, de acordo com Chambers & Sande (1996), afeta a síntese protéica quando agentes se ligam às subunidades ribossômicas. Desse grupo foram testados nesse trabalho a Neomicina, Estreptomicina, Gentamicina e Amicacina. Os três primeiros apresentaram baixo efeito para todos isolados, com exceção do isolado tipo IBSBF 435; enquanto que Amicacina apresentou efeito mediano para o isolado UnB 1287 (Tabela 7).

Outros antibióticos que não foram incluídos na classificação de Chambers & Sande (1996), mas que merecem destaque pela eficiência de controle, e que segundo Snyder & Finch, (1996) exercem as seguintes funções, são eles: Rifampicina, cuja função é inibir a síntese de RNA, apresentou alto controle para os isolados UnB 1285 e 1286; Ácido Nalidíxico, que inibe a síntese de DNA, apresentou alto controle para os demais isolados e Nitrofurantoína, que inibe o metabolismo da bactéria, exerceu controle mediano em todos isolados.

Quanto aos resultados do estudo do efeito de formulações de fungicidas cúpricos e de cloretos de benzalcônio, na incidência da bactéria e expressão de fitotoxicidade em goiaba, em casa de vegetação, verificou-se que os tratamentos com oxiclureto e hidróxido de cobre apresentaram baixa fitotoxicidade em folhas de goiabeira, sendo semelhantes às plantas controle. Trabalho realizado por Goes *et al.* (2004), mostraram que os produtos oxiclureto de cobre e hidróxido de cobre causaram fitotoxicidade, em frutos de goiaba com diâmetro maior que 25 mm, no entanto não foram observados sintomas em folhas de goiabeira.

No estudo *in vitro* (item 4.3) verificou-se que os tratamentos com sulfato de cobre e cloretos de benzalcônio demonstraram melhor eficiência na inibição do crescimento bacteriano para todos os isolados e o UnB 1288, respectivamente, no meio 523. Os resultados confirmam os apresentados no presente trabalho, onde se verificou que os produtos cloretos de benzalcônio e sulfato de cobre mostraram ser mais eficiente no controle da bacteriose, em testes *in planta*. As plantas inoculadas com o isolado UnB 1288, considerado tolerante *in vitro* em concentrações baixas, mostraram diferença significativa na percentagem de plantas doentes em relação ao controle (Tabela 10), indicando que a tolerância *in vitro* refletiu-se no controle

químico. Silva & Lopes (1995), observaram que as plantas tratadas com oxiclureto de cobre tiveram menor número de lesões de pinta bacteriana no tomate, quando inoculadas com o isolado de menor resistência *in vitro*. Jones *et al.* (1991) verificaram que plantas de tomate, tratadas com o hidróxido de cobre reduziram o número de lesões, quando foram inoculadas com isolados resistentes e suscetíveis, *in vitro*. Entretanto, Aguiar *et al.* (2003) verificaram que o efeito dos fungicidas, sulfato de cobre e oxiclureto de cobre foram insuficientes para promover o controle da mancha bacteriana do pimentão, quando inoculadas com isolado considerado resistente em altas concentrações, no teste *in vitro*.

Ao analisarmos o efeito dos fungicidas, em cada variedade verificaram-se diferenças na eficácia dos mesmos. Em todas as variedades, com exceção do Bicudo, o tratamento com sulfato de cobre mostrou ser mais eficiente no controle da doença; enquanto que na variedade Bicudo os tratamentos com oxiclureto de cobre e hidróxido de cobre mostraram melhores resultados. Na variedade Pedro Sato, o tratamento com cloretos de benzalcônio mostrou ser tão eficiente, quanto o tratamento com sulfato de cobre (Figura 14). A eficiência do fungicida cloretos de benzalcônio foi demonstrada em trabalhos com *Erwinia carotovora*, na cultura da batata, apresentando alta percentagem de controle, comparado aos outros fungicidas cúpricos (Dario & Baltieri, 1998; Pria, 1999). Resultados semelhantes foram observados por Faria & Guimarães (1998); observando a eficiência do produto no controle de *E. carotovora* na cultura da cenoura.

As plantas não tratadas com fungicidas apresentaram uma menor percentagem de plantas doentes, quando comparado ao experimento de resistência genética (item 4.2), com isolado UnB 1288. Esses resultados provavelmente se devem ao efeito das condições climáticas, visto que o experimento foi realizado no período de baixa precipitação e temperaturas amenas, considerados desfavoráveis ao progresso da doença. De acordo com Diab *et al.* (1982), citado por Carmo *et al.* (2001), as bactérias respondem muito rapidamente as variações climáticas, principalmente umidade. Segundo os autores, os períodos de alta umidade relativa (95-100%) são importantes para ocorrência de infecção em faixa ampla de temperatura (22-32 °C).

Com base nesses resultados, verificou-se que o tratamento com sulfato de cobre mostrou melhor eficiência no controle da bacteriose, comprovado em testes *in vitro*; entretanto mostrou maior grau de fitotoxicidade comparado aos outros tratamentos.

Nos resultados do experimento de campo, em ambas as variedades observou-se no estágio de inflorescência que os frutos foram classificados com sintomas leves, não apresentando restrição ao mercado de frutas frescas em nenhum tratamento avaliado. Os frutos médios ou com diâmetro maior ou igual a 31 mm mostraram ser mais sensíveis ao cobre, comparado aos demais estádios avaliados. Isso mostra maior percentagem de frutos com sintomas severos de fitotoxicidade, provocado pelo tratamento com sulfato de cobre. Esses resultados mostram-se convergente às citações na literatura (Piccini & Pascholati, 1997; Manica *et al.*; 2000). Pressupõe-se que o nível moderado a severo de fitotoxicidade verificado nesse estágio, tratados com fungicidas cúpricos, deve-se ao grau de desenvolvimento dos frutos, já que esses se encontram em fase máxima de maturação. Em relação às folhas das plantas, não foram observados sintomas de fitotoxicidade, confirmando os resultados de Goes *et al.* (2004). Tais efeitos constituem-se um obstáculo à produção de frutos de alto padrão de qualidade, destinados ao mercado de frutas frescas.

Em ambas variedades observou-se que os sintomas de fitotoxicidade, embora leves, foram percebidos já no início do estágio de inflorescência. Nos frutos pequenos, os sintomas severos foram percebidos na variedade Pedro Sato, somente no tratamento com sulfato de cobre, e na variedade Comum, nos tratamentos com sulfato de cobre e oxiclureto de cobre, embora este último em baixa percentagem. Nos frutos médios foi observada evolução dos sintomas severos, sendo na variedade Pedro Sato nos tratamentos com oxiclureto de cobre e sulfato de cobre; e na variedade Comum em todos os tratamentos cúpricos. Goes *et al.* (2004), em trabalho semelhante, observaram que em frutos com diâmetro menor ou igual a 15 mm, não foram observados sintomas de fitotoxicidade, e em frutos com diâmetro entre 25 e 35 mm, os sintomas severos foram observados no tratamento com oxiclureto de cobre e hidróxido de cobre; e nos frutos com diâmetro maior ou igual a 40 mm, não foram observados sintomas severos.

Na variedade Comum, embora não houve diferença significativa entre os tratamentos, o tratamento com cloretos de benzalcônio apresentou menor percentagem de ramos de frutificação com a doença, comparado com o controle, mostrando melhor eficiência do produto. Já na variedade Pedro Sato apresentou resultados contrários, mostrando a ineficiência do produto, comparado ao controle e demais tratamentos. Esses dados condizem com os apresentados em casa de vegetação, para a variedade Comum; no entanto divergem para a variedade Pedro Sato, onde mostrou melhor eficiência do produto no controle da bacteriose. Em testes *in vitro* verificou-se melhor controle da bacteriose, em concentrações baixas. Portanto, o produto pode ser usado no controle da bacteriose da goiabeira; visto que no campo a percentagem de frutos com fitotoxidade foi muito baixa, sendo considerada leve, podendo ainda ser aceitos pelo mercado de frutas frescas.

Os tratamentos com sulfato de cobre e hidróxido de cobre, na variedade Pedro Sato mostraram ser mais eficientes no controle da doença, comparado com tratamento cloretos de benzalcônio (Tabela 14). Já na variedade Comum o sulfato de cobre, mostrou ser tão eficiente, quanto o tratamento com cloretos de benzalcônio. Estudo em casa de vegetação mostrou que o produto foi bastante eficiente no controle da bacteriose, em todas as variedades, confirmando os testes *in vitro*, onde mostrou que o produto também foi eficiente na inibição do crescimento bacteriano em concentrações inferiores, ao tratamento com hidróxido de cobre. No entanto, o produto mostrou alto grau de fitotoxidade tanto em folhas em casa de vegetação; quanto em frutos pequenos e médios, no experimento do campo, mostrando frutos com sintomas severos, sendo rejeitados pelo mercado de frutas frescas.

O tratamento com hidróxido de cobre, na variedade Pedro Sato, no experimento de campo, mostrou ser tão eficiente quanto o tratamento com sulfato de cobre, no controle da bacteriose, o mesmo não ocorrendo para a variedade Comum. No entanto, os resultados não condizem com o experimento em casa de vegetação, que para a variedade Pedro Sato, mostrou a ineficiência do produto. Em testes *in vitro*, também observou-se inibição do crescimento bacteriano em concentrações maiores, em relação a todos os tratamentos. No entanto, o produto

mostrou baixa percentagem de fitotoxidade, tanto em casa de vegetação, quanto no campo.

No tratamento com oxiclureto de cobre, em ambas variedades foram semelhantes ao controle (Tabela 14), com baixa eficiência do produto na inibição da doença. No entanto Goes *et al.* (2004), estudando a eficiência dos fungicidas cúpricos no controle da ferrugem em goiaba, verificou que os produtos oxiclureto de cobre e hidróxido de cobre apresentaram baixa percentagem de frutos infectados. Em casa de vegetação, o produto mostrou ser mais eficiente que o experimento no campo, confirmando os resultados *in vitro*, onde a inibição do crescimento bacteriano foi em baixa concentração, semelhante ao tratamento com sulfato de cobre. Em relação ao grau de fitotoxidade, este mostrou menos problema em folhas de goiabeira, em casa de vegetação, comparado ao experimento de campo, onde apresentou sintomas moderados a severos em frutos pequenos e médios.

De maneira geral, as percentagens de incidência da doença no campo foram baixas, para todos os tratamentos, incluindo as plantas controle, que não receberam nenhuma aplicação de fungicida. Esses dados estão de acordo com os apresentados em casa de vegetação, fato que pode ter ocorrido, provavelmente, pela baixa precipitação.

## 6- CONCLUSÕES

De acordo com os dados dos experimentos realizados, verificou-se que as variedades de goiaba comumente plantadas são altamente suscetíveis à bactéria *Erwinia psidii*, e que os isolados variam quanto ao grau de agressividade. Visando a obtenção de cultivares resistentes, pesquisas adicionais poderão ser feitas no melhoramento genético, através de cruzamentos entre variedades comerciais suscetíveis e selvagens sem valor comercial, mas que possuem fatores genéticos para resistência a doença, seguidas de autofecundações, retrocruzamentos e seleções até a recuperação de variedades com as mesmas características comerciais da variedade suscetível, mas com incorporação de fatores genéticos de resistência da variedade selvagem.

No estudo “*in vitro*”, verificou-se diferença de crescimento bacteriano entre isolados de *E. psidii*, nos diferentes meios e fungicidas. O meio MMCC mostrou baixa capacidade de complexar o cobre, por isso a tolerância dos isolados foi em concentrações menores. Os isolados de *E. psidii* foram mais tolerantes aos produtos cúpricos, no meio 523, comparado ao Fegatex (cloretos de benzalcônio). Entre os produtos cúpricos, o sulfato de cobre mostrou melhor resultado na inibição do crescimento bacteriano.

O antibiótico oxacilina, para todos isolados estudados, foi o único a não apresentar efeito sobre a bactéria não sendo, portanto, adequado ao controle da mesma, podendo ser usado para o desenvolvimento de um de meio seletivo.

Sob condições de casa de vegetação, verificou-se que o tratamento com sulfato de cobre mostrou maior grau de fitotoxicidade nas folhas de goiabeira, reduzindo o desenvolvimento das brotações. No entanto apresentou somente 9% de plantas infectadas com a doença na variedade Comum. O tratamento com cloretos de benzalcônio não induziu fitotoxicidade e mostrou bom desenvolvimento das plantas, assim como um bom controle da doença.

Em experimento de campo, o tratamento com sulfato de cobre induziu alto grau de fitotoxicidade nos frutos pequenos e médios, independente da variedade. O tratamento com oxicloreto de cobre mostrou maior percentagem de frutos pequenos e médios com sintomas moderados. O tratamento com cloretos de benzalcônio

apresentou plantas com sintomas leves de fitotoxicidade, nas variedades Pedro Sato e Comum. No controle da doença, o tratamento com hidróxido de cobre mostrou melhor eficiência na variedade Pedro Sato; enquanto que na variedade Comum, o tratamento com cloretos de benzalcônio foi melhor.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASKAVEG, J.E. & HINE, R.B. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease* 69:993-996. 1985.

AGUIAR, L.; KIMURA, O.; CASTILHO, A.M.C.; CASTILHO, K.S.C.; RIBEIRO, R.L.D.; AKIBA, F. & CARMO, M.G.F. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. *Agronomia* 34:78-82. 2000.

AGUIAR, L.; KIMURA, O.; CASTILHO, A.M.C.; CASTILHO, K.S.C.; RIBEIRO, R.L.D.; AKIBA, F. & CARMO, M.G.F. Efeito de formulações cúpricas e cuprorgânicas na severidade da mancha-bacteriana e na população residente de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão. *Horticultura Brasileira* 21:44-50. 2003.

Agriannual – Anuário de Agricultura Brasileira. São Paulo-SP: FNP- Consultoria & Comércio. Editora Argos. 329-332. 2006.

AGRIOS, G.N. *Plant pathology*. 4<sup>th</sup> ed. San Diego. Academic press.1997.

BIRD, N.P.; CHAMBERS, J.G.; LEECH, R.W. & CUMMIND, D. A note on the use of metal species in microbiological tests involving growth media. *Journal of Applied Bacteriology* 59:353-355. 1985.

BLEINROTH, E.W. Colheita e Beneficiamento. In: SILVA, J.M.M. (Ed.) Frupex-Goiaba para Exportação: Procedimentos de Colheita e Pós- Colheita. Brasília –SPI. 1996. pp.12-23.

BRADBURY, J.F. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Ferry Lane: C.A.B. International Mycological Intitute. 332p. 1986.

CARMO, M.G.F; MACAGNAN, D. & CARVALHO, A.O. Progresso da mancha-bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inoculo e do

emprego ou não do controle com oxycloreto de cobre. Horticultura Brasileira 19:342-347. 2001.

CARNEIRO, R.M.D.G.; MOREIRA, W.A.; ALMEIDA, M.R.A. & GOMES, A.C.M.M. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. Nematologia Brasileira 25:223-228. 2001.

CHAMBERS, H.F. & SANDE, M.A. Fármacos antimicrobianos. In: GOODMAN, L.S. & GILMAN, A.G. (Eds.) As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Rio de Janeiro. Mc Graw Hill. 1996. pp.757-854.

CHITARRA, M.I.F. Características das Frutas de Exportação. In: SILVA, J.M.M. (Ed.) Frupex- Goiaba para Exportação: Procedimentos de Colheita e Pós- Colheita. Brasília –SPI. 1996. pp.9-11.

CHOUDBURY, M.M.; COSTA, T.S. & ARAÚJO, J.L.P. Agronegócio da goiaba. In: Choudbury, M.M. (Ed.) Goiaba Pós-colheita. Embrapa Semi-Árido (Petrolina, Pe). Brasília. Embrapa Informação Tecnológica. 2001. pp. 9-15.

COELHO, M.V.S.; MENDES, A.P. & MARQUES, A.S.A. Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização. Brasília- DF: Comunicado Técnico nº 58, Embrapa-SPI, 2002a (Série Embrapa de publicações).

COELHO, M.V.S.; MENDES, A.P.; SANTOS, J.P. & MARQUES, A.S.A. Incidência da seca dos ponteiros da goiabeira em Brazlândia-DF e desenvolvimento de teste de patogenicidade para *Erwinia psidii*. Fitopatologia Brasileira 27:S58. 2002b. Suplemento.

DARIO, G.A. & BALTIERI, E. Avaliação da eficiência do fungicida Fegatex (Cloretos de benzalcônio) no controle da Canela-preta (*Erwinia carotovora*) ocorrente na cultura da Batata (*Solanum tuberosum* L.). Laudo técnico de praticabilidade e eficiência agrônômica. 1998.

DICKEY, R.S. & KELMAN, A. *Erwinia*. In SCHAAD, N.W. (Ed.) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St Paul: the American Phytothological Society. 2<sup>nd</sup> Ed.1994. pp.44-59.

EVANGELISTA, I.B.R. & UESUGI, C.H. Efeito de diferentes antibióticos a isolados de *Erwinia psidii*. Fitopatologia Brasileira 26:284. 2001. Suplemento.

FARIA, R.R. & GUIMARÃES, T.G. Avaliação da eficiência do fungicida Fegatex (Cloretos de benzalcônio) no controle da Podridão-mole (*Erwinia carotovora* (Jones) Holland) ocorrente na cultura da Cenoura (*Daucus carota* L.). Laudo técnico de praticabilidade e eficiência agrônômica.1998.

FRANCISCO, V.L.F.S.; BAPTISTELLA, C.S.L. & AMARO, A.A. A Cultura da Goiaba em São Paulo 2005. Instituto de Economia Agrícola. Acesso em 1 de setembro de 2005. [http:// www.iea.sp.gov.br](http://www.iea.sp.gov.br)

FrutiSéries 1- Goiaba- Distrito Federal. 2001. Acesso em 4 de outubro de 2005. <http://www.bnb.gov.br>

GARRITY, G.M.; WINTERS, M. & SEARLES, D.B. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. Michigan State University. 2<sup>nd</sup> ed. 2001.

GEIDER, K. Interference of copper sulphate in growth of *Erwinia amylovora*. Journal Phytopathology 147:521-526. 1999.

GITAITIS, R.D.; MC INNES, T.B. & JONES, J.B. A survey of Georgia and Florida for the presence of copper tolerant phytopathogenic bacteria. Phytopathology 75:1288.1985 (Abstract).

GOES, A.; MARTINS, R.D. & REIS, R.F. Efeito de fungicidas cúpricos, aplicados isoladamente ou em combinação com mancozeb, na expressão de sintomas de fitotoxicidade e controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em goiabeira. Revista Brasileira de Fruticultura 26:1-8. 2004.

GOMES, R.P. Fruticultura Brasileira. 8<sup>a</sup> ed. São Paulo. Nobel. 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro, 2004. Acesso em 20 de dezembro de 2005. <http://www.sidra.ibge.gov.br>

ITAL/ Fruthotec (Instituto de Tecnologia de Alimentos- Centro de tecnologia de Hortifrutícolas). Efeito de Fegatex, *in vitro*, sobre o crescimento micelial de fungos causadores de podridões em frutas pós-colheita. Campinas SP.1997.

JONES, J.B.; WOLTZ, S.S.; JONES, J.P. & PORTIER, L. Population Dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on Tomato Leaflets Treated with Copper Bactericides. *Phytopathology* 81:714-719. 1991.

JUNQUEIRA, N.T.V. Doenças e Pragas. In: MANICA, I. (Ed.) Fruticultura Tropical 6 Goiaba. Porto Alegre. Cinco Continentes. 2000. pp. 225-270.

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

KUROZAWA, C; MARINGONI, A.C.; BARBOSA, V. & SILVA NETO, J.M. Sensibilidade *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye do tomateiro a drogas. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Olericultura, Rio de Janeiro. 1983. pp. 70 (Resumo).

MANICA, I.; ICUMA, I.M.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A. & MALAVOLTA, E. Fruticultura Tropical 6: Goiaba. Porto Alegre. Cinco Continentes.2000.

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

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P. & GOMES, A.M.A. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R & SILVEIRA,

E.B. (Eds.) Manual de Práticas em Fitobacteriologia. UFPE, Recife. 2005. pp. 67-111.

MARINGONI, A.C. & KIMATI, H. Sensibilidade *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye de pimentão e de tomateiro a drogas. Summa Phytopathologica 13:160-172.1987.

MEDINA, J.C. Cultura. In: CASTRO, J.V.; SIGRIST, J.M.M.; MARTIN, Z.J.; KATO, K.; MAIA, M.L.; GARCIA, A.E.B.; FERNANDES, R.S.S. (Eds.) Série Frutas Tropicais n° 6: Goiaba. ITAL-Campinas. ICEA. 1991. pp.1-120.

MENKISSOGLU, O. & LINDOW, S.E. Relationship of free ionic copper and toxicity to bacteria in solutions of organic compounds. Phytopathology 81:1258-1263. 1991.

OLIVEIRA, J.R.; VENTURA, J.A.; SILVA, I.T. & COSTA, H. Ocorrência da bacteriose da goiabeira, causada por *Erwinia psidii*, no Estado do Espírito Santo. Fitopatologia Brasileira 25:328.2000. Suplemento.

OLIVEIRA, J.R. Estudo da sensibilidade de isolados de *Erwinia psidii* do Distrito Federal ao sulfato de cobre. (Monografia de Graduação). FAV/UnB. 2003.

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S.F. Doenças da Goiabeira (*Psidium guajava*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) Manual de Fitopatologia Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo. Ceres. 1997. pp. 450-455.

POHRONEZNY, K.; SOMMERFELD, M. & RAID, R.N. Streptomycin resistance and copper tolerance among strains of *Pseudomonas cichorii* in commercial celery seedbeds. Phytopathology 82:1118. 1992 (Abstract).

PRIA, M.D. Avaliação do efeito do fungicida e bactericida fegatex (cloretos de benzalcônio) no controle de canela-preta da batata (*Erwinia carotovora*) em Ponta Grossa. Laudo técnico de praticabilidade e eficiência agrônômica. 1999.

QUEZADO-DUVAL, A.M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R.P. & CAMARGO, L.E.A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira* 21:670-675. 2003.

RIBEIRO, I.J.A.; SUGIMORI, M.H.; RODRIGUES NETO, J.; YAMASHIRO, T.; PIZA Jr, C.T.; PRATES, H.S. & FREDIANI, A.J. A bacteriose da goiabeira. *Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI)* 231. 13p. 1985.

RIBEIRO, I.J.A. & POMMER, C.V. Breeding guava (*Psidium guajava*) for resistance to rust caused by *Puccinia psidii*. *Acta Horticulturae* 632:75-78. 2004.

RITCHIE, D.F. & DITTAPONGPITCH, V. Copper- and streptomycin- resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Disease*. 75:733-736. 1991.

ROBBS, C.F. & RODRIGUES NETO, J. Enfermidades causadas por bactérias em fruteiras tropicais no Brasil. *Summa Phytopathologica* 25:73-76.1999.

RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C.F. & YAMASHIRO, T. A bacteriose da goiabeira (*Psidium guajava* L.), provocada por *Erwinia psidii* sp.nov. *Fitopatologia Brasileira* 8:636.1983 (Resumo).

RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C.F. & YAMASHIRO, T. A bacterial disease of guava (*Psidium guajava* L.) caused by *Erwinia psidii* sp.nov. *Fitopatologia Brasileira* 12:345-350.1987.

ROMEIRO, R.S.; SIQUEIRA, M.F.& CARDOSO, M.S.O. Sensibilidade de isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *arracaciae* a antibióticos. *Fitopatologia Brasileira* 13: 97.1988 (Resumo).

ROMEIRO, R.S.; MORAES, R.M.A.; OLIVEIRA, J.R.; COUTO, F.A.A. & REZENDE, S.T. Uma enfermidade da goiabeira de etiologia bacteriana no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 18:283.1993. Suplemento.

ROMEIRO, R.S.; OLIVEIRA, J.R.; POMELLA, A.W.V.; BARBOSA, J.G. & COUTO, F.A.A. Situação e perspectivas de controle da morte das pontas da goiabeira (*Erwinia psidii*) em Minas Gerais, Brasil. Fitopatologia Brasileira 19:309.1994. Suplemento.

ROMEIRO, R.S. Antibióticos e seu emprego em pesquisa com bactérias fitopatogênicas. Universidade Federal de Viçosa, 1996. Acesso em 5 de agosto de 2005. <http://www.ufv.br/dfp/bac/uni16.pdf>

ROMEIRO, R.S.; BATISTA, U.G.; BARBOSA, J.G. & RODRIGUES NETO, J. Situação e perspectiva de controle da morte das pontas da goiabeira (*Erwinia psidii*) em Minas Gerais- Relato de um caso. Revista Ceres 49 (283):329-334. 2002. (Comunicação).

ROSSI, C.E.; FERRAZ, L.C.C.B. & MONTALDI, P.T. Resistência de frutíferas de clima subtropical e temperado a *Meloidogyne incognita* raça 2 e *M. javanica*. Arquivos do Instituto Biológico 69:43-49. 2002.

SCHAAD, N.W; JONES, J.B. & CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul: The American Phytopathological Society. 3<sup>th</sup> ed. 2001.

SCHROTH, M.N. & HILDEBRAND, D.C. Erwinia. In: SCHAAD, N.W. (Ed.) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul: The American Phytopathological Society. 2<sup>nd</sup> ed. 1994. pp.37-43.

SILVA, V.L. & LOPES, C.A. Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes a cobre em tomateiros pulverizados com fungicidas cúpricos. Fitopatologia Brasileira 20:85-89.1995.

SNYDER, I.S. & FINCH, R.G. Quimioterapia. In: CRAIG, C.R. & STITZEL, R.E. (Eds) Farmacologia moderna. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1996. pp.479-534.

SOUZA, O.P.; MARCIN, C.A.; MELO, B. Cultura da goiaba, 2005. Acesso em 1 de setembro de 2005. [http:// www.fruticultura.iciag.ufu.br](http://www.fruticultura.iciag.ufu.br)

SPOTTS, R.A. & CERVANTES, L.A. Copper, oxytetracycline, and streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. *Plant Disease* 79:1132-1135. 1995.

TOKESHI, H.; VALDEBENITO, R.M. & DIAS, A.S. Ocorrência de bacteriose da goiabeira no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 6(1,2):85-87.1980.

TORRES, G.R.C.; COVELLO, V.N.; SALES JUNIOR, R.; PEDROSA, E.M.R. & MOURA, R.M. *Meloidogyne mayaguensis* em *Psidium guajava* no Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira* 29:1-3.2004.

TREVORS, T.J. Copper resistance in bacteria. *Microbiological Sciences* 4:29-31. 1987.

UESUGI, C.H.; MELO FILHO, P.A.; LIMA, M.L.P.; TOMITA, C.K.; MORAES, C.A.; CAFÉ FILHO, A.C. & UENO, B. Ocorrência de *Erwinia psidii* sobre goiabeira detectada no Distrito Federal. *Summa Phytopathologica* 27:118.2001(Resumo).

UESUGI, C.H., BARBOSA, L.V. & REZENDE, A.M. Sensibilidade de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv.*flaccumfaciens* a diferentes formulações cúpricas. *Fitopatologia Brasileira* 30:S68. 2005. Suplemento.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M.; DOLFING, J.; ESHUIS, E.J. & SCHOLTEN-KOERSELMAN, I.J. Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbial Ecology* 5:139-146. 1979.

## **8- ANEXOS**

**8.1- Caracterização bioquímica**

**8.2- Meios de cultura utilizados**

## 8.1- Caracterização bioquímica

### 8.1.1- Teste de Oxidação/Fermentação da glicose

- isolados bacterianos crescidos por 48 horas em meio 523

Meio OF:

(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,0 g
KCl.....	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
Peptona bacteriológica.....	1,0 g
Azul de bromothimol.....	0,03 g
Agar.....	3,0 g
Água destilada.....	1000 ml
pH.....	7,2-7,4

-Os tubos foram incubados durante 2 dias a 28 °C

-Padrão utilizado como controle negativo: *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihots* (UnB 1113).

### 8.1.2- Catalase

-Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 volumes).

### 8.1.3- Oxidase

-Solução de cloreto de dimetil fenileno-diamina

-10 mg de dimetil fenileno-diamina / ml em água destilada

-Padrão utilizado como controle positivo: *Ralstonia solanacearum* (UnB 1169).

## 8.2- Meios de cultura utilizados

### 8.2.1- Meio 523 (Kado & Heskett, 1970)

Sacarose.....	10,0 g
Caseína hidrolisada.....	8,0 g
Extrato de levedura.....	4,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	300 mg
Agar.....	20,0 g
Água destilada.....	1000 ml

### 8.2.2-Meio MMCC (Medium Minimal Complexing Copper) (Pohronezny *et al.*; 1992)

Casitone.....	1,7 g
Extrato de levedura.....	0,35 g
Agar.....	8,5 g
Glicerol.....	2,0 ml
Água destilada.....	1000 ml



