



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

Caracterização de isolados de *Erwinia psidii* do Distrito Federal e detecção sorológica em goiabeiras.

Ana Cristina Oliveira Teixeira

**Dissertação apresentada ao Departamento
de Fitopatologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília,
como requisito parcial à obtenção do grau
de Mestre em Fitopatologia.**

**Brasília-DF
2006**

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação da Professora Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira, com o apoio Institucional e bolsa do CNPq.

Aprovado por:

**Prof^a. Dra. Marisa A. S. Velloso Ferreira
Orientadora
Universidade de Brasília - UnB**

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

**Prof. Dr. Carlos Hidemi Uesugi
Universidade de Brasília - UnB**

Aos meus pais Arimatéia e Conceição,

Com todo amor e gratidão

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as conquistas, por todos os sonhos realizados, pela fé que tenho nele, que me abastece de forças para lutar por todos os meus objetivos.

Ao meu irmão Leonardo por sua paciência nos meus momentos de estresse.

Ao meu noivo Paulo por seu amor e compreensão nos momentos de minha ausência e por sua ajuda em assuntos de “informática”.

À minha avó Juelina, e minha tia-mãe Maria de Jesus, por suas orações e por acreditarem em mim.

Aos meus tios, tias, primos e primas pelo apoio e torcida.

À professora Marisa A. S. V. Ferreira por sua orientação, paciência e ensinamentos.

À Dra. Abi Marques por ter disponibilizado seu laboratório para meus experimentos e por todo o seu apoio; e aos demais integrantes da Unidade de Bacteriologia, Laboratório da Quarentena Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Joanice, Luciano, Carol, Elaine e Alexandre Peron pela amizade e auxílio na execução dos experimentos.

Às amigas Anamarina Caetano, Kellen Anacleto e Juliana Dias, pela amizade e incentivo.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia: Loiselene Trindade, Reinaldo Júnior, Tito Regis, Débora Zoccoli, Adriana Magali e Márcio Pires.

Em particular à Débora Melo, Irene Martins, Caroline Pedroso e Mariana Paula, pela amizade e compreensão nos momentos de desespero.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, da Universidade de Brasília, pela contribuição na minha formação acadêmica.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E OBJETIVOS.....	1
1 - A cultura da goiabeira.....	1
1.1 - Importância.....	1
1.2 - Aspectos botânicos.....	3
1.3 - Produção de goiaba no Brasil.....	6
1.4 - Variedades.....	10
1.5 - Condições edafoclimáticas.....	11
2 - Principais doenças da goiabeira no Brasil.....	13
3 - A seca dos ponteiros da goiabeira.....	16
3.1 - Histórico.....	16
3.2 - Sintomatologia.....	18
3.3 - Agente etiológico.....	21
3.4 - Epidemiologia.....	24
3.5 - Controle.....	25
4 - Objetivos.....	28
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>ERWINIA</i>	30
<i>PSIDII</i> DO DISTRITO FEDERAL.....	
1 – INTRODUÇÃO.....	30
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
2.1 – Local e período da realização dos trabalhos.....	36
2.2 – Isolados.....	36
2.3 – Isolamento do patógeno.....	38
2.4 – Preservação dos isolados.....	38
2.5 – Caracterização bioquímica, nutricional e patogênica.....	39

	Página
2.5.1 – Testes bioquímicos e nutricionais.....	39
2.5.2 – Teste de patogenicidade.....	41
2.6 – Caracterização molecular.....	42
2.6.1 – Isolados.....	42
2.6.2 – Extração de DNA.....	43
2.6.3 – Quantificação do DNA genômico.....	44
2.6.4 – rep-PCR.....	45
2.6.5 – Análise dos dados.....	46
3 – RESULTADOS.....	47
3.1 – Caracterização bioquímica, nutricional e patogênica.....	47
3.1.1 – Testes bioquímicos e nutricionais.....	47
3.1.2 – Teste de patogenicidade.....	51
3.2 – Caracterização molecular.....	53
4 – DISCUSSÃO.....	67

CAPÍTULO 3 – DETECÇÃO DE *Erwinia psidii* EM FOLHAS DE GOIABEIRA INOCULADAS ARTIFICIALMENTE ATRAVÉS DE ENRIQUECIMENTO E IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA.....

1 – INTRODUÇÃO.....	78
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
2.1 – Local e período da realização dos trabalhos.....	81
2.2 – Isolados.....	81
2.3 – Produção de antissoro específico para <i>E. psidii</i>	82
2.3.1 – Suspensão bacteriana para inoculação em coelhos..	82
2.3.2 – Produção do antissoro.....	83
2.3.3 – Titulação do antissoro.....	83
2.3.4 – Aquisição e tratamento do soro.....	84
2.4 - Determinação da especificidade.....	85
2.5 – Limiares de detecção de <i>Erwinia psidii</i> em folhas de goiabeira pelo método de imunodifusão radial dupla.....	86

	Página
2.5.1 – Preparação do inoculo.....	86
2.5.2 – Inoculação de <i>E. psidii</i> em extrato de folhas de goiabeira.....	86
2.5.3 – Plaqueamento ideal.....	87
2.5.4 – Detecção por imunodifusão radial dupla.....	88
2.6 – Monitoramento da evolução de sintomas em plantas inoculadas, na ausência de ferimentos.....	89
2.6.1 – Preparo do inoculo.....	89
3 – RESULTADOS.....	91
4 - DISCUSSÃO	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
ANEXOS.....	125

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Áreas destinadas a colheita e volume de goiaba produzido nas diferentes regiões do Brasil e nas Unidades da Federação de cada região.....	8
TABELA 2. Isolados bacterianos procedentes da região de Brazlândia-DF utilizados neste estudo.....	37
TABELA 3. Isolados de <i>Erwinia psidii</i> obtidos da Coleção de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF) utilizados neste estudo.....	42
TABELA 4. Testes bioquímicos, nutricionais e de patogenicidade dos isolados bacterianos obtidos de goiabeiras na região de Brazlândia-DF...	50
TABELA 5. Crescimento populacional de <i>Erwinia psidii</i> inoculada em diferentes concentrações, em folhas de goiabeira maceradas e limiares de detecção da bactéria por imunodifusão radial dupla.....	94
TABELA 6. Sintomas em brotos de goiabeira não sujeitas a ferimentos, inoculados com <i>Erwinia psidii</i> por aspersão.....	102
TABELA 7. Sintomas em brotos de goiabeira sujeitos a ferimentos, inoculados com <i>Erwinia psidii</i> por aspersão.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Sintomas característicos da seca dos ponteiros da goiabeira causada naturalmente por <i>Erwinia psidii</i> Rodrigues Neto. A e B – Primórdio foliar de goiabeira, apresentando sintomas de seca dos ponteiros; C – Folhas apresentando lesões na nervura central; D e E – Flores e frutos apresentando sintomas típicos de mumificação.....	19
FIGURA 2. A-D.Cultura bacteriana pura de <i>Erwinia psidii</i> (isolado IBSBF 435) riscada em placas contendo meio 523 sólido, após 48 h de crescimento sob diferentes formas de iluminação, com o intuito de se mostrar o aspecto e a textura do patógeno crescido em placa....	22
FIGURA 3. Teste de Patogenicidade, A-D. Hastes destacadas apresentando sintomas típicos da bacteriose após 5 dias de inoculação, o enegrecimento se inicia na nervura principal e se alastra para todo o do ramo até as folhas apresentarem-se totalmente enroladas e secas.....	52
FIGURA 4. Análise eletroforética dos fragmentos gerados através de BOX-PCR, a partir de DNA purificado dos isolados utilizados neste estudo. Marcador (M) 100 pb DNA Ladder (Gibco BRL), IBSBF 435 (Isolado Tipo).....	54
FIGURA 5. Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis gerados por BOX-PCR, mostrando as relações entre os isolados identificados como <i>Erwinia psidii</i> , obtidos na região de Brazlândia-DF e nos estados de São Paulo, Paraná e Espírito Santo..	55
FIGURA 6. Análise eletroforética dos fragmentos gerados através de REP-PCR, a partir de DNA purificado dos isolados utilizados neste estudo. Marcador (M) 100 pb DNA Ladder (Gibco BRL), IBSBF 435 (Isolado Tipo).....	58
FIGURA 7. Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis gerados por REP-PCR, mostrando as relações entre os isolados identificados como <i>Erwinia psidii</i> , obtidos na região de Brazlândia-DF e nos estados de São Paulo, Paraná e Espírito Santo..	59
FIGURA 8. Análise eletroforética dos fragmentos gerados através de ERIC-PCR, a partir de DNA purificado, dos isolados utilizados neste estudo. Marcador (M) 100 pb DNA Ladder (Gibco BRL), IBSBF 435 (Isolado Tipo).....	62
FIGURA 9. Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis gerados por ERIC-PCR, mostrando as relações entre os isolados identificados como <i>Erwinia psidii</i> , obtidos na região de Brazlândia-DF e nos estados de São Paulo, Paraná e Espírito Santo..	63

FIGURA 10. Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis gerados por rep-PCR (BOX, REP e ERIC), mostrando as relações entre os isolados identificados como <i>Erwinia psidii</i> , obtidos na região de Brazlândia-DF e nos estados de São Paulo, Paraná e Espírito Santo.....	65
FIGURA 11. Lâminas de vidro recobertas com gel de agarose 1% em tampão PBS 1x para realização de teste de imunodifusão radial dupla. A. Isolados coletados na região de Brazlândia-DF (poços periféricos) no ano de 2001, em diferentes propriedades reagindo com antissoro anti- <i>E. psidii</i> (poço central); B. Isolados coletados na região de Brazlândia-DF (poços periféricos) no período de 2004 a 2005, em diferentes propriedades reagindo com antissoro anti- <i>E. psidii</i> (poço central.....	92
FIGURA 12. Evolução do crescimento populacional de <i>Erwinia psidii</i> em folhas de goiabeira maceradas, durante o intervalo de 60 horas.....	95
FIGURA 13 . Evolução do crescimento populacional de <i>Erwinia psidii</i> inoculada a 10^7 ufc/ml em folhas de goiabeira maceradas e limiares de detecção da bactéria por imunodifusão em cada repetição.....	96
FIGURA 14 . Evolução do crescimento populacional de <i>Erwinia psidii</i> inoculada a 10^5 ufc/ml em folhas de goiabeira maceradas e limiares de detecção da bactéria por imunodifusão em cada repetição.....	97
FIGURA 15 . Evolução do crescimento populacional de <i>Erwinia psidii</i> inoculada a 10^3 ufc/ml em folhas de goiabeira maceradas e limiares de detecção da bactéria por imunodifusão em cada repetição.....	98

RESUMO

A seca dos ponteiros da goiabeira (*Psidium guajava* L.) causada por *Erwinia psidii* (Rodrigues Neto *et al.*, 1987) tem sua ocorrência mundial limitada ao Brasil, tendo sido detectada pela primeira vez no estado de São Paulo em 1982. Atualmente, essa bacteriose encontra-se também no Distrito Federal (DF), em Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná. No DF, é considerada uma das doenças mais importantes da goiabeira pois, além de provocar grandes perdas na produção, é também uma doença de difícil controle.

Considerando-se a escassez de estudos sobre essa bacteriose e o pouco conhecimento que se tem sobre a diversidade genética das populações de *E. psidii* nos pomares locais, além da suposição de que essa doença tenha sido introduzida através de mudas contaminadas assintomáticas provenientes de São Paulo, os objetivos desse trabalho foram (1) caracterizar por meio de testes bioquímicos, nutricionais e de patogenicidade, isolados bacterianos coletados em diferentes pomares na região de Brazlândia –DF; (2) caracterizar a diversidade genética entre os isolados de Brazlândia-DF obtidos de diferentes pomares e em diferentes épocas, e compará-los aos isolados de outros estados através de rep-PCR (REP, ERIC e BOX-PCR); (3) testar a especificidade de um antissoro policlonal para *E. psidii*, e desenvolver uma metodologia que permita sua detecção em mudas assintomáticas através do método de imunodifusão radial dupla.

Todos os isolados do DF, com exceção de UnB11 e UnB13, apresentaram-se como bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, que produzem ácido a partir de manitol, mas não a partir de rafinose, não reduzem nitrato a nitrito, produzem enzima catalase e não apresentaram

reação de hipersensibilidade em folhas de fumo. Todos os resultados foram condizentes com o perfil descrito por Rodrigues Neto, *et al.* (1987) para a espécie. O teste de patogenicidade permitiu distinguir os isolados em três grupos de agressividade de acordo com o tempo de aparecimento dos sintomas.

As comparações entre os perfis de amplificação obtidos por rep-PCR, a partir do DNA purificado de 43 isolados de *E. psidii*, revelaram alta similaridade entre os isolados do DF coletados em diferentes pomares e em diferentes épocas, e também alta similaridade entre os isolados do DF, e aqueles provenientes de outros estados, incluindo o isolado tipo IBSBF 435.

A partir do enriquecimento bacteriano em extrato de folhas de goiabeira esmagadas, e a utilização da técnica de imunodifusão radial dupla com antissoro específico para *E. psidii*, foi possível detectar o patógeno após 36 horas de incubação das folhas contaminadas artificialmente.

Testes realizados em casa de vegetação com mudas sadias inoculadas por aspersão com suspensão bacteriana de *E. psidii*, permitiram verificar o aparecimento de sintomas em plantas intactas, ou seja sem ferimentos prévios, indicando que a bactéria pode também penetrar por aberturas naturais.

ABSTRACT

The bacterial blight of guava (*Psidium guajava* L.) caused by *Erwinia psidii* is a serious disease affecting orchards in Brazil and it has not been reported in any other country. In Brazil, it was first detected in São Paulo state in 1982. Currently it is present in the Federal District (DF) and three other states (Minas Gerais, Espírito Santo and Paraná). In those production areas it has been considered a major disease, causing significant losses. Control measures are difficult to apply since the pathogen can be easily disseminated. Very little is known about the genetic diversity of *E. psidii* in Brazil and the objective of this study was to characterize 43 isolates, most of them collected in different orchards in the Federal District. All isolates showed biochemical and nutritional features according to those described for *E. psidii*. Pathogenicity tests were performed using detached branches and the symptoms were visible from one to nine days after inoculation, depending on the isolate aggressiveness. Genetic diversity among the isolates was evaluated by rep-PCR (REP, ERIC and BOX-PCR) which showed high similarity among the Federal District isolates, collected in different orchards and periods. High similarity was also observed between this group of isolates and those from the other three states, including the type strain IBSBF 435. A polyclonal antiserum against the type strain was produced in rabbits and showed high specificity. It was used to optimize a serology-based methodology, using double immunodiffusion for early detection of *E. psidii* in plantlets. Enrichment of the bacterial population directly on guava leaves extracts allowed the detection of the pathogen 36 hours after incubation, even from an initial artificial contamination of 10^3 ufc/ml.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E OBJETIVOS

1 - A CULTURA DA GOIABEIRA

1.1 - IMPORTÂNCIA

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é cultivada em quase todas as regiões tropicais do mundo, principalmente por se tratar de uma cultura de fácil adaptação a diferentes climas e por sua fácil propagação por sementes. É uma cultura amplamente difundida em regiões de clima subtropical, onde se encontram a maioria dos pomares comerciais (Gonzaga Neto, 2001), mas também pode ser encontrada em regiões de clima frio, onde as geadas sejam inexistentes ou aconteçam com curta duração. Trata-se de uma cultura que se adapta também a diferentes tipos de solo, tendo como fator limitante apenas umidade excessiva junto às raízes. Entretanto, se comparada a outras fruteiras, suporta bem as adversidades edafoclimáticas, apresentando boas condições de crescimento e produção (Manica, 2000a).

A goiaba é uma fruta que apresenta alto rendimento por hectare e alto padrão de aceitação, tanto para o mercado interno quanto para o mercado externo já que, além do consumo do fruto *in natura*, este pode ainda ser aproveitado de diversas formas (Pio *et al.*, 2005). O consumo da fruta *in natura* é amplo,, além de possuir polpa com alta qualidade para o processamento industrial, podendo ser usada para a fabricação de compotas (em caldas ou fatias), doces para corte, geléias, purê, polpa, néctar, sucos, base para xaropes e bebidas e sorvetes, entre outros. O fruto também vem sendo utilizado na fabricação de molhos salgados para sanduíches, como é o caso do guatchup, ketchup à base de goiaba (Freitas Junior, 2005). Possui sabor e aroma moderado característico, alto conteúdo de fibras e ótima digestibilidade, sendo

muito favorável à saúde humana, pois além das fibras, possui excelente quantidade de nutrientes (Manica, 2000a). Apresenta alto valor nutritivo, contendo cerca de 150 a 209 cal por 100 g de fruta, e um dos mais altos teores de vitamina C (ácido ascórbico) entre as frutas, sendo superada apenas pela acerola, camu-camu e caju (Manica, 2000a). Variedades silvestres de goiaba podem apresentar cerca de 600 a 700 mg de ácido ascórbico por 100 g de fruta, teor maior que qualquer variedade de laranja, fonte tradicional desta vitamina. Apresenta elevado teor de açúcares, possui ainda um considerável teor de vitamina A, vitaminas do complexo B, como a tiamina e a niacina, além de cálcio, fósforo e ferro (Paula, 1950; Martin, 1967 citado por Gonzaga Neto, 2001). A goiaba tem se mostrado uma grande fonte de licopeno, carotenóide que tem poderosa ação antioxidante, sendo utilizado na prevenção de alguns tipos de câncer como o de próstata e de doenças coronarianas. Têm se mostrado como um dos principais frutos fornecedores destas moléculas, apresentando 6,5 mg/ 100 g de fruto se comparado ao tomate ou a melancia, fontes tradicionais deste composto químico (<http://www.guatchup.com.br/saude.html>).

O elevado teor de nutrientes da goiaba pode ser de grande importância para a divulgação do produto e, com isso, o incremento do plantio comercial com variedades de goiabeira selecionadas poderá influenciar no aumento da venda e consumo da goiaba no território nacional e no exterior (Gonzaga Neto, 2001).

Em 1994 um grupo de pessoas interessadas no desenvolvimento da agricultura da goiaba em todo território nacional, fundou a Associação Brasileira dos Produtores de Goiaba: Goiabrás, sociedade que fomenta a produção e o consumo da goiaba e seus manufaturados, divulgando suas

propriedades, nos âmbitos nacional e internacional, através da participação em eventos e campanhas institucionais. Também oferecem suporte técnico e gerencial aos associados com vistas à organização e o fortalecimento do agronegócio da goiabicultura (Todafruta, 2002).

1.2 - ASPECTOS BOTÂNICOS

A goiabeira pertence à família *Myrtaceae*, da ordem *Myrtiflorae* e da subordem *Myrtineae*. Esta família, que contém cerca de 102 gêneros e 3.024 espécies, encontra-se amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta e apresenta plantas de porte variável desde árvores até arbustos e trepadeiras. São encontrados dentre as Mirtáceas quatro gêneros de importância econômica (Manica, 2000b): *Feijoa*, (goiaba serrana ou goiaba-abacaxi), *Eugenia*, (pitangueira, *Eugenia uniflora* L.) e o gênero *Mirciaria*, cujo principal representante é a jaboticabeira (*Myrciaria jaboticaba* Berg.). O quarto gênero de importância econômica é o *Psidium*, com espécies apresentando frutos com grande número de sementes. Este gênero é formado por 15 espécies nativas da América Tropical que, com exceção de *P. guajava*, não apresentam interesse econômico. Porém, estas espécies constituem um banco de germoplasma valioso, podendo ser utilizadas em programas de melhoramento genético (Gonzaga Neto, 2001).

A goiabeira apresenta-se como um arbusto ou árvore de pequeno porte, podendo atingir de 3 a 6 metros de altura em pomares conduzidos sem poda. Possui folhas de formato elíptico-oblongo, opostas que caem após a maturação. Apresenta raízes adventícias primárias que se concentram a uma profundidade de 30 cm do solo. Destas saem raízes adventícias secundárias

que podem atingir profundidade de até 4 ou 5 m (Zambão e Neto, 1998 citado por Gonzaga Neto, 2001). Plantas de goiabeira propagadas por sementes apresentam raiz pivotante, enquanto que as mudas propagadas por enraizamento de estaca apresentam apenas raízes secundárias e não alcançam grande profundidade (Gonzaga Neto, 2001).

As flores da goiabeira são brancas, hermafroditas, podem surgir em botões isolados ou em grupos de dois ou três botões, e a ocorrência destes pode variar com as condições ambientais, fertilidade do solo e variedade. A escolha de variedades que produzam botões isolados tende a minimizar os custos da produção, já que assim não há a necessidade de desbaste dos frutos (Gonzaga Neto, 2001).

Os frutos da goiabeira são bagos que apresentam tamanho, forma e coloração de polpa variável, diferindo conforme a variedade. A frutificação freqüentemente começa no 2º ou 3º ano após o plantio no local definitivo, quando pomar é formado por mudas propagadas por semente. Em pomares implantados com mudas propagadas vegetativamente por estaca ou enxertia, a floração já se inicia a partir do 7º ou 8º mês (Gonzaga Neto, 2001).

Estudos conduzidos na Índia, caracterizando o aumento do fruto em altura e diâmetro e em diferentes estações climáticas, evidenciou que o fruto da goiabeira apresenta três períodos distintos de crescimento (Rathore, 1976 citado por Gonzaga Neto, 2001). O período inicial apresenta crescimento acelerado, principalmente nos períodos de alta temperatura e tem início alguns dias após a antese (abertura das flores) prosseguindo por 45 ou 60 dias. Já o segundo período é relativamente lento, aproximadamente 30 dias chegando até a 60 dias. Nesta fase ocorre o amadurecimento e o endurecimento das

sementes. O terceiro período é caracterizado por um aumento rápido na altura e diâmetro do fruto, apresenta um período médio de 30 dias, sendo prolongado em estações mais frias. No final do terceiro período ocorre a mudança de coloração externa do fruto (Gonzaga Neto, 2001).

Estudos mostraram que o fruto da goiabeira leva aproximadamente 14 semanas para atingir a maturidade e, em pomares com variedade Paluma, verificou-se que a colheita do fruto em estágio “de vez” ocorria em um período de 120 a 130 dias.

De acordo com Gonzaga Neto (2001) dependendo do sistema de manejo adotado no pomar, o tempo decorrido da poda até o final da colheita varia de 6 a 8 meses. É de fundamental importância conhecimento da curva de crescimento do fruto, que pode variar conforme a variedade e condições climáticas. Este conhecimento auxiliará o produtor a planejar suas atividades como desbaste do fruto, pulverizações, ensacamento, e assim determinar a melhor época para a colheita e comercialização de sua produção. Em decorrência de diferenças climáticas, pode haver diferenças de um local para outro, na época de florescimento e sua duração. Em regiões que apresentam clima tropical, a produção de frutos pode ocorrer durante o ano todo, desde que haja boa disponibilidade hídrica no solo.

O uso da propagação por sementes não é recomendado pois os pomares formados com esse tipo de mudas apresentam diferentes tipos de plantas, com diferentes características na produção e qualidade dos frutos, devido a grande variabilidade genética resultante da polinização cruzada, essa excessiva variação nos tipos de plantas pode dificultar até mesmo o manejo das podas de frutificação(Gonzaga Neto, 2001).

1.3 - PRODUÇÃO DE GOIABA NO BRASIL

O Brasil apresenta-se como o terceiro maior produtor mundial de goiaba, sendo superado apenas pela China e Índia, sendo, entretanto o maior produtor de goiabas com polpa vermelha e a China, o maior produtor de goiabas brancas (Francisco *et al.*, 2005 & Gonzaga Neto, 2001). Paquistão, México, Egito, Venezuela, África do Sul, Jamaica, Quênia e Austrália também se destacam como países produtores. Entre os Estados brasileiros, destacam-se como maiores produtores: São Paulo, Pernambuco e Minas Gerais, respondendo em conjunto por mais de 80% da produção nacional. São também produtores de goiaba os Estados do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Ceará (Gonzaga Neto, 2001). Além destes estados, a cultura também é explorada de maneira expressiva no Distrito Federal (Coelho *et al.*, 2002a).

Entre 1988 e 1995, São Paulo liderou a produção de goiaba no território brasileiro, representando 45% da área total colhida. Neste mesmo período aparecia Pernambuco como o segundo maior produtor, seguido por Rio Grande do Sul, Paraíba e Bahia consecutivamente (Manica, 2000a).

Segundo Francisco *et al.* (2005), em São Paulo são identificadas três principais regiões produtoras, a primeira formada pelos municípios de Taquaritinga, Monte Alto, Vista Alegre do Alto e Urupês, a segunda pelo município de Valinhos e a terceira formada pelo município de Mirandópolis, assim como também municípios distantes até 50 km destas regiões. No estado de São Paulo e no DF a produção é típica de pequenos produtores devido à exigência do cultivar por constantes podas e irrigação no caso de frutas para consumo *in natura*, sendo inviável esta prática em grandes áreas por tornar a produção onerosa.

Dados obtidos pelo IBGE (IBGE, 2003) fornecem as áreas destinadas à colheita e a quantidade de goiaba produzida em toneladas, segundo as grandes regiões e as Unidades da Federação (Tabela 1).

Em 2002, a produção brasileira de goiaba foi de 321.127 toneladas, e, a área total colhida foi de 6.958 hectares. As médias do volume comercializado (em toneladas) na CEAGESP em São Paulo nos últimos 5 anos foram as seguintes: Janeiro, 965; Fevereiro, 1.157; Março, 1.309; Abril, 937; Maio, 840; Junho, 750; Julho, 770; Agosto, 901; Setembro, 845; Outubro, 1.033; Novembro, 872; Dezembro, 797 (Agrianual, 2005).

De acordo com Agrianual (2006) o volume de goiaba comercializado no CEAGESP-SP no ano de 2001 foi de 11.413 toneladas, 11.545 toneladas em 2002, 10.985 toneladas em 2003, 10.736 toneladas em 2004 e 6.247 toneladas em 2005. Entre o período de 1996 a 2001 a região sudeste mostrou-se como a principal produtora de goiaba em relação às outras regiões, porém durante os anos de 2002 e 2003 a região nordeste superou esta produção, e durante este período apresentou também uma estimativa de área colhida em hectares superior aa região sudeste (Agrianual, 2006).

De acordo com Manica (2000a) no estado de São Paulo especificamente, frutos de melhor qualidade têm sido produzidos, devido aos trabalhos de melhoramento, que permitiram a obtenção de cultivares com maior potencial produtivo, além da melhoria na cadeia de comercialização, desde o manuseio correto da fruta, até sua embalagem e armazenamento ideal e a substituição

Tabela 1. Áreas destinadas a colheita e volume de goiaba produzido nas diferentes regiões do Brasil e nas Unidades da Federação de cada região.

Regiões e Unidades da Federação	Área destinada à colheita (Hectares)	Volume Produzido (Toneladas)
Norte	244	3 191
Rondônia	59	347
Acre	-	-
Amazonas	70	49
Roraima	-	-
Pará	100	2 500
Amapá	10	170
Tocantins	5	125
Nordeste	9 138	155 078
Maranhão	-	-
Piauí	53	414
Ceará	471	3 523
Rio Grande do Norte	396	2 528
Paraíba	568	4 922
Pernambuco	4 742	109 246
Alagoas	25	242
Sergipe	172	536
Bahia	2 711	33 667
Sudeste	6 496	132 564
Minas Gerais	626	4 890
Espírito Santo	364	6 900
Rio de Janeiro	618	10 894
São Paulo	4 888	109 880
Sul	1 037	13 164
Paraná	291	6 428
Santa Catarina	7	63
Rio Grande do Sul	739	6 673
Centro-Oeste	861	24 750
Mato Grosso do Sul	15	150
Mato Grosso	-	-
Goiás	620	17 420
Distrito Federal	226	7 180

de pomares antigos propagados por sementes por pomares propagados vegetativamente.

Este incremento na produção possibilitou a disponibilização de frutos de primeira qualidade, sendo identificados cinco mercados para a goiaba. São eles: o mercado de exportação, para frutos de ótima qualidade e ótima apresentação com sabor e aroma delicados; o mercado brasileiro para frutas de primeira qualidade, mais caras, com frutos grandes, sem defeitos na aparência, com polpa firme e casca resistente ao manuseio; o mercado interno para frutas comuns de polpa preferencialmente vermelha, sadias, porém podendo apresentar algum defeito em sua aparência, visando consumo *in natura* e a fabricação de doces caseiros; e o mercado de frutas para processamento, com frutas disponíveis durante o período de safra como também durante todo o ano.

No nordeste, a cultura da goiabeira juntamente com a cultura da bananeira, são grandes fornecedoras para a indústria de doces, chegando à cerca de 80% de toda matéria-prima utilizada. A existência de aproximadamente 14 pólos de agricultura irrigada no Nordeste brasileiro favorece a exploração de diversas espécies frutíferas, o que possivelmente possibilitará a ampliação da cultura nesta região do país. Essas regiões permitem a produção de frutas por quase o ano todo, inclusive nos períodos em que os mercados estrangeiros encontram-se desabastecidos (Gonzaga Neto, 2001).

Embora o volume seja insignificante, o mercado externo exige um padrão de qualidade do fruto superior ao destinado ao mercado local, e isso só é obtido em culturas tecnificadas e formadas com variedades especialmente

selecionadas. Porém para a cultura da goiabeira, com exceção de São Paulo, pouco tem sido utilizado do conhecimento tecnológico objetivando otimizar sua exploração qualitativa e quantitativa (Gonzaga Neto, 2001).

Além de todos esses fatores citados acima, muitos outros influem na insignificância das exportações de goiaba ao natural, entre eles o desconhecimento dos produtores diante dos consumidores estrangeiros, a fragilidade do fruto na fase de pós-colheita, e o preço final de venda do fruto no mercado externo, muito alto se comparado às outras frutas (Manica, 2000c).

1.4 - VARIEDADES

As variedades de goiaba diferem entre si em vários aspectos, desde o formato da copa que podem se apresentar mais eretas ou de maneira mais esparramada, época de produção (precoce, meia estação ou tardia), produtividade, número, tamanho e formato do fruto, coloração da polpa e destino da produção (consumo *in natura*, processamento industrial, etc). Variedades de goiabeira produtoras de frutos para o consumo *in natura*, devem levar em conta o mercado visualizado como destino final. Se a produção é para consumo em território nacional, a preferência é para frutos com polpa de coloração vermelha, já para o mercado externo a preferência é de frutos com polpa branca (Gonzaga Neto, 2001).

No Brasil hoje é encontrada uma grande variabilidade genética nas populações de goiabeiras, introduzidas a partir de genótipos provenientes da Austrália, Estados Unidos e, principalmente, da Índia. Materiais com origem australiana tiveram grande participação na melhoria genética das variedades

brasileiras, principalmente aquelas voltadas para produção de frutos para consumo *in natura* (Kawati, 1997).

As frutas produzidas para consumo *in natura* são as que apresentam polpa de coloração vermelha e com sabor adocicado, com poucas sementes, casca enrugada e predominantemente verde, de tamanho relativamente grande em média pesando 350g. São as preferidas pelos consumidores as variedades Pedro Sato, Rica e Paluma. Ogawa nº1 e nº3, e Triplóide (cultivar sem sementes) são também boas opções de frutas de polpa vermelha, mas que possuem casca lisa. Dentre as variedades de polpa branca, somente frutas selecionadas são bem aceitas, entre elas Kumagai e Ogawa Branca nº1. Já as frutas produzidas para a indústria apresentam polpa de coloração vermelho intenso, homogeneidade na maturação, poucas sementes, e tamanho variável do fruto. Cultivares como Paluma e Pedro Sato podem ser produzidas para ambos os mercados (Pio *et al.*, 2005).

1.5 - CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS

Vários fatores podem influenciar na produção da goiabeira, desde os níveis de radiação solar, temperatura e umidade do ar, precipitação pluvial, ação do vento e tipos de solo. A cultura da goiabeira exige grande intensidade de radiação solar, sendo fator de grande importância para o crescimento, floração e frutificação das plantas. Daí a necessidade de poda das goiabeiras, já que copas fechadas criam ambiente desfavorável, em virtude de uma distribuição desigual da radiação solar, diminuindo com isso, a produção (Gonzaga Neto, 2001).

A umidade do ar é fator importantíssimo na cultura da goiabeira, afetando tanto a fisiologia da planta quanto à suscetibilidade da goiabeira a doenças causadas por fungos. Alta umidade relativa possibilita a produção de ramos vigorosos, em contrapartida, se esta alta umidade for associada a temperaturas também elevadas, acarretará uma maior incidência de doenças fúngicas e, conseqüentemente, perdas econômicas (Gonzaga Neto, 2001).

A apresentação de uma copa adequada, que possibilite uma maximização na produção e possibilite o fornecimento de frutos de boa qualidade, só é possível se desde a fase de produção de muda e após o seu plantio definitivo, forem realizadas podas de formação que possam permitir o arejamento, insolação e uniformização da produção. A poda pode ser contínua ou drástica (total), depende da conveniência do produtor, que deve estar atrelada à expectativa de venda (Gonzaga Neto, 2001).

2 - PRINCIPAIS DOENÇAS DA GOIABEIRA NO BRASIL

A cultura da goiabeira está sujeita a diversas doenças, ocasionadas por um grande número de patógenos, entre eles fungos, bactérias e nematóides. É uma cultura que também pode ser atacada por diversos tipos de pragas, que podem, assim como as doenças, diminuir sensivelmente a produção por afetarem principalmente a aparência dos frutos para a comercialização (Pio *et al.*, 2005).

A necessidade de aquisição de mudas para a instalação dos pomares tem influenciado na disseminação de várias doenças transmitidas por meio de mudas contaminadas. A entrada de material de propagação e de frutas provenientes de outros países sem a devida fiscalização e controle, também muito influi na propagação de patógenos exóticos que causam danos às plantações no território brasileiro (Junqueira, 2000).

Numerosas espécies de fungos podem causar doenças em goiabeira, que são favorecidas por temperaturas amenas e alta umidade. Uma das principais doenças fúngicas é a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii* Wint. que ataca tanto plantas jovens, ainda no viveiro ou plantas adultas (Piccinin *et al.*, 2005). Outras doenças causadas por fungos são a antracnose, que tem como agente etiológico *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz); a podridão parda causada por *Dothiorella dominicana* Petr. & Cif., e a podridão de Botryodiplodia causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat que é a doença de maior importância na fase de pós-colheita (Piccinin *et al.*, 2005).

A verrugose é uma doença de grande importância na cultura da goiabeira podendo causar prejuízos expressivos principalmente em plantios de

goiaba para uso industrial, ataques severos podem tornar os frutos completamente deformados perdendo seu valor comercial, mas seu agente causal é ainda desconhecido. Várias outras doenças fúngicas de caráter secundário podem atacar goiabeira, entre elas: tombamento de mudas, causado por *Rhizoctonia solani* Kühn; podridão das raízes, causada por *Phytophthora* sp; cancro, causado por *Botryosphaeria dothidea*; mancha foliar, causada por *Phyllosticta guajavae*; e a antracnose maculada, causada por *Sphaceloma psidii*. Outros patógenos podem causar podridões nos frutos como é o caso de *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana*, *Phyllosticta psidicola*, *Curvularia tuberculata*; *Pestalotiopsis psidii*; *Macrophomina alahabadensis*; *Phomopsis destructum* e *Penicillium* sp. (Piccinin et al., 2005).

Doenças causadas por nematóides podem reduzir drasticamente a produção da goiabeira, levando até à sua morte, já que estes atacam as raízes das plantas e são de difícil controle. São eles: *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla*, *Radopholus* sp., *Rotylenchulus reniformis*, *Helicotylenchus nannus* e *Aphelenchus avenae*. Os fitonematóides que ocasionam prejuízos de maior significância à goiabeira encontram-se no gênero *Meloidogyne*, e são conhecidos por causar galhas no sistema radicular da planta. *M. incognita* raça 1 apresenta-se como o nematóde-das-galhas mais disseminado no mundo, sendo amplamente relatado no Brasil. Outro fitonematóide do mesmo gênero e de grande importância é *M. mayaguensis*, que tem causado grandes prejuízos em pomares irrigados no semi-árido do Vale do São Francisco (Moreira & Sharma, 2001). Este nematóide foi relatado pela primeira vez no Brasil no ano de 1988, em Pernambuco (PE), Curaçá e Maniçoba (BA), porém teve seu primeiro registro no ano de 2002, através da

confirmação da espécie por análise dos perfis enzimáticos e análise morfológica de isolados obtidos de goiabeira nesta região (Carneiro *et al.*, 2002).

Uma única doença causada por vírus foi encontrada na cultura da goiabeira, e esta é o mosaico amarelo, causado provavelmente por um caulimovírus, e foi detectada pela primeira vez no estado de São Paulo no município de Monte Aprazível (Junqueira, 2000).

O controle das diferentes doenças da goiabeira é feito pelo uso de produtos químicos, com a utilização de pulverizações regulares, juntamente com o manejo integrado que, além de combater, controla a disseminação dos patógenos para outros pomares (Pio *et al.*, 2005).

3 - A SECA DOS PONTEIROS DA GOIABEIRA

3.1 - HISTÓRICO

Um dos principais problemas fitossanitários enfrentados pela cultura da goiabeira é a bacteriose, conhecida também como a seca dos ponteiros, doença que pode diminuir drasticamente a produção. Esta doença é considerada a mais importante na cultura da goiabeira porque, além de provocar grandes perdas na produção e afetar economicamente o produtor, é também uma doença de difícil controle e de fácil disseminação (Junqueira, 1999).

A seca dos ponteiros é causada pela bactéria *Erwinia psidii* Rodrigues Neto *et al.*, e foi relatada pela primeira vez no estado de São Paulo em 1982, nos municípios de Valinhos e Pindamonhangaba, sendo posteriormente relatada em várias outras regiões deste estado, principalmente em pomares instalados por meio de mudas propagadas vegetativamente. Isto sugere a provável contaminação dos pomares através da disseminação de mudas provenientes de plantas com a enfermidade (Rodrigues Neto *et al.*, 1987). Por suas características bioquímicas e fisiológicas foi enquadrada no grupo “amylovora”, e por não revelar similaridade com outra espécie deste grupo, não foi atribuído o termo “patovar”, e sim proposta uma nova espécie, *Erwinia psidii* sp. nov (Rodrigues Neto *et al.*, 1983). Estudos anteriores realizados por Tokeshi e Valdebenito (1980), identificaram uma bactéria atacando goiabeiras no estado de São Paulo, que apresentavam sintomas similares à bacteriose. A bactéria foi identificada como pertencente ao grupo das *Pseudomonas* não fluorescentes. É provável que seja a mesma bactéria relatada em São Paulo em 1982, porém bactérias deste primeiro estudo não foram preservadas, não

sendo possível uma comparação com *E.psidii*, agente causal da seca dos ponteiros.

No ano de 1993 foi relatada pela primeira vez a seca dos ponteiros da goiabeira no estado de Minas Gerais, no município de Santos Dumont, tendo sido encontrada em pomares formados por mudas provenientes de São Paulo (Romeiro *et al.*, 1993), obtidas de viveiristas estabelecidos na região sudeste do Estado, no município de Valinhos, onde ocorreram as primeiras constatações da nova doença da goiabeira (Romeiro *et al.*, 2002). Após o relato da ocorrência da bacteriose no estado de Minas, várias medidas de controle foram recomendadas aos agricultores, entretanto, dados obtidos pelo levantamento da doença após um ano de sua identificação naquele estado, constatou que a percentagem de infecção das plantas de um pomar subiu de 65% para 100%, demonstrando a dificuldade no controle desta bacteriose (Romeiro *et al.*, 1994).

O primeiro registro da bactéria no estado do Espírito Santo se deu no ano de 2000, na região de Tabocas, Município de Santa Teresa. Esse primeiro relato informava que aparentemente a doença apresentava-se restrita a esta região, onde os pomares foram formados por mudas oriundas do estado de São Paulo, indicando que a bactéria foi introduzida através de mudas contaminadas (Oliveira *et al.*, 2000).

Uesugi *et al.* (2001) relataram a doença pela primeira vez no Distrito Federal. Materiais apresentando sintomas da seca dos ponteiros foram coletados em diferentes localidades do DF e isolamentos e análises posteriores resultaram na confirmação da presença de *E. psidii*. Levantamento realizado no ano de 2001 em 46 propriedades da região de Brazlândia-DF indicou que a

bactéria apresentava-se em 41,3% das amostras coletadas, demonstrando a sua alta disseminação. No DF, a maioria dos pomares foram formados com mudas provenientes de São Paulo, e as principais variedades plantadas nesta região são Paluma, Pedro Sato, Ogawa, Australiana e uma variedade com polpa de coloração vermelha conhecida como “Vermelha Comum” (Coelho *et al.*, 2002a).

A bacteriose é a principal doença da goiabeira no Distrito Federal, ocasionando grandes perdas na produção de goiaba, levando até ao abandono do cultivo desta fruteira por parte de alguns produtores, devido aos grandes prejuízos causados por esta doença. Segundo Junqueira (2000) há relatos de perdas na produção na região de Brazlândia de até 85%, ocorridas em janeiro de 1999, devido à infecção dos pomares por uma doença com sintomas semelhantes à seca dos ponteiros. Durante o período de março a setembro de 2001, novos estudos foram realizados nos pomares de Brazlândia para confirmação da presença de *E. psidii*, constatando-se que aproximadamente 56% das propriedades estavam infectadas pela bactéria (Coelho *et al.*, 2002b).

3.2 - SINTOMATOLOGIA

Goiabeiras contaminadas pela bacteriose apresentam sintomas em brotações, ramos novos e pouco lignificados, além de flores, frutos jovens, folhas novas e folhas adultas (Figura 1). De maneira geral os sintomas ficam restritos à parte final dos ramos, porção mais jovem da planta, motivo pelo qual a doença foi denominada seca dos ponteiros (Tavares & Lima, 2001).

E. psidii afeta galhos e ramos jovens, causando colapso no tecido vascular destes e a posterior seca dos ponteiros (Rodrigues Neto *et al.*, 1987).

Foto: Abi Marques

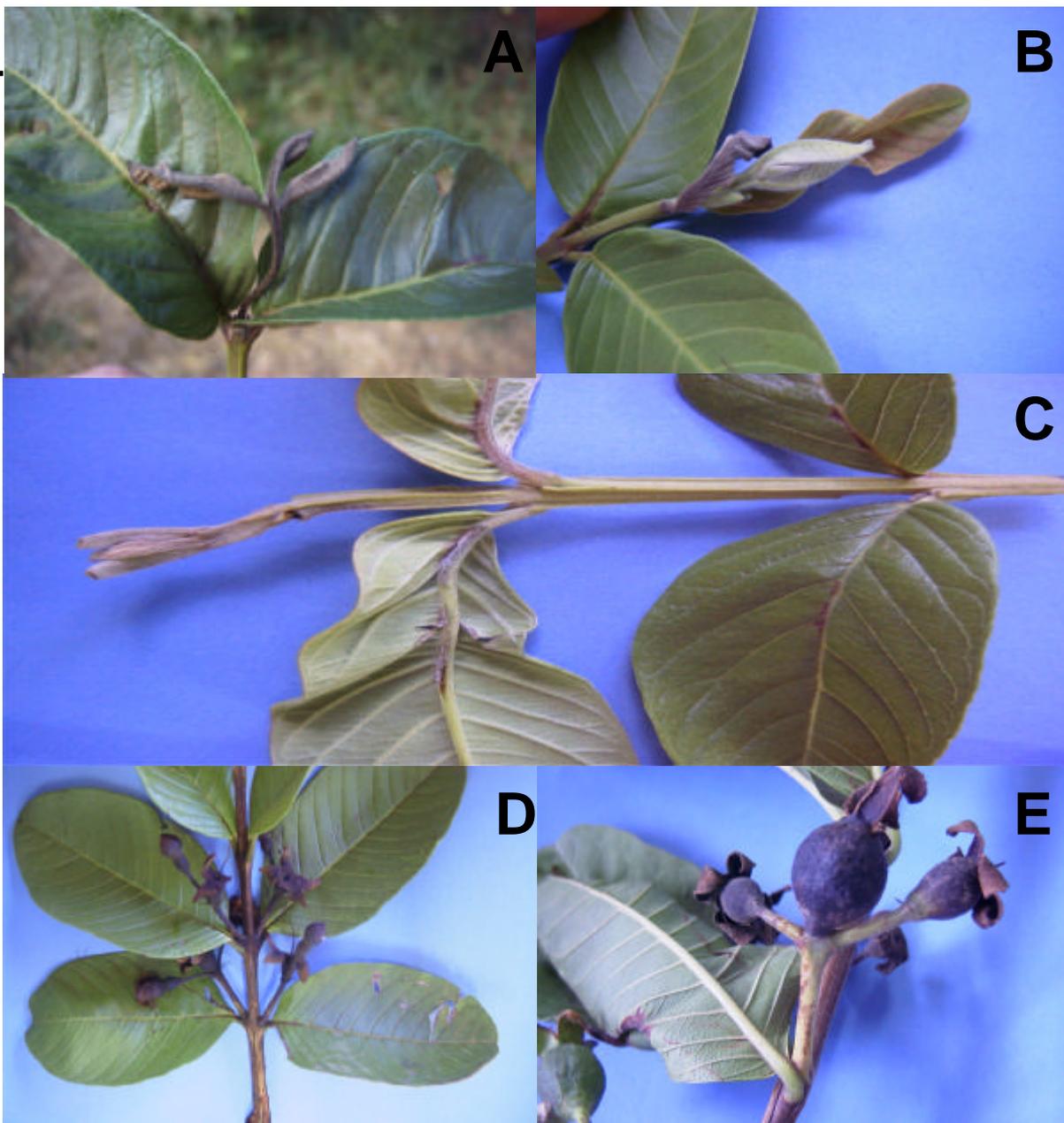


Figura 1. Sintomas característicos da seca dos ponteiros da goiabeira causada naturalmente por *Erwinia psidii* Rodrigues Neto. **A** e **B** – Primórdio foliar de goiabeira, apresentando sintomas de seca dos ponteiros; **C** – Folhas apresentando lesões na nervura central; **D** e **E** – Flores e frutos apresentando sintomas típicos de mumificação.

A infecção começa na extremidade dos brotos, com murcha e coloração pardo-avermelhada destes, em seguida há o bronzeamento e escurecimento dos ramos (Piccinin *et al.*, 2005).

Ocasionalmente os sintomas progridem em direção à base do ramo infectado e quando atingem folhas adultas, estas se apresentam com nervuras e parte do limbo necrosado, além de apresentar atrofia e deformações, podendo chegar a secar (Piccinin *et al.*, 2005). Se o patógeno alcançar galhos mais antigos, após o processo de podas destes, as novas brotações que surgirem tornam-se escuras e tendem a morrer rapidamente. O corte longitudinal de ramos infectados permite observar o escurecimento na medula do ramo, já em cortes de regiões mais velhas, distante dos ponteiros, este enegrecimento já não é mais evidente (Rodrigues Neto *et al.*, 1987). Quando as plantas encontram-se severamente atacadas, pode-se ainda observar o aparecimento de exsudação bacteriana na superfície dos ramos (Rodrigues Neto *et al.*, 1987).

Em folhas jovens os sintomas se apresentam com o escurecimento inicial da nervura principal, e posteriormente lesões irregulares avermelhadas se espalham por todo o limbo, até a folha por inteira apresentar-se necrosada e secar. Flores e frutos afetados apresentam lesões escuras, com posterior necrose, até secar e apresentar aspecto mumificado. Mesmo após folhas e flores secarem, e frutos mumificarem, não há queda destes, permanecendo todos aderidos à planta (Piccinin *et al.*, 2005).

Frutos grandes que chegaram a se desenvolver, mesmo estando contaminados, apresentam pequenas necroses com o fruto pequeno, porém

quando o fruto cresce apresenta extensas áreas necrosadas e exsudação (A.S.A. Marques, comunicação pessoal).

E. psidii progride internamente nos vasos condutores colonizando o interior da planta, mas não causa doença sistêmica, já que fica restrita aos ponteiros da planta, por esse motivo não causa a morte da planta, mas causa sérios prejuízos interferindo sensivelmente na produção (Tavares & Lima, 2001).

3.3 - AGENTE ETIOLÓGICO

Erwinia psidii pertence à família Enterobacteriaceae e ao grupo “amylovora” do gênero *Erwinia*. Apresenta colônias brancas (Figura 2), é gram negativa, com concentração de GC estimada em 51,7 a 52,2 (Tm), apresenta flagelos peritríquios e não produzem pigmentos em meio King's B ou GYCA (Rodrigues Neto *et al.*, 1987). É anaeróbia facultativa, com metabolismo fermentativo de glucose, produz ácido a partir dos carboidratos: inositol, L-arabinose, sorbitol, ramnose, salicina, dulcitol, manose, sucrose, frutose, galactose e manitol. Não produz ácido a partir de: rafinose, celobiose, lactose, xilose, trehalose, e “ α -methyl glucoside”. Apresenta reação positiva para catalase, levan, e redução de substâncias a partir de sacarose. Apresenta reação negativa para oxidase, urease, indol, redução de nitrato a nitrito, hidrólise de caseína, degradação de pectato e liquefação de gelatina. Teste de patogenicidade, através de inoculação artificial em mudas, apresentou resultado positivo tanto para goiabeira como para alguns membros da família *Myrtaceae*. Em tabaco, o teste de hipersensibilidade é negativo (Rodrigues Neto *et al.*, 1987).

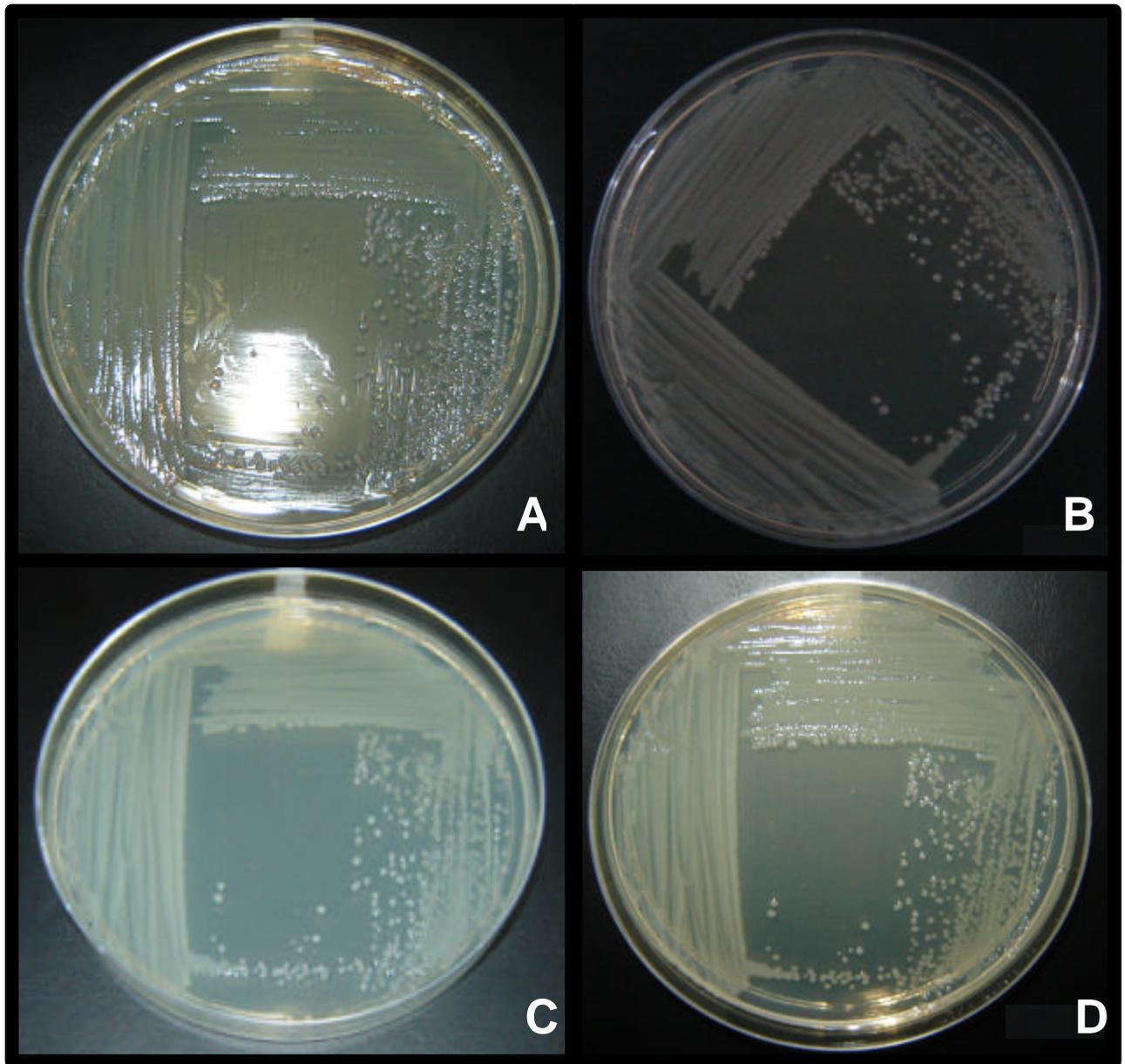


Figura 2. A-D.Cultura bacteriana de *Erwinia psidii* (isolado IBSBF 435) riscada em placas contendo meio 523 sólido, após 48 h de crescimento. Fotos tomadas sob diferentes formas de iluminação, com o intuito de se mostrar o aspecto e a textura do patógeno crescido em placa.

Foi proposta uma lista mínima de testes fisiológicos e nutricionais para identificação da bactéria em laboratório: Gram, OF, catalase, urease, degradação de pectato, reação de hipersensibilidade em tabaco, produção de ácido a partir de manitol e rafinose, e redução de nitrato a nitrito (Marques *et al.*, 2002). Além disso, Coelho *et al.* (2002b) desenvolveram uma metodologia para inoculação da bactéria, utilizando hastes e folhas destacadas, o que permitiu a otimização dos testes de patogenicidade, permitindo a obtenção de resultados em um intervalo de tempo menor que o teste utilizando mudas.

Vários fatores influenciam na sobrevivência e crescimento de *E. psidii*. Foi observado que a sobrevivência da bactéria foi maior em água estéril à temperatura ambiente do que em meio de cultura (523 sólido). O crescimento ótimo se dá à 33 °C. À temperatura de 15 °C e 36 °C o crescimento se mostrou pouco significativo, mas sem que a bactéria perdesse sua viabilidade (Coelho *et al.*, 2002c).

Estudos realizados com diferentes tipos de antibióticos permitiram avaliar o efeito destes no crescimento da bactéria em meio de cultura, e, a partir daí, selecionar aqueles para serem utilizados como componentes de um meio seletivo. A produção de um meio seletivo ou meio semi-seletivo para *E. psidii* seria de grande importância, pois facilitaria e agilizaria sua identificação e permitiria a realização de diversos estudos epidemiológicos (Evangelista e Uesugi, 2001).

3.4 - EPIDEMIOLOGIA

Vários fatores podem influenciar no desenvolvimento e na severidade da doença, como as características climáticas da região e a forma de manejo usado no cultivo da goiaba (Romeiro *et al.*, 1994).

A disseminação e a penetração do patógeno são favorecidas quando a temperatura e a umidade se encontram elevadas. Nos meses em que o clima é seco e frio em Brasília, a doença tende a diminuir mesmo nos plantios irrigados por aspersão, podendo até desaparecer em pomares que usam irrigação por gotejamento ou não são irrigados. Adubações excessivas com nitrogênio podem favorecer o aparecimento da doença, já que o excesso deste nutriente permite a formação de novas brotações, ou seja, local ideal para o surgimento e proliferação da bacteriose (Junqueira, 2000).

Os principais meios de entrada da bactéria são as lesões ocasionadas pelos tratos culturais, chuvas de pedra, abrasões por grãos de areia, insetos e injúrias naturais (Junqueira, 2000). A principal forma de disseminação do patógeno se dá com o emprego de mudas contaminadas para a formação de novos pomares. Outra forma de disseminação do patógeno é o uso de ferramentas contaminadas durante o processo de poda, atividade muito freqüente utilizada no cultivo de goiabeira, além do uso de irrigação por aspersão que tende a ser mais disseminadora da bactéria do que a irrigação por gotejamento (Lima *et al.*, 1999).

No Distrito Federal, o período em que o produtor recebe os melhores preços pelo seu produto é o da entressafra, que ocorre entre setembro e dezembro. Porém, durante essa fase, as condições edafoclimáticas permitem o

aparecimento e a intensificação da seca dos ponteiros da goiabeira, o que reduz drasticamente a produção (Frutiséries, 2001).

Na poda contínua a planta se apresenta produtiva o ano todo, se consideradas as condições ambientais favoráveis, porém apresenta a desvantagem de tornar a planta mais vulnerável à entrada da bacteriose, pois, tecidos mais jovens são mais suscetíveis. Já com a poda drástica há a possibilidade de se concentrar a época da colheita, sendo de grande valia se isto ocorrer em um período comercialmente favorável, além de oferecer menos períodos de entrada à bactéria, tornando a planta menos vulnerável (Gonzaga Neto, 2001).

3.5 – CONTROLE

Ainda não existe controle eficaz da bacteriose em pomares contaminados. A melhor forma de controle se dá por meio da aquisição de mudas sadias certificadas, no entanto, muitas vezes o produtor adquire mudas aparentemente sadias, mas que começam a apresentar sintomas somente após dois anos de desenvolvimento, tempo requerido para o início da frutificação.

O uso de mudas com certificação confiável, evitando a introdução da bacteriose no pomar seria a melhor forma de controle da doença, porém uma vez instalada a bacteriose, algumas recomendações são feitas para controlar e evitar a disseminação do patógeno nos pomares (Manica, 2001).

A condução dos pomares com formação de taça aberta garante bom arejamento e insolação no meio e no interior da copa, o que permite uma melhor penetração de defensivos agrícolas durante as pulverizações, além de

permitir um microclima com insolação intensa, não favorável à bactéria, que prefere clima úmido. Recomenda-se a poda de todos os ramos infectados com sua posterior queima, porém é necessário lembrar que uma das principais vias de entrada do patógeno se dá por meio das freqüentes podas utilizadas na cultura, então, deve-se evitar podas contínuas, evitando a indução de brotações novas durante os períodos quentes e úmidos. Outra medida de controle é a assepsia dos instrumentos de poda, visando impedir a disseminação da doença por todo o pomar. O uso de quebra ventos é recomendado, pois tende a diminuir as injúrias causadas pelo vento nas plantas (Manica, 2001).

O controle químico pode ser feito pela aplicação de pasta cúprica nos locais onde os ramos foram cortados. Recomenda-se também usar água de qualidade durante a irrigação e realizar podas em períodos com temperaturas desfavoráveis à bacteriose, ou seja, em horas de temperaturas elevadas e em dias não chuvosos (Manica *et al.*, 2001). O uso preventivo de fungicidas cúpricos é recomendado a cada 15 dias, desde a fase de brotação até o fruto atingir no máximo 3 cm, uma vez que frutos apresentando tamanho maior, mostram-se sensíveis a fungicidas. Estudos relacionando a sensibilidade de isolados de *E. psidii* a diferentes formulações cúpricas vêm sendo feitos por Rezende *et al.*, 2005. Outra medida recomendada é evitar uso excessivo de adubos nitrogenados, que favorecem novas brotações, facilitando a penetração do patógeno (Manica *et al.*, 2001).

A irrigação por aspersão deve ser evitada, pois favorece o aparecimento da bacteriose. Não sendo possível mudar a forma de irrigação, é recomendável que esta seja feita durante a manhã, para evitar ambiente úmido durante a

noite. A mais indicada seria irrigação por microaspersão ou gotejamento (Junqueira *et al.*, 1999). É necessário cuidado com a água de irrigação, principalmente se houver muitos produtores de goiaba numa mesma região, pois a água é importante disseminador da bacteriose (Piccinin *et al.*, 2005).

Para a aquisição de terrenos para instalação de pomares de goiabeira deve ser levada em conta as condições edafoclimáticas da região, para que essas sejam desfavoráveis ao aparecimento da bacteriose, também se deve evitar o plantio das mudas em solos mal drenados ou encharcados, o que aumenta consideravelmente a umidade do ambiente e com isso propicia o aparecimento do patógeno (Junqueira, 2001).

Quanto à resistência varietal, aparentemente as variedades de polpa branca apresentam maior tolerância à bacteriose do que as variedades de polpa vermelha (Piccinin *et al.*, 2005).

4. OBJETIVOS

A seca dos ponteiros da goiabeira é, atualmente, a principal doença desta cultura não só devido aos sérios prejuízos econômicos causados aos agricultores, mas também pela sua fácil disseminação dentro e entre pomares e pelo seu difícil controle. A doença já foi relatada em vários estados causando sérios prejuízos na produção, entre eles: São Paulo (Rodrigues Neto *et al.*, 1987), Minas Gerais (Romeiro *et al.*, 1993), Espírito Santo (Oliveira *et al.*, 2000) e Distrito Federal (Uesugi *et al.*, 2001).

Erwinia psidii é um patógeno cuja ocorrência está limitada ao Brasil, portanto dentro do país é considerada uma praga quarentenária A2, tendo sido detectado pela primeira vez no estado de São Paulo em 1983, e pouco se conhece sobre sua biologia e variabilidade genética. Considerando que no Distrito Federal a bacteriose é a principal doença da goiabeira, apresentando difícil controle e ampla capacidade de disseminação, e o pouco conhecimento que se tem sobre a variabilidade das populações de *E. psidii* nos pomares locais (Teixeira *et al.*, 2005), foram objetivos deste trabalho:

- Caracterizar por meio de testes bioquímicos, nutricionais e de patogenicidade isolados bacterianos recuperados de amostras de tecidos vegetais de goiabeiras plantadas na região de Brazlândia-DF, apresentando sintomas típicos da seca dos ponteiros;
- Determinar a diversidade genética de isolados de *E. psidii*, obtidos em diferentes propriedades da região de Brazlândia no Distrito Federal, e em diferentes épocas;
- Comparar geneticamente isolados do DF com isolados procedentes de outros Estados onde a doença já foi relatada (São Paulo, Paraná e Espírito

Santo), através da utilização de marcador molecular baseado em regiões repetitivas do DNA do patógeno (rep-PCR);

- Estabelecer uma coleção com grande número de isolados de *E. psidii* caracterizados quanto às suas propriedades bioquímicas, nutricionais, de patogenicidade e perfis genômicos (obtidos por rep-PCR), a ser mantida no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Biológico da UnB e na Unidade de Bacteriologia do Laboratório de Quarentena Vegetal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

- Verificar a penetração do patógeno por aberturas naturais, através da observação de sintomas após inoculação da suspensão bacteriana em plantas livre de ferimentos;

- Produzir anticorpo policlonal específico contra *E. psidii* e otimizar um protocolo que permita a detecção da bactéria em material de propagação vegetativa, seja estacas e/ou mudas enviveiradas com ausência de sintomas, através do método de imunodifusão radial dupla.

CAPÍTULO 2

Caracterização de isolados de *Erwinia psidii* do Distrito Federal

1. INTRODUÇÃO

No Distrito Federal a goiabeira destaca-se como uma das principais fruteiras cultivadas na região, com uma área cultivada que evoluiu de 93 ha para 175,3 ha no período de 1994 a 2000. A produção também apresentou um acréscimo, passando de 2,5 mil toneladas para 6,3 mil toneladas no mesmo período. A produtividade passou de 26,9 t/ha para 36,0 t/ha, representando um aumento de 34%. Brazlândia é a principal região produtora no DF, representando 70% da produção e 68% da área cultivada (Frutiséries, 2001).

Devido ao crescimento da produção de goiaba no Distrito Federal, tem-se dado maior importância aos patógenos que atacam esta cultura e causam graves prejuízos. A bacteriose causada por *Erwinia psidii* foi relatada pela primeira vez no DF em 2001 por Uesugi *et al.*, embora tenha estado presente há alguns anos (Takatsu, comunicação pessoal) e tem sido alvo de estudos nesta região por se tratar do principal patógeno da goiabeira, provocando grandes perdas na produção (Uesugi *et al.*, 2001).

Os trabalhos existentes sobre esta bacteriose, resumem-se a descrição do patógeno (Rodrigues Neto *et al.*, 1987) e aos relatos de sua ocorrência em diversos Estados do Brasil (Romeiro *et al.*, 1993, Oliveira *et al.*, 2000; Uesugi *et al.*, 2001). A principal forma de identificação de *E. psidii* se dá através de suas características fenotípicas, de acordo com a taxonomia tradicional das bactérias que depende de uma classificação artificial baseada em vários caracteres fenotípicos, entre eles, caracteres bioquímicos, nutricionais e de patogenicidade (Goto, 1992). Dessa maneira, Marques *et al.* (2002)

descreveram o emprego de um conjunto de testes bioquímicos e nutricionais, que permitiu a caracterização de isolados bacterianos comparando-os a um representante da espécie *E. psidii* previamente identificado.

Embora a caracterização fenotípica seja de grande importância para a identificação do patógeno e diagnose da doença, esta ferramenta não consegue por si só, detectar diferenças entre os isolados de uma mesma espécie. Enquanto as características fenotípicas não refletem a relação genética entre os diferentes isolados, os métodos baseados na análise do DNA são mais estáveis e possibilitam uma derivação precisa do relacionamento genético os mesmos (Louws *et al.*, 1999). A revolução na caracterização de microrganismos iniciou-se com o uso de marcadores genéticos, como por exemplo as isoenzimas. Posteriormente com o avanço da biologia molecular, surgiram os métodos de detecção de polimorfismo genético baseados na análise direta do DNA, tais como a análise RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), na qual o uso de enzimas de restrição permite a análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O desenvolvimento de um método baseado na detecção direta do DNA, através da sua amplificação em cadeia por meio de uma enzima polimerase, PCR (*Polymerase chain reaction*), permitiu a geração de um grande número de cópias de um fragmento específico de DNA, a partir de pequenas quantidades de DNA genômico (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988, Pereira, 2003). PCR possibilitou o aparecimento de novos marcadores moleculares com diferentes níveis de resolução para a classificação do nível de gênero, espécie, subespécie, biovar até o nível de isolado (Rademaker & De Bruijn, 1997).

Diferentes técnicas baseadas na análise do DNA possibilitam a diferenciação entre espécies de patógenos e sua detecção em uma dada amostra (Louws *et al.*, 1994), além de produzirem *fingerprintings* que revelam a variabilidade intraespecífica do patógeno (Versalovic *et al.*, 1994). Várias populações de fitobactérias têm sido caracterizadas por diferentes marcadores moleculares. A escolha do marcador depende do objetivo do estudo, seja a diferenciação entre isolados relacionados ou entre espécies diferentes.

Entre os marcadores moleculares desenvolvidos a partir de PCR está o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990) no qual *primers* curtos de sequência arbitrária são usados para gerar *fingerprintings*, que são, todavia, bastante vulneráveis a pequenas diferenças nas condições do PCR (Versalovic *et al.*, 1993, Meunier & Grimont, 1993).

Uma técnica de análise genômica amplamente utilizada em procariotos é rep-PCR (PCR-repetitivo) (Versalovic *et al.*, 1991), que tem-se mostrado extremamente confiável, reproduzível, de simples e rápida realização e altamente discriminatória, mesmo entre populações de uma mesma espécie (Versalovic *et al.*, 1994, Louws *et al.*, 1999, Rademaker & De Bruijn, 1997). Rep-PCR utiliza *primers* que são complementares à seqüências repetitivas no DNA, altamente conservadas, que se apresentam em múltiplas cópias no genoma da maioria das bactérias Gram-negativas e em várias Gram-positivas, podendo desta forma ser utilizado para produzir *fingerprints* em diversos organismos (Versalovic *et al.*, 1994, Lows *et al.*, 1999, Rademaker & De Bruijn, 1997). O uso desses *primers* leva a amplificação seletiva de regiões genômicas distintas localizadas entre as regiões repetitivas, o que gera

padrões de bandas referentes às regiões entre esses elementos repetitivos (Rademaker & De Bruijn, 1997).

Famílias de seqüências repetitivas intergênicas têm sido encontradas em procariotos e foram primeiramente identificadas em bactérias entéricas como *Escherichia coli* (Gilson, 1984). Três famílias de regiões repetitivas já foram descritas. São elas: os elementos REP (*repetitive extragenic palindromic*) de 35-40bp, ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) de 124-127bp e o elemento BOX de 154bp (Versalovic *et al.*,1991).

O uso de rep-PCR tem a vantagem de que os *primers* possuem seqüência conhecida e já foram utilizados em estudos com várias bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Desta forma não é necessário o conhecimento prévio da estrutura genômica de uma determinada espécie e dispensa uma seleção inicial de *primers*, como é necessário para a análise de RAPD (Welsh & McClelland, 1990), e com isso, gera resultados em um período menor de tempo.

O tipo de amostra utilizada para rep-PCR depende do objetivo do estudo, podendo se obter padrões de bandas a partir de DNA purificado, células inteiras, culturas em placas ou lesões em plantas (Rademaker & De Bruijn, 1997, Rademaker *et al.*, 1998).

O *primer* BOX gera padrões de banda complexos e robustos, enquanto o *primer* REP gera um menor nível de complexidade, porém produz padrões de bandas reproduzíveis e diferenciadoras. O *primer* ERIC é mais sensível a condições sub-ótimas de PCR, como contaminantes na preparação de DNA, porém gera padrões altamente discriminatórios. Assim, uma seleção inicial e testes preliminares com cada *primer* é recomendada para se escolher o melhor

primer para a aplicação sugerida (Rademaker & De Bruijn, 1997, Rademaker *et al.*, 1998).

Ainda não se conhece ao certo a função dessas regiões repetitivas. Várias funções têm sido sugeridas, como seu envolvimento na estabilização de mRNA (Newburry *et al.*, 1987), seu papel na terminação transcricional e domínio cromossomal de organização *in vivo*. Os elementos REP foram primeiramente descritos como sequências regulatórias potenciais dentro de regiões não traduzidas de operons, devido à sua natureza palindrômica e habilidade para formar estruturas *stem-loop* (grampo de cabelo) estáveis no RNA transcrito (Versalovic *et al.*, 1991).

O uso de rep-PCR possibilitou a diferenciação de muitos fitopatógenos, entre eles bactérias e fungos, como isolados de *Rhizobium meliloti* e bactérias gram-negativas do solo (De Bruijn, 1992), caracterização de isolados de *Bradyrhizobium* spp (Judd *et al.*, 1993, Vinuesa *et al.*, 1998), *Erwinia amylovora* (McManus & Jones, 1995), *Erwinia* spp. (Norman *et al.*, 2003), *Magnaporthe grisea* (George *et al.*, 1998), *Pseudomonas* spp. (Latour *et al.*, 1996, Weingart & Volksch, 1997, Little *et al.*, 1998, Marques *et al.*, 2000), *Ralstonia solanacearum* (Horita & Tsuchiya, 2001), *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Leung *et al.*, 1994), *Streptomyces ipomoeae* (Clark *et al.*, 1998), *Xanthomonas* spp. (Louws *et al.*, 1995, Opgenorth *et al.*, 1996, Pooler *et al.*, 1996, Cruz *et al.*, 1996, Rademaker *et al.*, 2000, Trindade *et al.*, 2005), *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (Louws *et al.*, 1994).

Considerando-se a grande eficiência descrita para esses marcadores rep-PCR (BOX, ERIC e REP), e a falta de conhecimento sobre a diversidade genética e origem das populações de *E. psidii* do DF, o presente trabalho teve

como objetivo a caracterização bioquímica e molecular de isolados coletados na região de Brazlândia no DF em diferentes épocas (2002, 2004 e 2005) comparando-os a isolados provenientes de outras regiões do país onde a doença foi constatada. Correlacionando origem dos isolados, ou seja, isolados do DF e de outros estados; níveis de agressividade, de acordo com os resultados obtidos com o teste de patogenicidade; locais de coleta (propriedade no DF); época (ano) de coleta com os grupos de rep-PCR.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.Local e período da realização dos trabalhos

Os trabalhos de caracterização bioquímica e nutricional foram realizados na Unidade de Bacteriologia do Laboratório de Quarentena Vegetal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, no período de setembro de 2004 a janeiro de 2005.

2.2. Isolados

Trinta isolados foram obtidos de amostras de goiabeiras apresentando sintomas da seca dos ponteiros coletadas em três épocas (2002, 2004 e 2005) na região de Brazlândia, Distrito Federal (Tabela 2).

Do total dos 30 isolados, 24 foram mantidos na Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia, na Embrapa (isolados com código "Emb.") e seis isolados foram mantidos na Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Laboratório de Fitopatologia no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (código "UnB"). A caracterização bioquímica dos isolados obtidos da Coleção de Bactérias da UnB foi realizada posteriormente à caracterização molecular.

Tabela 2. Isolados bacterianos procedentes da região de Brazlândia-DF, utilizados neste estudo.

Isolado	Origem	Ano de coleta
Emb.*C-076.1	Propriedade 1	2002
Emb.C-082.2		2002
Emb.C-133.1	Propriedade 2	2002
Emb.C-134.1		2002
Emb.C-140.1		2002
Emb.C-142.2		2002
Emb.C-148.2		2002
Emb.C-150.1	Propriedade 3	2002
Emb.C-151.2		2002
Emb.C-153.1		2002
Emb.C-294.1		2002
Emb.C-295.3	Propriedade 4	2002
Emb.C-296.1		2002
Emb.C-299.3		2002
Emb.C-338.2		2002
Emb.C-342.1	Propriedade 5	2002
Emb.C-343.2		2002
Emb.C-345.2		2002
Emb.C-400.3		2002
Emb.C-421.2	Propriedade 6	2002
Emb.C-424.1	Propriedade 7	2002
Emb.C-432.1		2002
Emb.C-435.2		2002
Emb.C-439.3		2002
UnB**1286		2004
UnB 1285	Propriedade 9	2004
UnB 1287	Propriedade 2	2005
UnB 1290		2005
UnB 1288	Propriedade 11	2005
UnB 1289	Propriedade 12	2005

*Emb.- Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Coleção de Bactérias Fitopatogênicas: Laboratório de Bacteriologia-Quarentena vegetal. **UnB- Universidade de Brasília. Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Depto. de Fitopatologia

2.3. Isolamento do patógeno

Para o isolamento do patógeno foram utilizadas várias partes das plantas apresentando sintomas da seca dos ponteiros tais como, frutos, hastes com brotações novas e folhas. Primeiramente as amostras foram desinfectadas superficialmente mergulhando-as em álcool 70% por aproximadamente 10 segundos, e lavando-as posteriormente com água destilada estéril. Nos frutos foram feitos cortes finos de aproximadamente 3 mm de largura com auxílio de bisturi estéril, obtendo-se fragmentos de tecido do interior e exterior do fruto. Também nos ramos necrosados foram feitas secções finas do exterior e interior, e em folhas foram feitas secções em regiões vizinhas à área necrosada. Todos os fragmentos foram esmagados em lâminas contendo uma gota de água estéril com o auxílio de bastão de vidro esterilizado, seguido do plaqueamento da suspensão pelo método de estrias ou riscas em placas de Petri contendo meio 523 (Kado & Heskett, 1970).

2.4. Preservação dos isolados

Os isolados foram recuperados e armazenados de quatro formas diferentes: (a) em glicerol 20% e estocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; (b) em água destilada estéril como suspensão 10^8 ; (c) em tubos contendo meio sólido YDC cobertos com óleo mineral estéril (Dye, 1968) e, (d) em tubos contendo meio sólido 523, onde os isolados foram riscados e após 48h de crescimento foram cobertos com óleo mineral estéril, para evitar contaminação e o ressecamento do meio. Isolados armazenados em água, em meio YDC e em meio 523 foram estocados em câmara fria à $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5. Caracterização bioquímica, nutricional e patogênica

Testes bioquímicos, nutricionais e de patogenicidade foram realizados com o objetivo de identificar e caracterizar os isolados oriundos de goiabeiras apresentando sintomas característicos da bacteriose, na região de Brazlândia-DF. Para a realização dos testes foram utilizadas culturas puras, crescidas em meio sólido 523, apresentando colônias de aspecto esbranquiçado, com características semelhantes a descrita para o patógeno (Rodrigues Neto *et al.*, 1987).

2.5.1. Testes bioquímicos e nutricionais

Foram realizados testes bioquímicos e nutricionais segundo lista mínima de testes para identificação de *E. psidii* em laboratório sugerida por Marques *et al.* (2002). Essa lista permite diferenciar *E. psidii* de todas as outras espécies de *Erwinia* pertencentes ao grupo amylovora. Os isolados selecionados foram submetidos aos seguintes testes: teste de Gram (KOH), OF, catalase, produção de ácidos a partir de rafinose e manitol, redução de nitrato a nitrito e reação de hipersensibilidade a fumo (HR) (ver anexos). Os testes foram conduzidos segundo Schaad (2001).

Realizou-se inicialmente o teste de solubilidade em KOH, que permite a lise da parede celular das bactérias Gram negativas em solução alcalina, separando-as das Gram positivas cuja parede é menos impermeável devido à uma grossa camada de peptidoglicano (Suslow *et al.*, 1982).

O teste de oxidação e fermentação de carboidratos (teste OF) proposto por Hugh & Leifson (1953), permite separar as bactérias em anaeróbicas

facultativas (fermentativas), anaeróbicas estritas (fermentativas) ou aeróbicas estritas (oxidativas), possibilitando a distinção de *Erwinia psidii* que é uma bactéria anaeróbica facultativa das bactérias gram negativas aeróbicas, como as pertencentes aos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (Romeiro, 2005).

O teste de catalase permite verificar a presença do complexo enzimático catalase, capaz de decompor o peróxido de hidrogênio tóxico (Romeiro, 2005). O teste de utilização de fontes de carbono permite verificar produção de ácido a partir de carboidratos. Este teste é feito em meio básico no qual é adicionado o indicador de pH, azul de bromotimol, e os diferentes carboidratos a serem testados. No presente estudo foram testados os carboidratos rafinose e manitol. A verificação da produção de ácido é feita pela mudança de coloração de verde para amarelo.

A presença da enzima nitrato redutase em algumas bactérias e a conseqüente capacidade de reduzirem nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) é verificada por um teste que consiste na incubação da bactéria a 28-32 °C por 72 h em meio nitrato (Schaad, 2001). O aparecimento da cor vermelha indica a presença de nitrito, já o não aparecimento da cor vermelha indica que o nitrato não foi reduzido, ou que foi reduzido além de nitrito.

A reação de hipersensibilidade (HR) é um método que consiste na infiltração de células bacterianas em uma folha de planta não hospedeira (Lozano & Sequeira, 1970). A reação de hipersensibilidade é uma resposta ativa da planta devido à infecção por fitobactérias não compatíveis, a reação acontece quando a bactéria entra em contato com os tecidos do hospedeiro e após 24 horas ocorre a morte das células ao redor do sítio de infecção, resultando no dessecamento da área necrosada (Romeiro, 2005), e está

associada também à expressão de genes de defesa, produção de compostos antimicrobianos, síntese de lignina e explosão oxidativa (Medeiros *et al.*, 2003). Foi utilizado uma agulha estéril para fazer um pequeno furo na região abaxial da folha tabaco (*Nicotiana tabaci* cv TNN), e em seguida nessa mesma região, com o auxílio de uma seringa foi injetada uma suspensão bacteriana a uma concentração de 10^8 ufc/ml. As folhas inoculadas foram avaliadas 24 h após a infiltração para se verificar a ocorrência da reação de hipersensibilidade.

2.5.2. Teste de patogenicidade

Foram realizados testes de patogenicidade com os 30 isolados bacterianos procedentes da região de Brazlândia-DF, segundo Coelho *et al.* (2002b). Hastes de goiabeira destacadas de cultivar Paluma apresentando ponteiros jovens foram colocadas em frascos Erlenmeyer contendo água destilada estéril. Junto à axila foliar das duas folhas mais novas foram feitos pequenos ferimentos com o auxílio de uma agulha, onde foi colocada uma pequena gota da suspensão bacteriana a uma concentração de 10^8 ufc/ml. Cada frasco foi coberto por um saco plástico borrifado com água destilada estéril com o intuito de manter a umidade e mantido a temperatura ambiente (25-28 °C) sob luz natural.

As hastes foram avaliadas diariamente, a partir do segundo dia da inoculação para se observar o aparecimento dos sintomas típicos da seca dos ponteiros. Foi feito o reisolamento a partir das hastes infectadas, no primeiro dia do aparecimento dos sintomas. Tecidos foram macerados em uma gota de água destilada estéril e a suspensão foi depositada em placas contendo meio 523 sólido pelo método de estriação por esgotamento. Culturas puras das

colônias de coloração esbranquiçada foram estabelecidas e submetidas aos três testes básicos: KOH, OF e catalase.

2.6. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

2.6.1. Isolados

Para a caracterização molecular foram comparadas 29 isolados oriundos da região de Brazlândia-DF, (Tabela 2) com exceção do isolado UnB11, além de 14 isolados cedidos pelo Instituto Biológico de São Paulo. Destes, cinco foram coletados também em Brazlândia-DF e nove são procedentes de três diferentes estados, São Paulo, Espírito Santo e Paraná (Tabela 3).

Tabela 3. Isolados de *Erwinia psidii* obtidos da Coleção de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF) utilizados neste estudo.

Isolado	Código anterior	Procedência	Ano de coleta
IBSBF 435 ^a	-	Isolado Tipo	1982
IBSBF 446 ^b	-	Reisolamento 435-	1982
IBSBF 453	-	Valinhos-SP	1983
IBSBF 454	-	Valinhos-SP	1983
IBSBF 493	-	Itariri-SP	1984
IBSBF 1347	-	Brazlândia-DF	1997
IBSBF 1461	-	Urupês-SP	1999
IBSBF 1480	-	Santa Tereza-ES	2000
IBSBF 1523	-	Carlopólis-PR	2000
IBSBF 452	-	Valinhos-SP	1983
IBSBF 1575	Emb. A-18.7	Brazlândia-DF	2000
IBSBF 1576	Emb.B-67.1	Brazlândia-DF	2001
IBSBF 1577	Emb.B-74.1	Brazlândia-DF	2001
IBSBF1579	Emb.B-78.1	Brazlândia-DF	2001

^aIBSBF 435: Isolado tipo

^bIBSBF446: Reisolamento do Isolado tipo IBSBF435

2.6.2. Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico de *E. psidii* utilizou-se o protocolo proposto por Li & de Boer (1995). O crescimento do patógeno foi realizado em meio 523 líquido, sob agitação a 150 rpm por um período de 20-24 horas à temperatura de 26-28 °C.

Após esse período, 1,5 ml do meio contendo a bactéria em crescimento foi colocado em tubo Eppendorf e submetido à centrifugação a 8.000 rpm por 5 minutos, para recuperação das células bacterianas. O sobrenadante foi descartado, vertendo-se o tubo em papel toalha para eliminação do excesso de meio.

O precipitado foi congelado a -20 °C por 1 hora, e após esse período, foi descongelado a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos. Em seguida foram adicionados às células 100 µl de acetona resfriada (-20 °C), mantendo-se os tubos no gelo por 10 minutos, e descartando-se a acetona em seguida. O precipitado foi resuspenso em 500 µl de TE, e adicionou-se em seguida, 50 µl de EDTA a 0,5 M, 28,6 µl de SDS 20% e 10 µl de Proteinase K (0,1%).

Adicionou-se igual volume de acetato de amônio a 7,5 M, ou seja, aproximadamente 590 µl, com o intuito de separar o DNA da maior parte dos resíduos celulares. Durante esse processo as amostras foram mantidas no gelo. Após esse procedimento as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para dois novos tubos com volumes iguais. Amostras que apresentavam muito material flutuando no

sobrenadante, foram submetidas à uma nova centrifugação, para garantir um sobrenadante livre de restos celulares. Ao sobrenadante foi adicionado isopropanol na proporção de 0,8 do volume total, e o DNA foi precipitado a -20 °C por 12 a 18 h. Após esse período os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos para recuperação do DNA precipitado. O isopropanol foi descartado e o precipitado lavado com 500 μ l de etanol 70%, sendo novamente submetido à centrifugação (12.000 rpm por 5 minutos), com descarte do etanol e uma segunda lavagem. Os tubos foram mantidos em estufa a 37 °C por 30-45 minutos para secagem e cada amostra foi ressuspensa em 50 μ l de TE (pH 8,0: 10mM Tris-HCl; 1mM EDTA). Todas as amostras de DNA foram mantidas à -20 °C.

2.6.3. Quantificação do DNA genômico

Para a quantificação do DNA genômico de cada isolado foi usado como fonte de comparação o marcador High DNA Mass Ladder (GIBCO, BRL). Foi usado 1 μ l do DNA concentrado, analisado em gel de agarose a 0,8% por 1 hora a 80 V. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μ g/ml) por 5 minutos, e descorado com água destilada por aproximadamente 45 minutos, e fotodocumentado em seguida (Eagle EyeTM- II Stratagene[®]). A quantificação foi feita pela comparação visual da intensidade das bandas formadas com as bandas de concentração conhecida de DNA do marcador. Após a quantificação, as amostras foram diluídas com água estéril para uma concentração final de 10 ng/ μ l, e mantidas à temperatura de -20 °C.

2.6.4. rep-PCR

Os 43 isolados de *E. psidii* foram comparados quanto aos perfis genômicos obtidos por rep-PCR (PCR-repetitivo). Os *primers* utilizados foram REP1R-I (5'-IIICGICGICATCIGGC-3') e REP2-I (5'-ICGITTATCIGGCCTAC-3'), ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGC G-3'); e BOXA1R (5'-CTCCGGCAAGGCGACGCTGAC-3') (Louws *et al.*,1994). Cada reação foi composta de: 2,5 µl de Tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl); 0,75 µl de MgCl₂ (50 mM); 2 µl de dNTPs (2,5 mM), 1 µl de cada primer(50 pmoles/µl), 0,5 µl de Taq Polimerase (5 U/µl), 3 µl de DNA(10 ng/µl) completando-se com 14,25 µl de água milliQ estéril, resultando em um volume final de 25 µl.

As reações foram realizadas em termociclador modelo PTC-100™ (Programmable Thermal Controller, Peltier- Effect Cycling/ MJ Research, Inc.), sendo que para cada *primer* foi utilizado um protocolo de amplificação distinto. As amostras amplificadas com os *primers* BOX e ERIC foram submetidas inicialmente a uma desnaturação a 95 °C por sete minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por um minuto, 53 °C por um minuto para anelamento do *primer* BOX 1AR ou 52 °C por um minuto para anelamento dos *primers* ERIC1R e ERIC2, 65 °C por 8 minutos para extensão da nova fita. Passados os 30 ciclos, as amostras permaneceram à 65 °C por 15 minutos para que fosse finalizada toda a extensão dos fragmentos amplificados. Para a reação com o primer REP as amostras foram aquecidas a 95 °C por 7 minutos, e posteriormente

submetidas a 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 44 °C por 8 minutos para anelamento dos *primers* (REP1R-I e REP2-I) e a 65 °C por 15 minutos.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris-base, 2,75 g de ácido bórico e 0,375 g de EDTA em 1 litro). Foram analisados 15 µl da reação adicionados à 2 µl de tampão de carregamento. A corrida eletroforética se deu por aproximadamente 4 horas a 80 V. Após a corrida o gel foi corado em brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 10 minutos, descorado em água destilada por 40 minutos, e finalmente submetido a fotodocumentação (Eagle Eye™- II Stratagene®). Como marcador foi utilizado 100bp-DNA Ladder (Gibco-BRL), o qual serviu como parâmetro para a determinação dos tamanhos dos fragmentos amplificados.

2.6.5. Análise dos dados

A análise dos fragmentos amplificados por rep-PCR, com os primers BOX, ERIC e REP, foi baseada na presença ou ausência de bandas, atribuindo-se os valores 1 e 0, respectivamente, a cada situação. Diferenças na intensidade das bandas foram ignoradas. Os resultados obtidos com cada *primer* foram analisados separadamente e em conjunto com o programa MVSP 3.1 (Kovach, 1999). Foi empregado o coeficiente de similaridade de Jaccard (Sneath & Sokal, 1973) e a análise de agrupamento foi determinada pelo método UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages).

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, NUTRICIONAL E PATOGÊNICA.

3.1.1 Testes bioquímicos e nutricionais:

Foram realizados testes bioquímicos, nutricionais e de patogenicidade em 30 isolados provenientes da região de Brazlândia-DF, adquiridos em diferentes períodos e em diferentes propriedades (Tabela 3). Para a realização dos testes foram selecionados isolados que apresentavam aspecto esbranquiçado não fluido, semelhante ao descrito para *E. psidii* conforme Rodrigues Neto *et al.* (1987).

Todos os isolados apresentaram reação positiva para o teste OF (Oxidação e fermentação de carboidratos), o que significa que apresentaram-se como bactérias anaeróbicas facultativas, resultado condizente com o descrito para bactérias do gênero *Erwinia*. Entretanto, dois isolados (UnB 1290 e 1289) que foram obtidos a partir de goiabeiras com sintomas aparentes da bacteriose e que apresentaram aspecto típico da bactéria em estudo, foram identificados como aeróbicos estritos.

No teste de solubilidade em KOH (peróxido de potássio), que permite diferenciar bactérias Gram-negativas das Gram-positivas, verificou-se que todos os isolados foram identificados como Gram-negativos, com exceção do isolado UnB 1290, que apresentou discrepância quanto à classificação de *E. psidii*, pois foi identificado como Gram-positivo.

Da mesma forma, quanto ao teste de catalase, o isolado UnB 1290 apresentou resultado contrário aos demais, com reação negativa para atividade de catalase, enquanto todos os outros isolados estudados apresentaram resultado positivo.

Os testes de produção de ácido a partir de carboidratos, utilizando como fontes manitol e rafinose, mostraram resultado positivo para manitol para todos os isolados, exceto UnB 1290. Já para produção de ácido a partir de rafinose, todos os isolados apresentaram resultado negativo. Da mesma forma, todos os isolados apresentaram reação negativa no teste de redução de nitrato a nitrito. Nenhum dos isolados utilizados nesse estudo apresentou reação de hipersensibilidade em folha de fumo 24 horas após a infiltração da suspensão bacteriana.

Na Tabela 4 encontram-se sumarizados os resultados dos testes bioquímicos e nutricionais obtidos de todos os isolados da região de Brazlândia-DF. Pelos resultados obtidos verificou-se que 93% dos isolados apresentou características bioquímicas e nutricionais condizentes com as descritos para *E.psidii*, ou seja, são bactérias gram negativas, anaeróbias facultativas, que não reduzem nitrato a nitrito, produzem catalase, produzem ácidos a partir de manitol mas não a partir de rafinose e não induzem reação de hipersensibilidade (HR) em tabaco. Os isolados UnB 1290 e 1289 apresentaram divergências quanto às características acima descritas, e seguramente não pertencem ao gênero *Erwinia*, já que apresentaram metabolismo oxidativo e não fermentativo, o que diferencia este gênero de outras bactérias fitopatogênicas. Esses dois isolados não puderam ser classificados como *E. psidii*, e possivelmente são bactérias contaminantes

devido às múltiplas repicagens, ou tratam-se bactérias pertencentes à flora bacteriana de goiabeira.

Tabela 4. Testes bioquímicos, nutricionais e de patogenicidade dos isolados bacterianos obtidos de goiabeiras na região de Brazlândia-DF.

Isolado	Gram (KOH)	OF*	Catalase	Manitol	Nitrato	Rafinose	Teste de Patogenicidade	Grupo de Agressividade
Emb.C76-1	-	+	+	+	-	-	+ (5 dias)	II
Emb.C82-2	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C133-1	-	+	+	+	-	-	+ (5 dias)	II
Emb.C134-1	-	+	+	+	-	-	+ (9 dias)	III
Emb.C140-1	-	+	+	+	-	-	+ (5 dias)	II
Emb.C142-2	-	+	+	+	-	-	+ (5 dias)	II
Emb.C148-2	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C150-1	-	+	+	+	-	-	+ (12 dias)	III
Emb.C151-2	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C153-1	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C294-1	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C295-3	-	+	+	+	-	-	+ (6 dias)	II
Emb.C296-1	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C299-3	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C338-2	-	+	+	+	-	-	+ (8 dias)	II
Emb.C342-1	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C343-2	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C345-2	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C400-3	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C421-2	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C424-1	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C432-1	-	+	+	+	-	-	+ (1 dia)	I
Emb.C435-2	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
Emb.C439-3	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
UnB 1286	-	+	+	+	-	-	+ (5 dias)	II
UnB 1285	-	+	+	+	-	-	+ (5 dias)	II
UnB 1287	-	+	+	+	-	-	+ (8 dias)	III
UnB 1290	+	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1288	-	+	+	+	-	-	+ (7 dias)	II
UnB 1289	-	-	+	-	-	-	-	-

* Resultado positivo indica metabolismo fermentativo da glicose.

Classificação dos isolados quanto à agressividade.

- I. Altamente agressivos - Sintomas visíveis do 1º ao 4º dia de inoculação
- II. Medianamente agressivos - Sintomas visíveis do 5º ao 8º dia de inoculação
- III. Fracamente agressivos - Sintomas visíveis depois do 9º dia de inoculação

3.1.2. Teste de patogenicidade:

Todos os 28 isolados identificados como *E. psidii* através dos testes bioquímicos e nutricionais induziram sintomas nas hastes destacadas, apresentando resultado positivo para o teste de patogenicidade (Figura 3). Somente os isolados UnB 1290 e 1289 não induziram sintomas até o último dia de observação comportamento igual ao obtido para a testemunha inoculada com água estéril. Os sintomas nas hastes destacadas apareceram entre 1 e 12 dias, dependendo do isolado (Tabela 4). A haste destacada usada como controle negativo, na qual foi aplicada água destilada estéril no lugar da suspensão bacteriana, não apresentou nenhum sintoma até o último dia da avaliação. A observação dos sintomas foi feita diariamente duas vezes ao dia, pela manhã e pela tarde, durante 15 dias consecutivos, a partir daí as hastes começaram a apresentar um aspecto envelhecido e murcha.

Isolados que induziram sintomas entre o 1º e o 4º dia foram classificados como altamente agressivos; os que induziram sintomas entre o 5º e o 8º dia foram medianamente agressivos, e isolados que produziram sintomas nas hastes somente a partir do 9º dia, foram classificados como fracamente agressivos.

Os reisolamentos a partir das hastes destacadas apresentando sintomas revelaram a presença de colônias bacterianas de coloração branca e aspecto não fluido semelhante às características descritas para *E. psidii*. Essas colônias apresentaram metabolismo fermentativo, presença de catalase e foram identificadas como Gram negativas, confirmando tratarem-se do patógeno descrito por Rodrigues Neto *et al.* (1987).

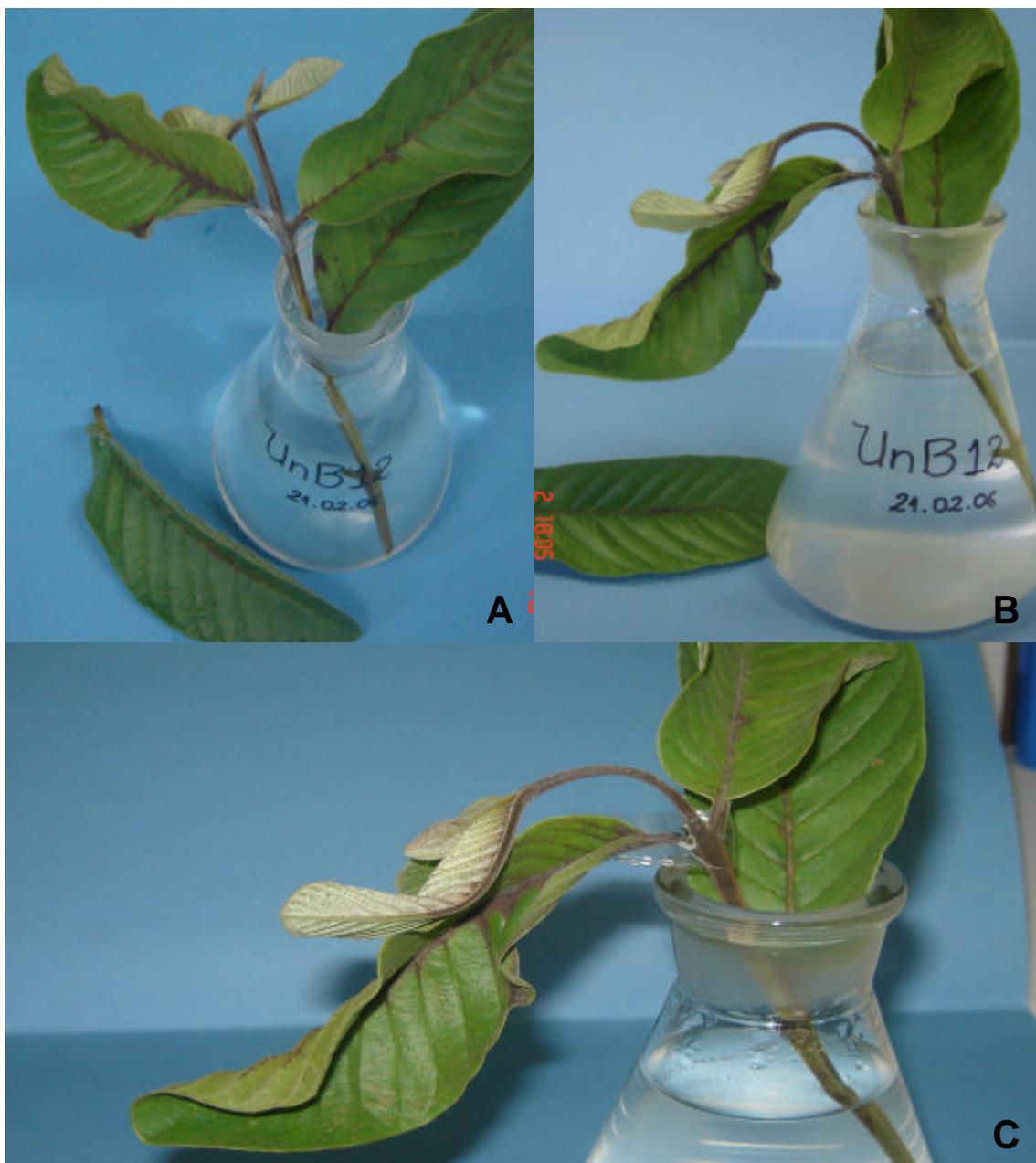


Figura 3. Teste de Patogenicidade, **A-D**. Hastes destacadas apresentando sintomas típicos da bacteriose após 5 dias de inoculação, o enegrecimento se inicia na nervura principal e se alastra para todo o ramo até as folhas apresentarem-se totalmente enroladas e secas.

3.2.CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A amplificação do DNA genômico com os *primers* que se anelam às regiões repetitivas presentes no genoma de bactérias, permitiu a caracterização da variabilidade intraespecífica da população em estudo. Fragmentos de tamanhos variando de 280 a 2787 pb foram amplificados. As reações para cada par de *primers* foram repetidas duas vezes, de maneira independente, e os perfis obtidos foram semelhantes, demonstrando a reprodutibilidade da técnica.

BOX-PCR

Amplificação com o *primer* BOX1A permitiu a geração de 23 bandas distintas variando de 380 a 2642 pb. Foram identificados oito perfis moleculares através da análise visual dos perfis eletroforéticos (Figura 4), onde foi observado um baixo polimorfismo entre os isolados, separando-os em dois grupos ao nível de 75% de similaridade. Uma exceção foi o isolado Emb.C299-3 que apresentou um coeficiente de similaridade de apenas 16% em relação aos demais. Dentre as 23 bandas analisadas, sete bandas foram polimórficas para os dois grupos de isolados que apresentaram baixo polimorfismo (tamanhos 1929pb, 1786pb, 1500pb, 1400pb, 830pb, 725pb, 480pb,) já o isolado Emb.C299-3 apresentou oito bandas distintas em relação a todos os outros isolados analisados.

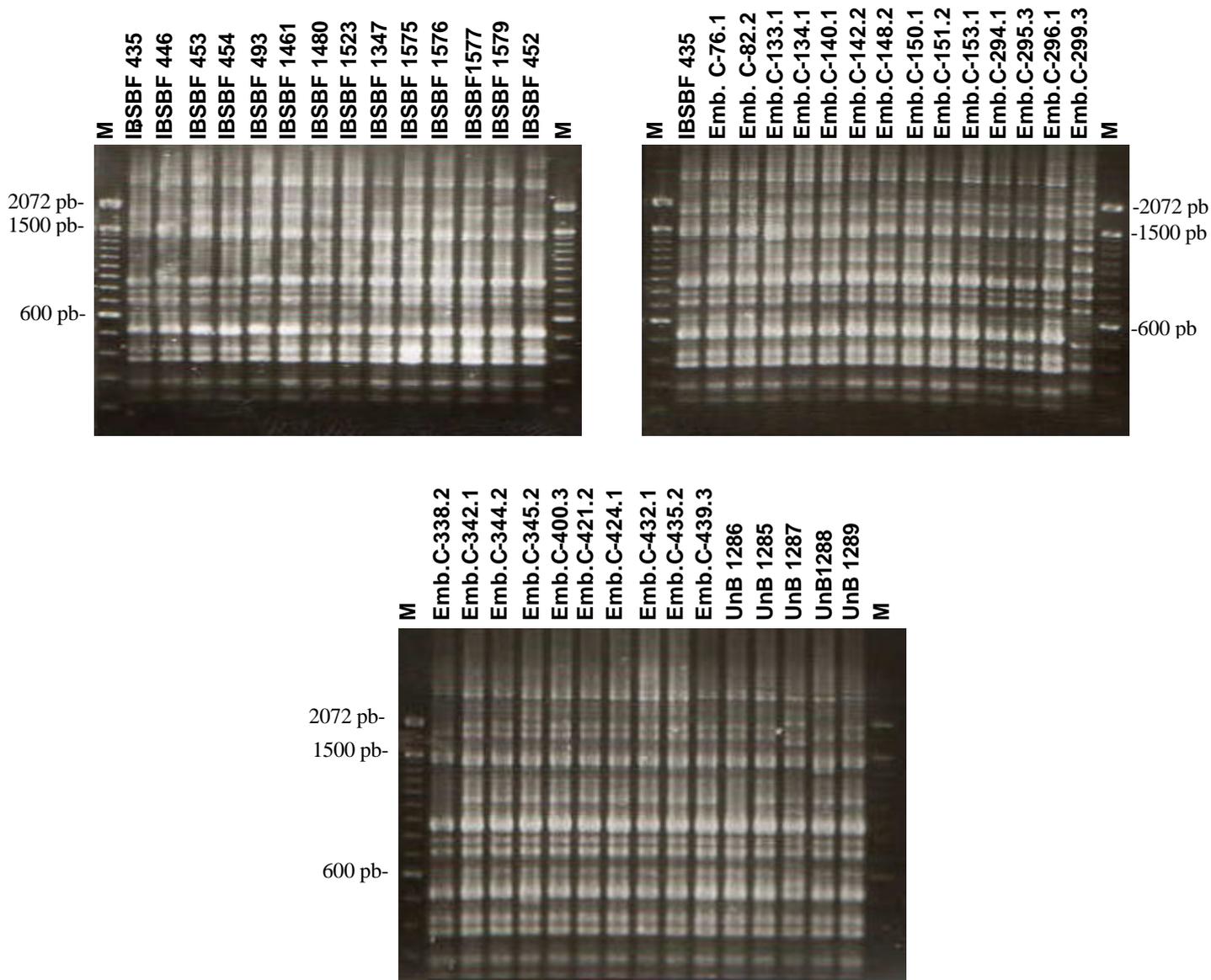


Figura 4. Análise eletroforética dos fragmentos gerados através de **BOX-PCR**, a partir de DNA purificado, dos isolados utilizados neste estudo. Marcador (M) 100 pb DNA Ladder (Gibco BRL), IBSBF 435 (Isolado Tipo).

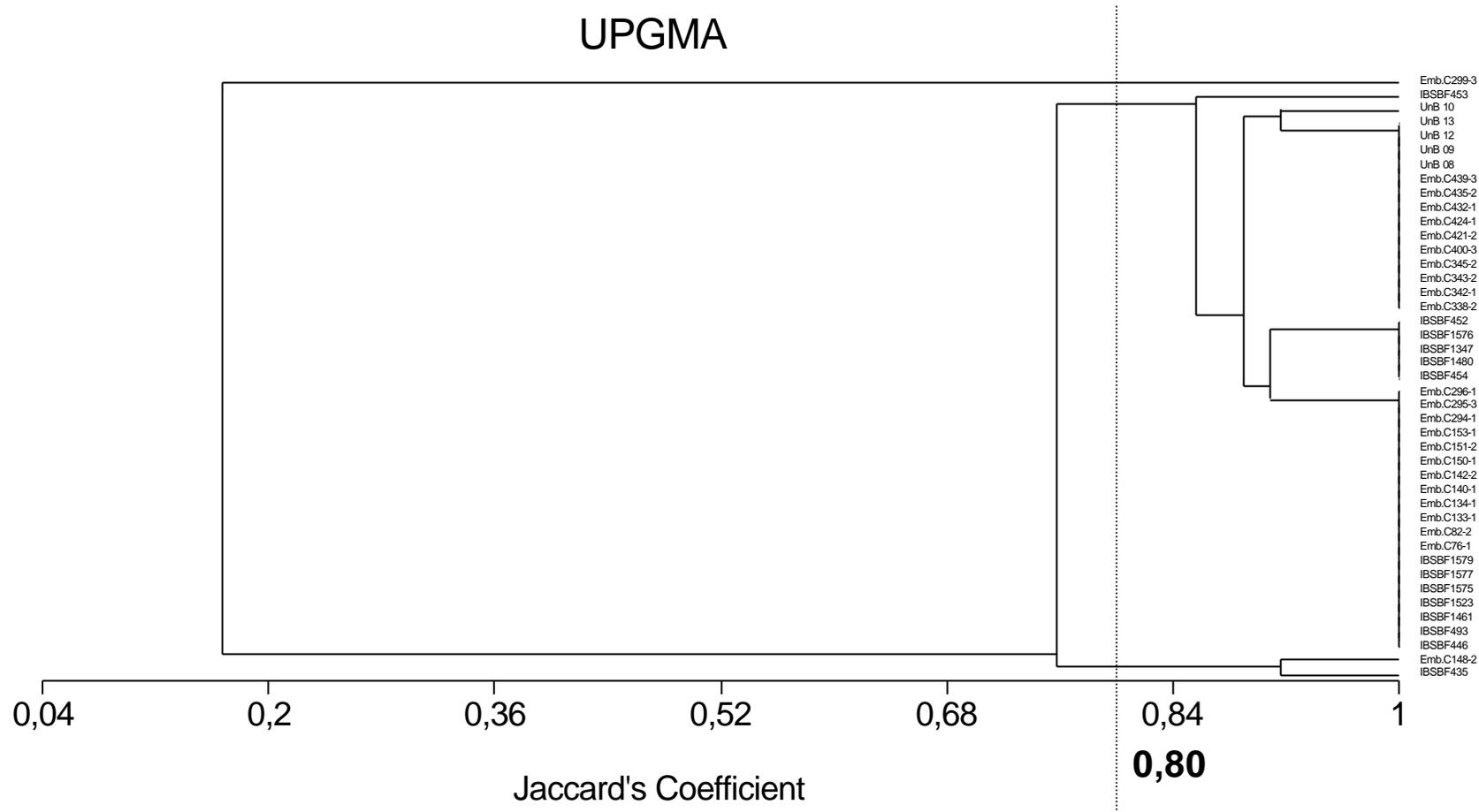


Figura 5. Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis gerados por BOX-PCR, mostrando as relações entre os isolados identificados como *Erwinia psidii*, obtidos nas regiões de Brazlândia-DF e nos estados de São Paulo, Paraná e Espírito Santo.

Foram identificados três grupos ao nível de similaridade de 80%, o grupo 1 é formado pelo isolado Emb.C299-3, o grupo 2 e 3 apresentaram percentual de similaridade de 86%, sendo o grupo 2 formado pela maioria dos isolados, e o grupo 3 formado pelos isolados Emb.C148-2 e pelo isolado tipo (IBSBF 435), com um coeficiente de similaridade de 92% entre eles (Figura 5).

Através da análise BOX-PCR verificou-se que a maioria dos isolados (93%) agruparam-se com um nível de 90% de similaridade. Esses isolados (grupo 2) encontram-se subdivididos em dois subgrupos. O primeiro apresenta os isolados obtidos da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas da UnB e o isolado UnB1287 agrupados distintamente, e isolados bacterianos coletados em Brazlândia-DF em 2002 agrupados entre si. O segundo subgrupo apresenta dois agrupamentos ao nível de 94% de similaridade, o primeiro agrupamento é formado por isolados com 100% de similaridade, fazendo parte deste grupo, isolados de SP, ES e isolados de Brazlândia-DF coletados em 1997 e 2001. O segundo agrupamento, também formado por isolados com perfis genômicos idênticos, apresenta isolados obtidos na região de Brazlândia-DF coletados em diferentes propriedades no período de 2000 a 2002, e isolados de outros estados como Paraná e São Paulo.

REP- PCR

A amplificação com os *primers* REP1R-I e REP2-I permitiu a geração de 24 bandas distintas variando de 280 a 2100 pb. Assim como para os outros *primers* utilizados neste estudo, a análise dos perfis eletroforéticos gerou um alto coeficiente de similaridade entre os isolados analisados, em torno de 72%,

com exceção do isolado Emb.C299-3 que apresentou um coeficiente de similaridade de 9% em relação a todos os outros isolados.

A análise com os *primers* REP revelou a presença de dez perfis genômicos distintos entre os isolados. Comparando-se os isolados que apresentaram alto grau de similaridade, portanto baixo polimorfismo, foram identificadas oito bandas polimórficas (2100pb, 2072pb, 1958pb, 850pb, 700pb, 580pb, 480pb, 350pb) das 24 bandas analisadas (Figura 6). Já o isolado Emb.C299-3 apresentou onze bandas polimórficas em relação aos demais isolados.

Ao nível de similaridade de 84% são formados três grupos, o grupo 1 é formado pelo isolado Emb.C299-3, o grupo 2 pelo isolado Emb.C343-2 que comparado ao grupo 3, formado pelos demais isolados, apresentou percentual de 72% de similaridade em relação a esses isolados (Figura7).

O terceiro grupo é formado por 95% dos isolados, e é dividido em dois subgrupos ao nível de 90% similaridade. O primeiro subgrupo é formado por dois isolados obtidos da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas da UnB (UnB 1288 e 1289) e apresentam 95% de similaridade. Dentro do subgrupo 2 mostrou o mesmo perfil genômico do isolado tipo (IBSBF435), isolados da região de Brazlândia-DF obtidos no período de 2000 a 2002, e 2004, além de isolados obtidos em São Paulo, Paraná e Espírito Santo. Dentro desse grupo também mostraram perfis idênticos outros isolados de Brazlândia-DF coletados em 2001 e 2002. Pertencem a esse grupo ainda, isolados de Brazlândia-DF coletados em 1997, 2002, 2004 e 2005, além de isolado coletado no Estado de São Paulo.

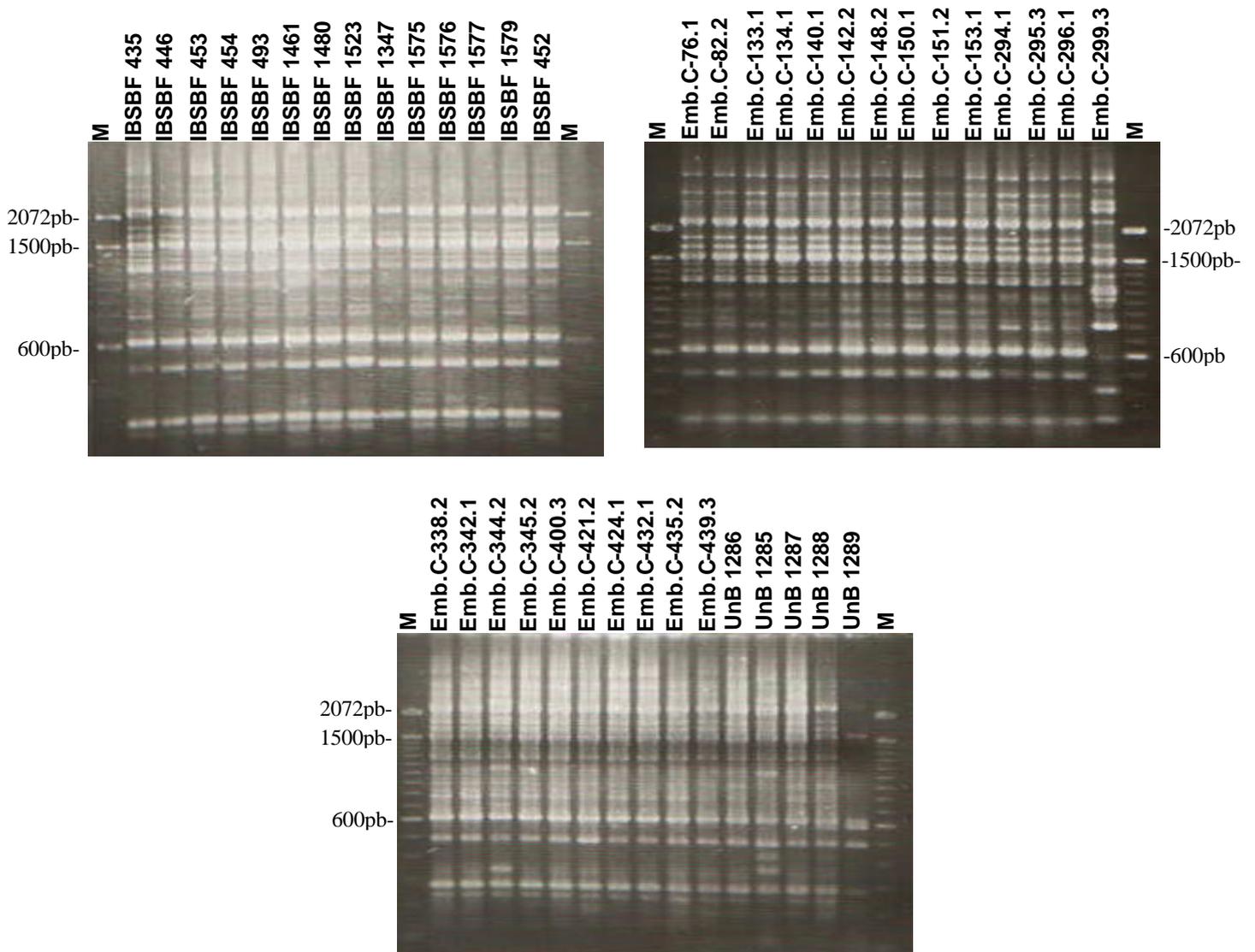


Figura 6. Análise eletroforética dos fragmentos gerados através de **REP-PCR**, a partir de DNA purificado, dos isolados utilizados neste estudo. Marcador (M) 100 pb DNA Ladder (Gibco BRL), IBSBF 435 (Isolado Tipo).

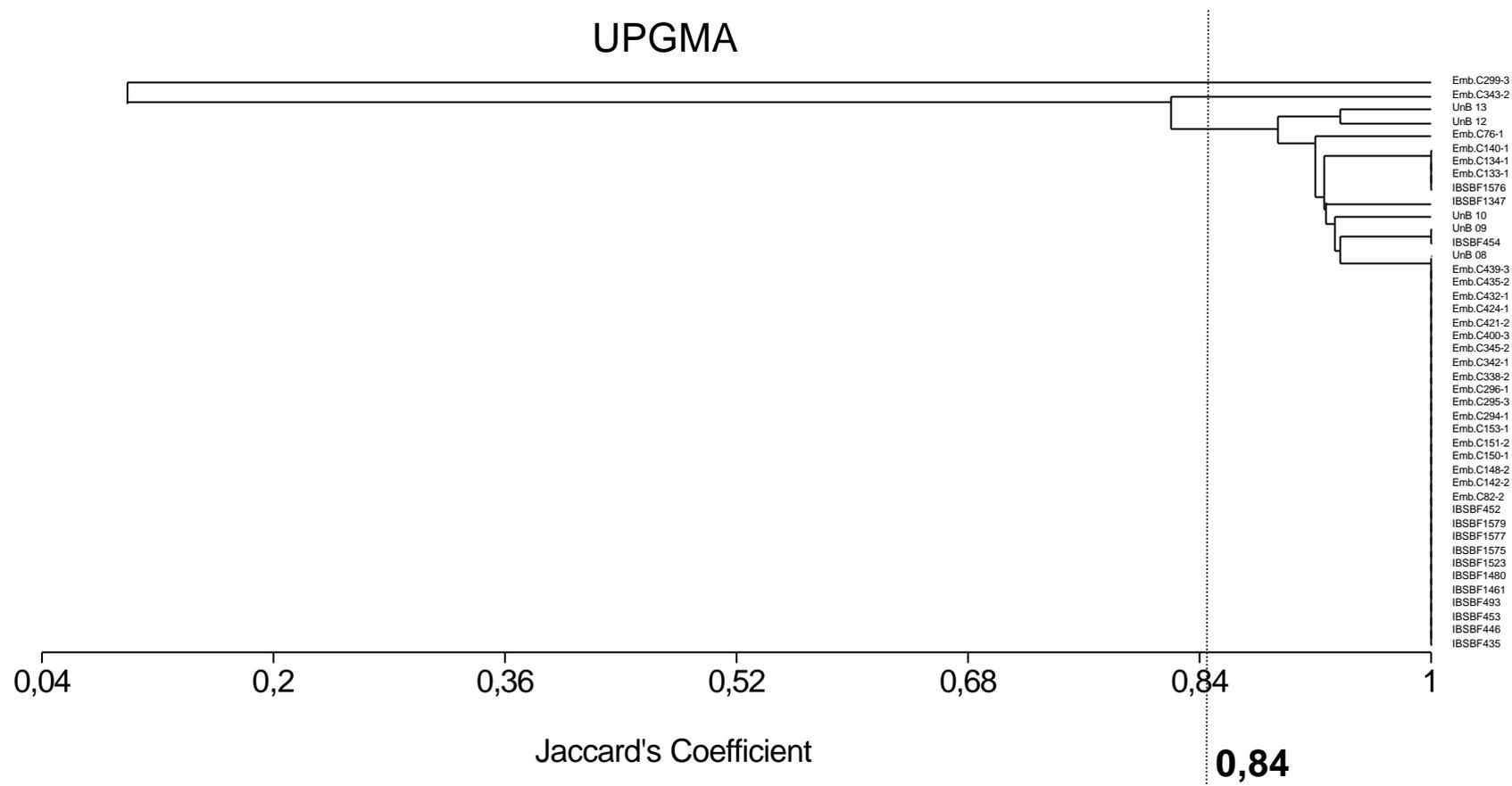


Figura 7. Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis gerados por REP-PCR, mostrando as relações entre os isolados identificados como *Erwinia psidii*, obtidos nas regiões de Brazlândia-DF e nos estados de São Paulo, Paraná e Espírito Santo. **FIGURA 7.** Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis gerados por REP-PCR, mostrando as relações entre os isolados identificados como *Erwinia psidii*, obtidos nas regiões de Brazlândia-DF e nos estados de São Paulo, Paraná e Espírito Santo.

ERIC-PCR

A amplificação com os *primers* ERIC1R e ERIC2 permitiu a geração de 20 bandas distintas variando de 480 a 2787 pb. A análise dos perfis eletroforéticos revelou um baixo polimorfismo, com isolados agrupados com valores de similaridade superiores a 80%, com exceção do isolado Emb.C299-3 que apresentou um coeficiente de similaridade de aproximadamente 4% em relação a todos os outros.

A análise com os *primers* ERIC revelou a presença de seis perfis genômicos distintos entre os isolados. Comparando-se os isolados que apresentaram baixo polimorfismo, foram identificadas quatro bandas polimórficas (1643pb, 1500pb, 780pb e 560pb) das 20 bandas analisadas. Já o isolado Emb.C299-3 apresentou 13 bandas polimórficas em relação aos demais isolados (Figura 8).

Ao nível de similaridade de 82% puderam ser diferenciados três grupos; o grupo 1 é formado pelo isolado Emb.C299-3, o grupo 2 pelo isolado UnB 1285 que comparado ao grupo 3, formado pelos maioria dos isolados, com similaridade de 80% em relação aos demais (Figura 9).

O grupo 3 é formado por 95% dos isolados, e encontra-se dividido em dois subgrupos ao nível de similaridade de 90%. O primeiro subgrupo é formado pelo isolado UnB10 obtido da coleção de Bactérias Fitopatogênicas da UnB, e o segundo subgrupo é formado pelos demais isolados.

O subgrupo 2 é ainda subdividido em dois agrupamentos ao nível de 92% de similaridade, no primeiro agrupamento apresentaram 100% de similaridade isolados de Brazlândia-DF coletados em 1997 e 2001, e isolados coletados no Estado de São Paulo. O segundo agrupamento pertencente ao

subgrupo 2, apresenta isolados com 100% de similaridade, é formado pelo isolado tipo (IBSBF 435), isolados coletados no DF em 2001, 2002, 2004 e 2005, nesses estão incluídos isolados obtidos da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas da UnB, além de isolados coletados em São Paulo, Espírito Santo e Paraná.

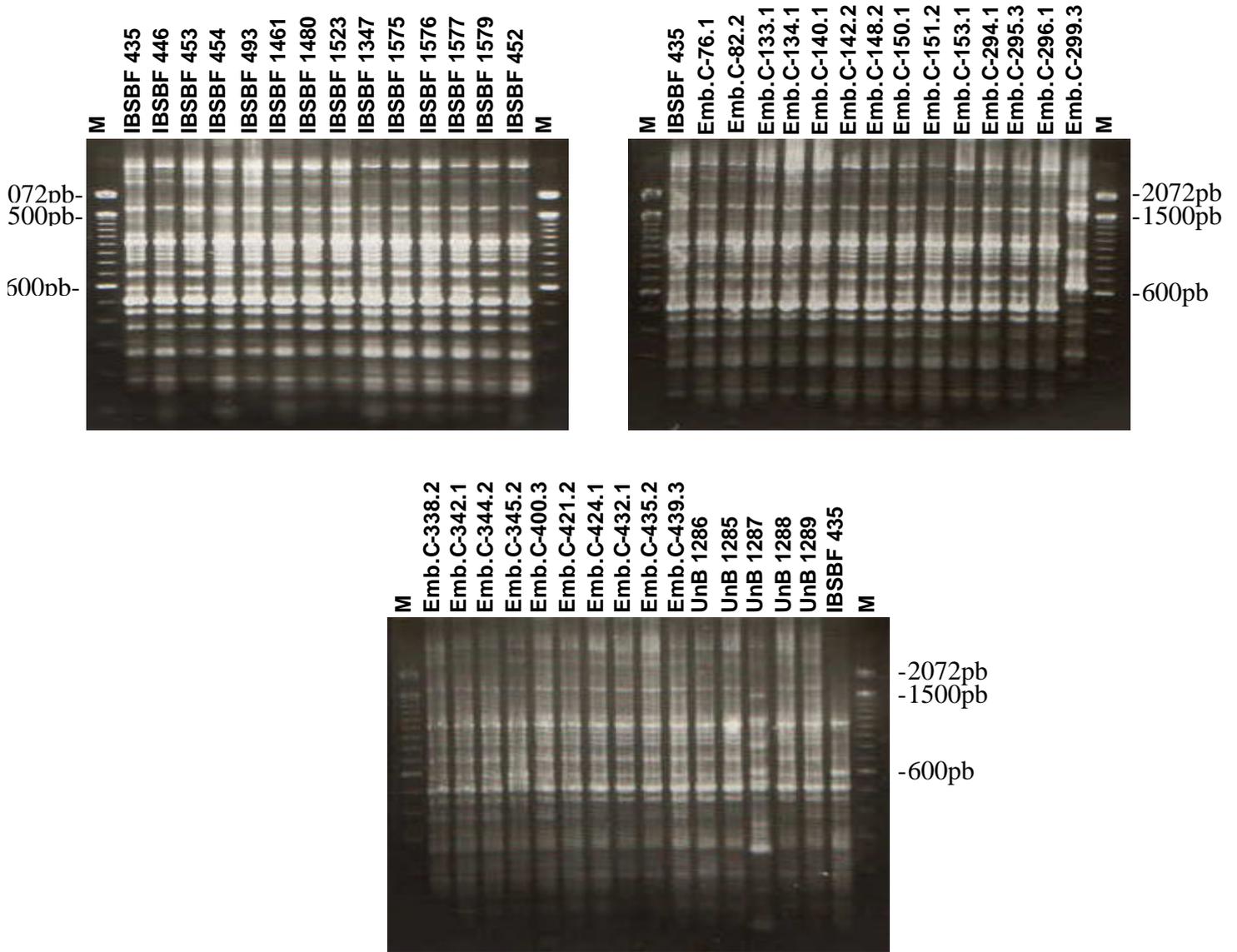


Figura 8. Análise eletroforética dos fragmentos gerados através de **ERIC-PCR**, a partir de DNA purificado, dos isolados utilizados neste estudo. Marcador (M) 100 pb DNA Ladder (Gibco BRL), IBSBF 435 (Isolado Tipo).

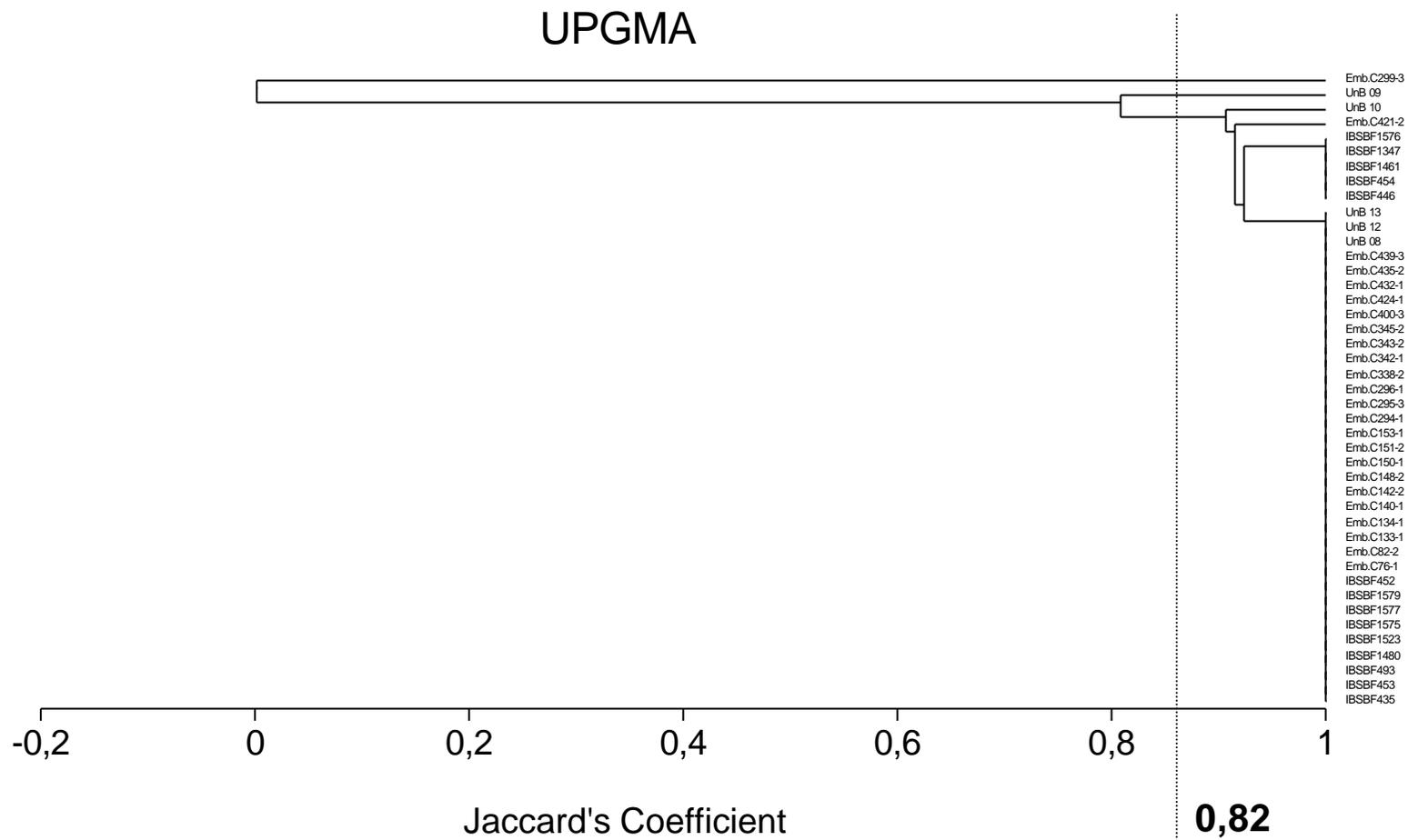


Figura 9. Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis gerados por ERIC-PCR, mostrando as relações entre os isolados identificados como *Erwinia psidii*, obtidos nas regiões de Brazlândia-DF e nos estados de São Paulo, Paraná e Espírito Santo.

rep-PCR (BOX, ERIC e REP)

Todos os isolados foram comparados através da análise conjunta dos dados gerados por BOX, ERIC e REP. Os dendrogramas referentes aos dados desses três *primers* isoladamente apresentaram resultados semelhantes ao dendrograma gerado pela análise combinada. Esta análise considerou um total de 67 bandas distintas variando de 280 a 2787 pb. Um baixo polimorfismo entre os isolados foi detectado com 87% de similaridade total entre eles, e novamente o isolado Emb.C299-3 apresentou um coeficiente de similaridade de apenas 5% em relação aos demais. Na população total analisada foram observados 17 perfis genômicos.

Ao nível de similaridade de 90% são formados quatro grupos, o grupo 1 é formado pelo isolado Emb.C299-3, o grupo 2 pelo isolado UnB 1285 com 88% de similaridade entre os grupos 3 e 4, o grupo 3 formado pelos isolados UnB1287 e Emb.C343-2 com um 91% de similaridade entre si e similaridade de 90 % com o grupo 4, o grupo 4 é formado pelos demais isolados (Figura 10) .

O quarto grupo é formado pela maioria dos isolados representando 90% de todos os isolados analisados nesse estudo, dentro deste grupo existem dois subgrupos com similaridade de 92%.

O primeiro subgrupo existente no grupo 4 é formado por isolados do Distrito Federal coletado em 1997 e 2001, e um isolado do Estado de São Paulo, agrupados a um nível de similaridade de 96%.

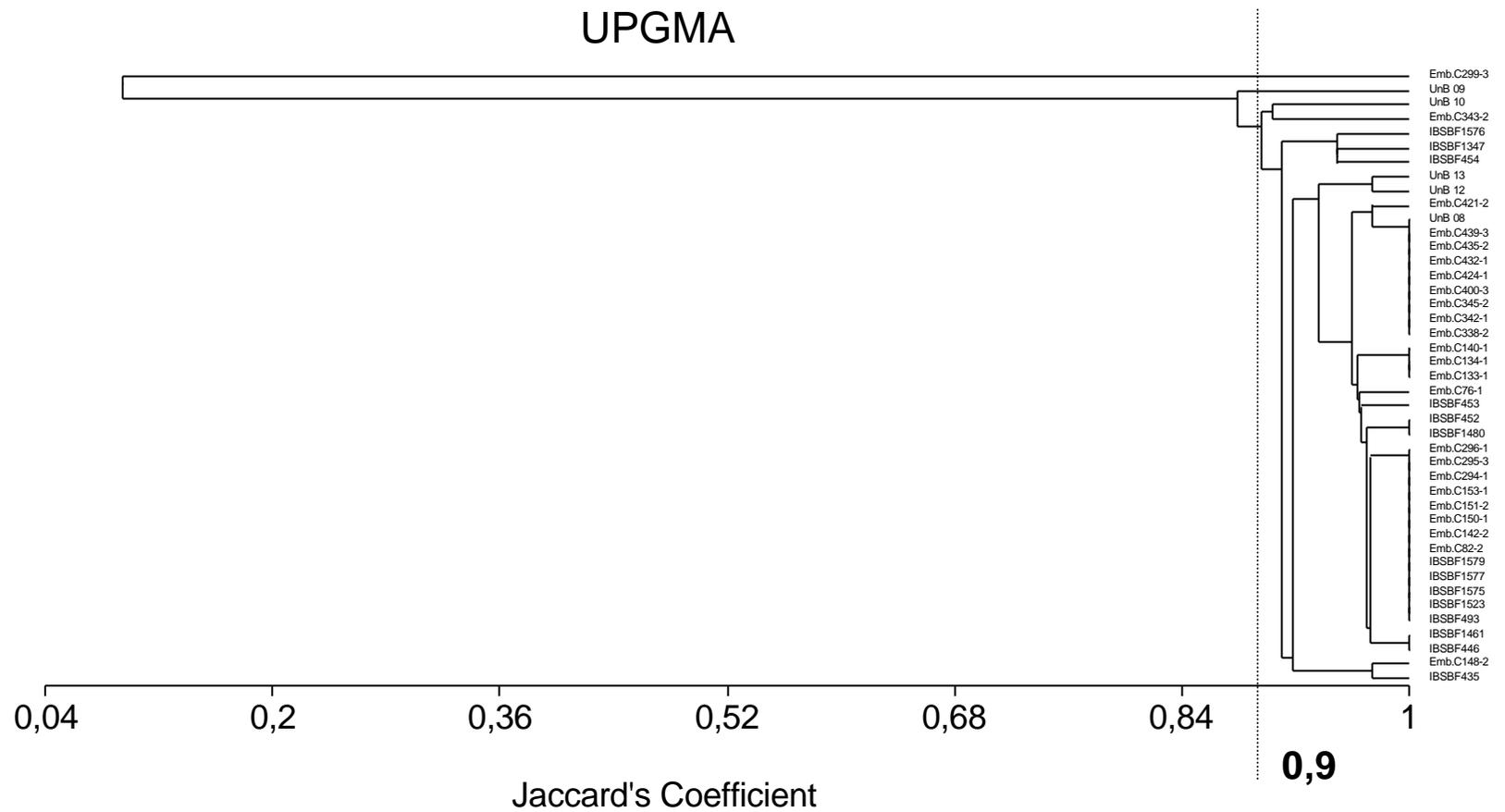


Figura 10. Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com os perfis gerados por rep-PCR (BOX, REP e ERIC), mostrando as relações entre os isolados identificados como *Erwinia psidii*, obtidos nas regiões de Brazlândia-DF e nos estados de São Paulo, Paraná e Espírito Santo.

O segundo subgrupo é dividido em dois, o primeiro formado pelo isolado tipo (IBSBF435) e por um isolado do Distrito Federal coletado em 2002 (Emb.C294-1) apresentando similaridade de 98%. O segundo agrupamento é formado por 79% dos isolados, com 94% de similaridade, dentro desse grupamento apresentam-se com 100% de similaridade, isolados coletados no Distrito Federal em 2002 e 2004, e isolados coletados no Distrito Federal nos período de 2000 a 2002 com isolados dos Estados de São Paulo e Paraná. O isolado coletado no Espírito Santo apresentou-se geneticamente idêntico a isolado coletado no município de Valinhos-São Paulo (IBSBF 452), e com similaridade de 98% com isolados coletados no Distrito Federal no período de 2000 a 2002.

4. DISCUSSÃO

Os testes bioquímicos realizados para a caracterização de 30 isolados bacterianos originários da região de Brazlândia-DF confirmaram a identidade de 28 isolados como *E. psidii*. A maioria dos resultados dos testes bioquímicos e nutricionais foi condizente com os resultados obtidos por Rodrigues Neto *et al.* (1987) para *E. psidii*. Desta forma, isolados bacterianos foram identificados como *E. psidii*, por apresentarem colônias esbranquiçadas e caracteres fenotípicos idênticos ao descrito para o patógeno como: bactéria Gram negativa, metabolismo fermentativo (teste OF), presença da enzima catalase, produção de ácidos a partir de manitol mas não a partir de rafinose, não redução de nitrato a nitrito e não apresentam reação de hipersensibilidade a fumo.

Todos os testes foram repetidos ao menos uma vez, mas para os isolados que apresentaram resultados divergentes dos obtidos para *E. psidii* (Rodrigues Neto *et al.*, 1987), os testes bioquímicos e nutricionais foram repetidos duas vezes em dias diferentes para a confirmação dos resultados.

O teste de Gram baseia-se na estrutura da parede celular das bactérias (Goto, 1990 e Romeiro, 2005), é um teste de grande importância para as bactérias fitopatogênicas não fastidiosas, já que a maioria das bactérias de importância fitopatológica são Gram-negativas, com exceção das espécies do grupo Corineforme que são Gram-positivas (Romeiro, 2005). Assim o teste de Gram permite distinguir *Erwinia psidii* de bactérias pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* (Goto,1992).

O teste OF (Oxidação e fermentação de carboidratos) permite distinguir bactérias do gênero *Erwinia* (anaeróbicas facultativas) das bactérias aeróbicas estritas, como *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (Bradbury, 1986). O teste de catalase distingue bactérias do gênero *Erwinia* de bactérias do gênero *Pseudomonas* (Romeiro, 2005). Estes testes permitem diferenciar *Erwinia psidii* de outras bactérias também patogênicas à goiabeira como é o caso da bactéria pertencente ao gênero *Pseudomonas* identificada por Tokeshi *et al* (1980). O teste OF (metabolismo oxidativo/fermentativo) permite também distinguir *E. psidii* de *Ralstonia solanacearum*, bactéria que tem como hospedeiro *Eucalyptus grandis* pertencente à mesma família da goiabeira (Romeiro, 2005).

O teste de produção de ácido a partir de carboidratos, como manitol, permite distinguir *E. psidii* de outras *Erwinias* do grupo amylovora, como por exemplo *E. rubrifaciens*, agente causal da necrose do floema da noqueira da Pérsia (*Juglans regia*), doença relatada nos Estados Unidos. *E. rubrifaciens* não produz ácidos a partir de manitol. O teste de rafinose diferencia o agente causal da seca dos ponteiros de outras espécies como *E. nigrifluens*, *E. mallotivora* (agente causal da mancha foliar em *Mallotis japonicus*, encontrado no Japão, e *E. quercina*. As três espécies citadas apresentam resultado positivo para este teste, diferentemente de *E. psidii*.

Outro teste importante é o de redução de nitrato a nitrito, que permite diferenciar *E. psidii* das espécies redutoras de nitrato, como é o caso de *E. quercina*, bactéria que provoca exsudação em frutos de carvalho nos Estados Unidos. O teste de reação de hipersensibilidade é uma ferramenta de diagnose valiosa, pois permite diferenciar *E. psidii* que apresenta reação de hipersensibilidade negativa de outras bactérias do gênero *Erwinia*, como é o

caso de *E. amylovora* e *E. salicis*, que apresentam reação de hipersensibilidade em folha de tabaco.

Embora todos os isolados selecionados para a realização dos testes bioquímicos apresentassem colônias características de *E. psidii* (Rodrigues Neto *et al.*, 1987), alguns apresentaram resultados divergentes quanto aos descritos para este patógeno, como é o caso dos isolados UnB 1290 e 1289, que tratam-se provavelmente de um agente contaminante resultante das múltiplas repicagens do patógeno ou de uma bactéria da flora bacteriana da goiabeira.

Alguns isolados que apresentaram resultados condizentes aos descritos para *E. psidii*, após múltiplas repicagens, apresentavam colônias brancas mas com aspecto diferente da cultura original, apresentando-se com uma textura mais fluida. Repicando-se estas colônias novamente elas voltavam a apresentar o aspecto característico de *E. psidii*, e a realização de testes bioquímicos confirmaram tratar-se realmente do patógeno.

Os isolados coletados no período de 2004 a 2005 (Isolados UnB), foram submetidos à extração de DNA antes da realização de todos os testes bioquímicos. Com estes isolados foi realizado apenas o teste OF anteriormente à extração do material genético. Desta forma, todos os isolados coletados na região de Brazlândia – DF foram utilizados para a caracterização molecular, com exceção do isolado UnB 1290 que mesmo tendo aspecto semelhante à *E. psidii*, apresentou metabolismo oxidativo, pelo teste OF.

Dentre os 30 isolados analisados, todos os 28 isolados identificados como *E. psidii* pelas características bioquímicas e nutricionais, mostraram-se patogênicos em hastes destacadas de goiabeira, confirmando com os testes

realizados anteriormente. Os sintomas nas hastes inoculadas apareceram do 1º ao 12º dia da inoculação, dependendo do isolado. Assim, ficou evidente uma variabilidade na agressividade entre os isolados, que permitiu que fossem classificados em três grupos: alta, media e fracamente agressivos.

O isolado Emb. C432-1 produziu sintomas 24 h após a inoculação da haste destacada, demonstrando ser, entre todos os isolados analisados, o mais agressivo. Isolados bacterianos obtidos na mesma propriedade, mostraram-se medianamente agressivos (Emb.C-424.1, Emb.C-435.2, Emb.C-439.3). Os isolados que levaram um tempo maior (9 a 12 dias) para induzir sintomas nas hastes destacadas foram os isolados Emb. C134-1 e Emb. C150-1. Esses isolados foram obtidos em propriedades diferentes, mas os isolados obtidos nas mesmas propriedades, induziram sintomas em média após 5 a 7 dias.

Os resultados obtidos com o teste de patogenicidade indicaram que o grau de agressividade dos isolados existentes em uma mesma propriedade, foi variável, sugerindo-se que em um mesmo pomar podem ser encontrados isolados genotipicamente diferentes.

O método de inoculação utilizando hastes destacadas descrito por Coelho *et al.* (2002b), mostrou-se bastante vantajoso para determinação da patogenicidade dos isolados, já que o teste convencional utilizando mudas para a inoculação demanda um período maior de tempo, e mudas distintas para testar cada isolado individualmente. Já as hastes destacadas, podem ser obtidas de uma única planta, desde que haja a presença de vários ponteiros para a realização do teste. Desta forma, o método utilizando hastes destacadas mostrou-se mais simples, econômico e rápido para a reprodução de sintomas em goiabeira.

Embora o teste de patogenicidade seja mais rápido e fácil para a detecção de sintomas, é provável que o resultado quanto aos níveis de agressividade pudesse ter sido diferente, caso o teste tivesse sido realizado com mudas, já que para os ramos destacados supõe-se que a planta perca sua capacidade de reação, tornando-se mais suscetível ao patógeno, se comparada a utilização de mudas.

A amplificação de seqüências repetitivas de DNA representa uma ferramenta importante em análises epidemiológicas. Seqüências repetitivas de DNA encontram-se presentes em múltiplas cópias espalhados no genoma dos microorganismos. As variações nas distâncias entre os elementos de DNA repetitivos são usadas para produzir perfis genômicos específicos, a amplificação das regiões entre as seqüências de DNA repetitivos (rep-PCR), gera fragmentos de vários tamanhos que representam a distância entre estes elementos repetitivos de DNA (Versalovic *et al*, 1993).

O conhecimento da diversidade genética entre isolados de determinada espécie de bactéria obtido por rep-PCR, possibilita o entendimento da sua estrutura populacional e sua dinâmica, além de fornecer marcadores que podem ser usados na sua detecção na hospedeira, na diagnose e no manejo das doenças (Louws *et al.*, 1994). Essa ferramenta é importante no diagnóstico de doenças e caracterização taxonômica de fitopatógenos, devido à sua habilidade em distinguir bactérias a nível de espécie, patovar ou estirpe (isolado)(De Bruijn, 1992, Judd *et al.*, 1993, Leung *et al.*, 1994, Louws *et al.*, 1994).

A utilização da técnica de rep-PCR com os *primers* BOX, ERIC e REP, para a caracterização dos isolados de *E. psidii*, mostrou-se bastante eficiente e

reproduzível, possibilitando a identificação de polimorfismo, embora limitado, na população do DF e de outros Estados. É uma técnica simples, rápida, sensível e altamente discriminatória, englobando características usualmente disponíveis quando se tem o uso de mais de uma metodologia (Woods *et al.*, 1992).

O *primer* REP, entre os três *primers* utilizados, foi o que detectou maior polimorfismo entre os isolados estudados, produzindo também o maior número de perfis genômicos distintos, oito. Comparando este *primer* aos *primers* BOX e ERIC, esses geraram um número de perfis genômicos muito inferior. Estudos realizados por Louws *et al.*(1995), mostraram que o *primer* ERIC também foi o menos indicado para discriminar isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, assim como também para bactérias entéricas gram negativas (Versalovic *et al.*, 1991). Os dendrogramas obtidos separadamente para BOX, ERIC e REP, foram bastante similares àquele obtido com a análise combinada dos três conjuntos de *primers*. Ficou evidente o baixo polimorfismo na população de *E. psidii* do DF.

A análise combinada dos três *primers* (rep-PCR) gerou um total de 19 perfis genômicos distintos, porém, com exceção do isolado Emb.C299-3, a similaridade entre os isolados analisados mostrou-se bastante alta. Para todos os *primers* utilizados, o isolado Emb.C299-3 mostrou-se sempre o mais divergente, com similaridade de apenas 16% para BOX-PCR, 4% para ERIC-PCR e 9% para REP-PCR. Já que a análise dos três *primers* distintamente e em conjunto detectou um baixo polimorfismo entre os isolados, com similaridade de 75% entre eles, com exceção do isolado Emb.C299-3, é provável que tenha ocorrido alguma contaminação durante o crescimento

desse isolado para a extração do DNA, já que as características da bactéria foram condizentes às descritas para *E. psidii*, e confirmadas pelos testes bioquímicos e nutricionais.

BOX-PCR agrupou com 100% de similaridade a maioria dos isolados do Distrito Federal coletados no ano de 2002 e no ano de 2001, com os isolados do Paraná, Itariri-SP, e o referente ao reisolamento do isolado tipo (IBSBF446). Agrupou também com 100% de similaridade alguns isolados da região de Brazlândia-DF coletados no ano de 2002 e os isolados coletados nesta região nos anos de 2004 e 2005. Com similaridade de 100% também foram agrupados isolados da região de Brazlândia coletados no ano de 1997 e 2002, assim como o isolado do Espírito Santo e um isolado da região de Valinhos-SP. BOX-PCR determinou uma similaridade de 76% do isolado tipo em relação aos demais, este apresentando uma similaridade de 82% com um isolado do Distrito Federal, maior do que com isolados provenientes da mesma região. Alguns isolados ficaram em grupos distintos, separados dos demais por uma similaridade mínima de 84%. Esses foram os isolados da região de Brazlândia-DF coletados no ano de 2001 (Emb. C.148-2), 2005 (UnB10) e o isolado da região de Valinhos-SP (IBSBF453).

O *primer* ERIC gerou um dendrograma que colocou em um mesmo grupo com similaridade de 100% a grande maioria dos isolados da região de Brazlândia-DF coletados nos períodos de 2001, 2002, 2004, 2005, e os isolados do Espírito Santo, Paraná, isolados da região de Valinhos-SP e Itariri-SP, além do isolado tipo. Isolados de Brazlândia-DF coletado no ano de 1997 e 2001, agruparam-se com similaridade de 100% com isolados de Urupês-SP, Valinhos-SP. Os únicos isolados que ficaram em grupos distintos separados

dos demais por uma similaridade mínima de 80% foram os isolados da região de Brazlândia-DF coletados no ano de 2001 (Emb. C.421-2), 2004 e 2005 (UnB09 e UnB10).

Apesar de REP-PCR ter produzido o maior número de perfis genômicos distintos, ainda assim, a alta similaridade entre os isolados também foi verificada. Esse *primer* agrupou com similaridade de 100% a maioria dos isolados coletados em Brazlândia-DF nos períodos de 2001 e 2002, o isolado UnB 1286 coletado nessa região no ano de 2004, além dos isolados coletados no Paraná, Espírito Santo, regiões de Itariri, Valinhos e Urupês no Estado de São Paulo. A maioria dos isolados coletados na região de Brazlândia-DF, nos períodos de 2004 e 2005, ficaram em grupos distintos, apresentando similaridade mínima de 90% em relação aos demais isolados. O isolado Emb.C343-2 coletado na região de Brazlândia-DF, no ano de 2001 foi o que apresentou perfil genômico mais distinto, apresentando similaridade de 72% com os demais isolados.

De uma maneira geral, a análise dos perfis genômicos obtidos com os três *primers*, gerou baixo polimorfismo entre os isolados de uma mesma propriedade coletados de diferentes árvores. A análise BOX gerou perfil genômico idêntico para todos os isolados de uma mesma propriedade, ERIC-PCR também gerou alta similaridade com exceção dos isolados UnB 1286 e 1285 coletados em diferentes árvores de uma mesma propriedade, que apresentaram similaridade de 80%. A análise REP-PCR foi a que gerou maior polimorfismo entre isolados de uma mesma propriedade, os isolados UnB 1286 e 1285 apresentaram similaridade de 94%, isolados Emb.C82-2 e Emb.C76-1 similaridade de 92% e isolados da propriedade Ivo Aparecido Guanais

agrupados com similaridade de 100%: Emb.C338-2, Emb.C0342-1 e Emb.C345-2 comparados ao isolado Emb.C343-2 apresentaram similaridade de 72%.

Os isolados UnB 1287, Emb.C134-1, Emb.C133-1, Emb.C140-1 e Emb.C142-2 coletados em diferentes épocas em uma mesma propriedade, apresentaram similaridade mínima de 90%, apresentando baixo polimorfismo com os três *primers* utilizados. Nenhum *primer* gerou similaridade de 100% entre os isolados coletados em diferentes épocas nessa mesma propriedade.

O isolado UnB1289 apresentou alta similaridade com os demais isolados. Isto pode ser explicado pelo fato de que os isolados de Brazlândia-DF coletados em 2004 e 2005 com aparência típica do patógeno, foram submetidos apenas à um teste O/F prévio, antes de serem submetidos à extração de DNA, entre esses isolados analisados apenas o isolado UnB 11 apresentou metabolismo oxidativo, enquanto os outros (UnB 1286, UnB 1285, UnB 1287, UnB1288 e UnB 1289) apresentaram metabolismo fermentativo condizente com *E. psidii*. Por este motivo, somente o isolado UnB 1290 foi eliminado da caracterização molecular. Como para esses isolados, os testes bioquímicos foram realizados posteriormente à caracterização molecular, os resultados da caracterização fenotípica, que caracterizaram o isolado UnB 1289 como não sendo a bactéria causadora da seca dos ponteiros e a caracterização molecular que confirma esse isolado com sendo *E. psidii*, corrobora a hipótese de que tenha ocorrido alguma contaminação durante a realização dos testes bioquímicos, nutricionais e de patogenicidade, devido às múltiplas repicagens.

Estudos anteriores realizados por McManus & Jones (1995) utilizando a técnica de rep-PCR para caracterização de isolados de *Erwinia amylovora* obtidos em diferentes regiões, detectou alta similaridade entre os isolados analisados. Assim como também a análise genética de isolados de *Erwinia psidii*, de acordo com rep-PCR, observou-se em geral que não houve diferenças significativas entre os isolados coletados em diferentes regiões e em diferentes épocas. Não foi observado nenhuma correlação entre os grupos e subgrupos de rep-PCR com época ou local de coleta. Com exceção do isolado Emb.C299-3, os demais isolados foram reunidos em um único grupo com mais de 75% de similaridade, o que indica alta homogeneidade entre os isolados do DF e entre esses e os isolados de outros Estados.

Através da análise dos três *primers* verificou-se que os isolados de Brazlândia-DF coletados em diferentes períodos e em diferentes propriedades foram bastante similares aos isolados coletados no Paraná, Espírito Santo e São Paulo. Essa alta similaridade genética entre esses isolados apóia fortemente a hipótese da bactéria ter sua origem no Estado de São Paulo, e ter sido disseminada para os outros estados e para o Distrito Federal, por meio de mudas contaminadas.

O uso de seqüências repetitivas para a caracterização molecular de isolados de *E. psidii* provenientes de diferentes regiões brasileiras, permitiu identificá-los pelos perfis genômicos característicos, e diferenciá-los de um possível contaminante. O uso da técnica de rep-PCR, apresenta-se como uma ferramenta de grande importância para estudos epidemiológicos, diagnósticos e para o monitoramento da bactéria em pomares contaminados.

A alta similaridade entre os isolados reflete também a baixa variabilidade da população original, e o baixo número de mutações entre os isolados mesmo após disseminação do patógeno por diversas regiões, além de demonstrar que essas regiões repetitivas podem se manter estáveis mesmo com o passar do tempo. Devido a estabilidade dessas regiões repetitivas existem grandes possibilidades quanto ao uso de ferramentas moleculares para a detecção do patógeno. Weingart e Volksch (1997) sugerem que a especialização para um determinado hospedeiro pode corresponder a homogeneidade genética e a distribuição de seqüências alvo-repetitivas no genoma. Estudos futuros como o desenho de um *primer* específico para *Erwinia psidii*, é altamente recomendado, pois ajudaria na detecção do patógeno e na diagnose da doença, isso seria possível devido principalmente à baixa variabilidade genética encontrada entre os isolados de diferentes regiões, verificado também pelo grande número de possíveis seqüências alvo.

CAPÍTULO 3

Detecção de *Erwinia psidii* em folhas de goiabeira inoculadas artificialmente através de enriquecimento e imunodifusão radial dupla

1 - INTRODUÇÃO

Um dos principais fatores que limitam a produção de goiaba no Brasil é a bacteriose causada por *Erwinia psidii*, conhecida por “seca dos ponteiros”. Esta doença foi relatada primeiramente no Estado de São Paulo (Rodrigues Neto *et al.*, 1987), e estudos posteriores sugeriram que essa doença foi introduzida em outros Estados possivelmente através de mudas contaminadas assintomáticas (Romeiro *et al.*, 1993, Romeiro *et al.*, 1994, Oliveira *et al.*, 2000, Uesugi *et al.* 2001, Romeiro *et al.*, 2002).

As medidas de controle recomendadas para essa doença não têm garantido a sua erradicação, restando unicamente como medida de controle eficaz a aquisição de mudas sadias, devidamente certificadas.

Atualmente as certificações das mudas se baseiam em análise subjetiva das plantas quanto ao aparecimento de sintomas, porém, levando-se em conta que mudas contaminadas enviveiradas aparentemente sadias apresentam sintomas da bacteriose em média após dois anos de sua instalação no pomar, a análise visual de mudas assintomáticas não garante a aquisição de mudas livres do patógeno causador da seca dos ponteiros.

Metodologias que empregam o enriquecimento bacteriano aliado à técnicas para detecção de patógeno em amostras contendo pouca concentração de inóculo tem sido propostas, Schaad *et al.* (1995),

desenvolveram a técnica de BIO-PCR, em que as amostras a serem analisadas foram previamente cultivadas em meio de cultura antes da extração do DNA das bactérias crescidas no meio, aumentando assim, as chances de detecção da bactéria em amostras com baixos níveis de inóculo. Estudos realizados por Cano & Estrella (1997), confirmaram a confiabilidade e o poder de detecção desse método, a partir da identificação do patógeno em uma semente contaminada misturada a um lote de aproximadamente 4.000 sementes sadias.

Trabalhos utilizando enriquecimento bacteriológico previamente a técnicas sorológicas e moleculares vêm sendo relatados no estudo de diversas fitobactérias como *Pseudomonas savastoni* pv. *savastoni* (Penyalver *et al.*, 2000), *Pseudomonas syringae* (Bultreys & Gheysen, 1999) e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Randhawa *et al.*, 2001), assim como também no estudo de bactérias que não causam danos à plantas (Ghosh *et al.*, 2004).

Os métodos sorológicos permitem a identificação rápida, simples e precisa da maioria dos microrganismos, e têm como princípio a união de macromoléculas (anticorpo) ao mesmo tipo de indutor de sua produção (antígeno) (Zerbini Jr. *et al.*, 2002). Diversas técnicas sorológicas vêm sendo usadas na detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas (Barzic & Trigalet, 1982, Wong, 1990, Lyons & Taylor, 1990, Benlioglu & Ozakman, 1993, Tsuchiya, 1995, Slack *et al.*, 1996), entre elas, destacam-se: ELISA, Imunofluorescência (IF) e a imunodifusão radial dupla (Ouchterlony, 1958).

O método de imunodifusão é realizado em gel de agar em uma lâmina microscópica ou em uma placa de Petri, onde pode ser observado uma linha de precipitação visível entre os orifícios, caso haja especificidade entre

antígeno e anticorpo (Tortora *et al.*, 2003). Este método vêm sendo utilizado para a detecção de fitobactérias, como é o caso de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Rodriguez & Marques, 2004) e *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burk) Downson (Coléno *et al.* 1970). O método de imunodifusão dupla em agar é um método simples, rápido, sensível e de fácil detecção, mas que necessita de uma concentração elevada da bactéria alvo e de uma quantidade elevada de antissoro, se comparada a outras técnicas (Saettler *et al.*, 1989, Zerbini Jr. *et al.*, 2002).

Apesar da simplicidade e rapidez, imunoenaios apresentam algumas desvantagens como: (a) geralmente não distinguem entre células viáveis e não viáveis, está limitado ao relato da presença ou ausência do patógeno nas amostras de planta em estudo, mas não se há o perigo de disseminação por conta da presença de células vivas do patógeno; (b) necessitam de enriquecimento bacteriano devido a baixa sensibilidade quanto ao inóculo pouco concentrado e (c) amostras contendo alta concentração de contaminantes saprófitos, podem sofrer interferências devido à competição desses com o patógeno desejado (Saettler *et al.*, 1989).

Considerando a necessidade de se disponibilizar um método eficiente e simples para a detecção de *E. psidii*, esse trabalho teve como objetivo desenvolver um antissoro específico e um método de detecção através do enriquecimento em meio natural obtido pela maceração de folhas de goiabeira e da técnica de imunodifusão radial dupla. Um estudo preliminar para a detecção de *E. psidii* em mudas assintomáticas através de técnicas sorológicas foi realizado por Ribeiro *et al.* (2005).

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local e período da realização dos trabalhos

Os trabalhos foram realizados na Unidade de Bacteriologia do Laboratório de Quarentena Vegetal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, no período de julho de 2005 a janeiro de 2006.

2.2. Isolados

Para o trabalho de otimização de metodologia de detecção de *Erwinia psidii* em goiabeiras assintomáticas através do método de imunodifusão radial dupla foi utilizado o isolado tipo (IBSBF 435) gentilmente cedido pelo Instituto Biológico de São Paulo.

Já para o experimento de inoculação de suspensão bacteriana em plantas sem ferimento para verificar o aparecimento de sintomas, foi utilizado o isolado Emb. A18-7.

Trinta isolados obtidos de amostras de goiabeiras com sintomas da seca dos ponteiros coletados em três épocas (2002, 2004 e 2005) em Brazlândia, Distrito Federal (Tabela 2- Capítulo 2) foram submetidos ao teste sorológico de imunodifusão radial dupla, utilizando antissoro policlonal reactante com *E. psidii*.

2.3 - Produção de antissoro específico para *E. psidii*

2.3.1 - Suspensão bacteriana para inoculação em coelhos

Foi realizado o crescimento do isolado tipo (IBSBF 435) em meio 523 sólido. Após 48 h, 10 ml de tampão PBS 1X (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄) foi adicionado à cultura bacteriana e com o auxílio de uma alça de Drigalski procedeu-se o descolamento da massa bacteriana seguida da posterior remoção da suspensão para tubos de centrifuga (50 ml) previamente esterilizados. Tampão PBS 1X foi adicionado até a suspensão bacteriana atingir um volume final aproximado de 25 ml. A suspensão foi centrifugada a 8.000 rpm por um período de 18 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, e ao pellet foi adicionado tampão PBS 1X até completar 25 ml, e este volume foi então, centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foram adicionados 5 ml de tampão PBS 1x para se obter a solução estoque. Em um novo tubo de centrifuga (50 ml) previamente esterilizado foi adicionado 1 ml da suspensão estoque e 1 ml de tampão PBS 1X.

A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para 10⁸ ufc/ml com tampão PBS 1X pela medida de transmitância. O volume da suspensão bacteriana foi medido, e a essa foi adicionado formol 0,5%. Em seguida a suspensão foi distribuída em microtubos em alíquotas de 1 ml e então, mantidas em geladeira (4 °C).

2.3.2 - Produção do antissoro

O protocolo de produção de antissoro foi conduzido segundo Ausubel *et al.*, 1995. Para a produção do antissoro policlonal anti-*E. Psidii*, foi injetada em coelhos adultos da raça Nova Zelândia uma suspensão composta por 1 ml da suspensão bacteriana do isolado tipo (IBSBF 435) a 10^8 ufc/ml e 0,5 ml de adjuvante de Freund (15% de Mamide monoleate e 85% de óleo de parafina). Foram realizadas um total de quatro aplicações intramusculares na pata posterior do coelho, com o intervalo de sete dias entre uma aplicação e outra.

A primeira aplicação da suspensão bacteriana foi com o adjuvante completo, ou seja, além do adjuvante foi adicionado BCG (vacina contra tuberculose), com o intuito de estimular uma resposta mais rápida do sistema imunológico do coelho. As aplicações seguintes foram realizadas apenas com a suspensão bacteriana e o adjuvante incompleto.

Sete dias após a última injeção, foi realizado um pequeno sangramento por corte na orelha do coelho, para avaliação do título do antissoro.

2.3.3 - Titulação do antissoro

Para a titulação do antissoro, este foi diluído diversas vezes, nas proporções de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64, e então submetido ao método de imunodifusão radial dupla. Sobre uma lâmina coberta com uma camada de agarose 1% em tampão PBS 1X foram realizados furos radiais com o auxílio de uma roseta de ferro que possibilitou a obtenção de oito furos periféricos e um furo central. No furo central foi colocado aproximadamente 20 μ l da suspensão bacteriana do isolado tipo a 10^8 ufc/ml, ao redor, nos furos periféricos foram

colocados 20 µl de cada diluição do antissoro policlonal produzido (antissoro 15.1), até 1:64. As lâminas foram colocadas em câmara úmida por um período de 24 horas para se verificar a presença de bandas de precipitação formadas pela reação antígeno-antissoro.

2.3.4 - Aquisição e tratamento do soro

Após a titulação de uma alíquota do antissoro, e a obtenção de uma concentração satisfatória do antissoro policlonal produzido, o coelho foi submetido ao esgotamento, com o intuito de se obter a maior quantidade de soro possível, para a realização dos testes sorológicos.

Após a retirada do sangue do coelho por meio de um corte na veia marginal, o sangue foi então colocado em um becker de vidro e mantido por uma hora a temperatura ambiente, para permitir a sua coagulação. O sangue coagulado foi então descolado das paredes laterais do frasco de vidro e aquecido a 37 °C por um período de 30 minutos. Passado esse período o soro foi mantido sob refrigeração (4 °C) por 12 h.

No dia seguinte o soro, ou o sobrenadante foi aspirado, descartando-se o coágulo. O soro foi posteriormente submetido a uma centrifugação de 2.000 rpm por um período de 15 minutos, o sobrenadante foi colocado em um frasco estéril e a esse foi acrescido 0,025% de ázida sódica em pó (100%). Ao antissoro produzido foi acrescentado glicerol na proporção 1:1, e então estocado sob refrigeração (4 °C).

2.4 - Determinação da especificidade

O antissoro policlonal foi submetido à determinação de sua especificidade frente a isolados de *Erwinia psidii* cedidos pelo Instituto Biológico de São Paulo (IBSBF 435, IBSBF 446, IBSBF1480, IBSBF 1523), trinta isolados obtidos de diferentes propriedades na região de Brazlândia-DF e a isolados pertencentes a flora bacteriana da goiabeira.

Lâminas de vidro previamente esterilizadas foram recobertas por uma camada de agarose (5 ml) a 1% diluída em tampão PBS 1X e acrescida de pequena quantidade de ázida sódica em pó (100%) com o intuito de evitar o aparecimento de fungos e bactérias saprofíticas. Após o endurecimento da camada de gel, foram feitos furos com o auxílio de uma roseta de ferro, essa permitiu a obtenção de oito furos periféricos e um furo central. Em cada lâmina foram feitas duas rosetas de furos, em cada uma foi adicionado 20 µl do antissoro policlonal 15.1 no furo central, e em cada um dos furos periféricos foi adicionado 20 µl de cada isolado bacteriano a uma concentração de 10^8 ufc/ml, além do isolado tipo (IBSBF 435) a 10^8 ufc/ml e um furo com tampão PBS 1X.

As lâminas foram colocadas em câmara úmida à temperatura ambiente, e após 24-48 horas foram realizadas leituras para a verificação da formação de bandas de precipitação pela reação antígeno-antissoro.

2.5 - Limiares de detecção de *Erwinia psidii* em folhas de goiabeira pelo método de imunodifusão radial dupla

2.5.1 - Preparo do inóculo:

Para o preparo do inóculo foi utilizado cultura pura do isolado tipo (IBSBF 435) crescida em meio 523 sólido, durante 24 horas. Uma pequena quantidade da cultura pura foi adicionada a frascos erlenmeyers contendo 25 ml de meio 523 líquido, e mantida sob agitação a 140 rpm por 18 horas.

A cultura crescida em meio líquido foi recuperada e posteriormente resuspendida em tampão PBS 1X, da mesma maneira descrita para o preparo da suspensão para inoculação em coelhos (item 2.3.1), obtendo-se uma suspensão com concentração final de 10^8 ufc/ml.

A partir dessa suspensão foram realizadas diluições, até a obtenção de suspensões nas seguintes concentrações: 10^7 , 10^5 e 10^3 ufc/ml. Essas suspensões foram utilizadas tanto para a avaliação do crescimento da bactéria em folhas de goiabeira maceradas, quanto para a aspersão em folhas de goiabeira para a verificação de sintomas em folhas livres de lesões.

2.5.2 - Inoculação de *E.psidii* em extrato de folhas de goiabeira

Os experimentos foram conduzidos em condições naturais sob temperatura ambiente (29-31 °C para o período diurno e 26-27 °C para o período noturno). Para cada experimento foram realizados quatro repetições, em dias diferentes. Os experimentos foram conduzidos com diferentes concentrações de inóculo: 10^7 , 10^5 e 10^3 ufc/ml.

Folhas jovens de goiabeira foram obtidas de mudas sadias de cultivar Paluma, mantidas em casas de vegetação. Folhas com tamanhos semelhantes foram pesadas, e com pesos de aproximadamente 1 g, foram colocadas em sacos plásticos previamente esterilizados.

Cada saco foi identificado com o número da repetição, a concentração do inóculo e a data do experimento. Aos sacos plásticos contendo 1 g de folha foram adicionados 3,5 ml de suspensão bacteriana na sua concentração correspondente. Foi feita uma incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse período as folhas foram levemente maceradas (com o auxílio de um pistilo de cerâmica), com o intuito de permitir a fusão da suspensão bacteriana à seiva foliar.

Os sacos plásticos contendo o macerado de folhas foram mantidos a temperatura ambiente, e a cada intervalo de doze horas, uma alíquota (0,25ml) da suspensão bacteriana foi submetida a imunodifusão radial dupla e à plaqueamento em meio 523 sólido para contagem da população bacteriana.

2.5.3 - Plaqueamento ideal

A 0 hora foram realizadas cinco diluições (10^{-1} a 10^{-5}) das alíquotas (0,25 ml) a concentração de 10^7 ufc/ml, quatro diluições (10^{-1} a 10^{-4}) das alíquotas a concentração de 10^5 ufc/ml e três diluições (10^{-1} a 10^{-3}) das alíquotas a concentração de 10^3 ufc/ml. Foram plaqueadas apenas 100 μ l de cada uma das três últimas diluições de cada concentração. No período de 12, 24, 36, 48 e 60 horas após a inoculação foram realizadas sete diluições (10^{-1} a 10^{-7}) para alíquotas a 10^7 ufc/ml, seis diluições (10^{-1} a 10^{-6}) para alíquotas a 10^5 ufc/ml e 10^3 ufc/ml inicial, seguido do plaqueamento de 100 μ l de cada uma das

quatro últimas diluições, sendo o plaqueamento da última diluição sob a forma de gota.

2.5.4 - Detecção por Imunodifusão radial dupla

Para a detecção de *E. psidii* após o seu crescimento no macerado de folhas destacadas de goiabeira foi utilizado o método sorológico de imunodifusão radial dupla, com o antissoro específico produzido anteriormente (item 2.3).

Lâminas de vidro contendo agarose foram preparadas como descrito anteriormente (item 2.4). Em cada roseta foi adicionado 20 µl do antissoro policlonal 15.1 no furo central, e em cada um dos furos periféricos foi adicionado 20 µl de cada suspensão bacteriana submetidas a crescimento em caldo de folha de goiabeira.

Alíquotas de suspensão bacteriana inoculadas em diferentes concentrações foram submetidas a imunodifusão radial dupla, para se obter os limiares de detecção da suspensão bacteriana crescida no extrato de folhas de goiabeira maceradas.

2.6 - Monitoramento da evolução de sintomas em plantas inoculadas, na ausência de ferimentos

2.6.1 - Preparo do inóculo

O inóculo utilizado neste ensaio foi o mesmo obtido para o ensaio anterior, ou seja, foi obtida uma suspensão bacteriana a uma concentração de 10^8 ufc/ml. A partir dessa suspensão foram obtidos 500 ml de suspensões bacterianas a concentrações de: 10^7 , 10^5 e 10^3 ufc/ml, através de diluições com PBS 1x.

Mudas sadias de goiabeira enviveiradas da variedade Paluma foram podadas 20 dias antes dos experimentos para a obtenção de ponteiros jovens. Ao todo foram utilizadas 30 mudas, das quais, 15 não sofreram nenhuma forma de ferimento, enquanto outras 15 tiveram uma das folhas inoculadas retiradas, simulando ferimentos causados à planta, que serviriam de porta de entrada da bactéria.

Para a aplicação do inóculo foi utilizado apenas um ponteiro em cada planta, sendo cada muda devidamente identificada com a data do experimento, número da repetição e concentração do inóculo. Foram realizadas cinco repetições para cada concentração de suspensão. As mudas foram distribuídas de maneira aleatória em toda a casa de vegetação, não ficando separadas por repetição ou concentração da suspensão aplicada.

As suspensões bacterianas foram aplicadas sob a forma de aspersão na parte abaxial do 1º e 2º par de folhas em um ponteiro de cada muda, sendo as plantas posteriormente encobertas por um saco plástico borrifado com água destilada, por um período de uma hora. Após esse período, o saco plástico de 15 ponteiros (15 mudas) foi retirado para que uma das folhas do segundo par

fosse destacada, simulando assim uma porta de entrada por ferimento ou lesão. As plantas foram novamente recobertas, ficando todas as plantas mantidas sob saco plástico por 24 horas. Após esse período os sacos plásticos foram removidos, e as plantas foram então monitoradas durante dez dias para a verificação do aparecimento de sintomas.

3 - RESULTADOS

O antissoro específico para *E. psidii* foi produzido aproximadamente um mês após a primeira pré imunização das cobaias com suspensão bacteriana do isolado tipo (IBSBF 435) a 10^8 ufc/ml. A titulação de uma pequena alíquota do sangue da cobaia, após quatro semanas de injeções, permitiu identificar o antissoro policlonal produzido como de excelente qualidade, altamente sensível, já que foi possível a detecção do antígeno (suspensão do isolado tipo a 10^8 ufc/ml) pelo método de imunodifusão radial dupla mesmo após 16 diluições (1/16 de sua concentração original).

O antissoro policlonal anti-*E. psidii* identificado como antissoro 15.1 pela Unidade de bacteriologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foi submetido ao teste de especificidade através do método de imunodifusão e apresentou reação antígeno-antissoro positiva para todos os isolados de *E. psidii* testados, não apresentando reação cruzada com isolados pertencentes a flora bacteriana, mostrando-se dessa forma altamente específico para o agente etiológico da seca dos ponteiros. Entre os isolados de *E. psidii* procedentes da região de Brazlândia-DF, 93%, ou seja, 28 dos 30 isolados, apresentaram bandas de precipitação antígeno-antissoro após serem confrontadas com o antissoro 15.1. Apenas os isolados UnB 11 e 13 não reagiram com o antissoro específico para *E. psidii* (Figura 11).

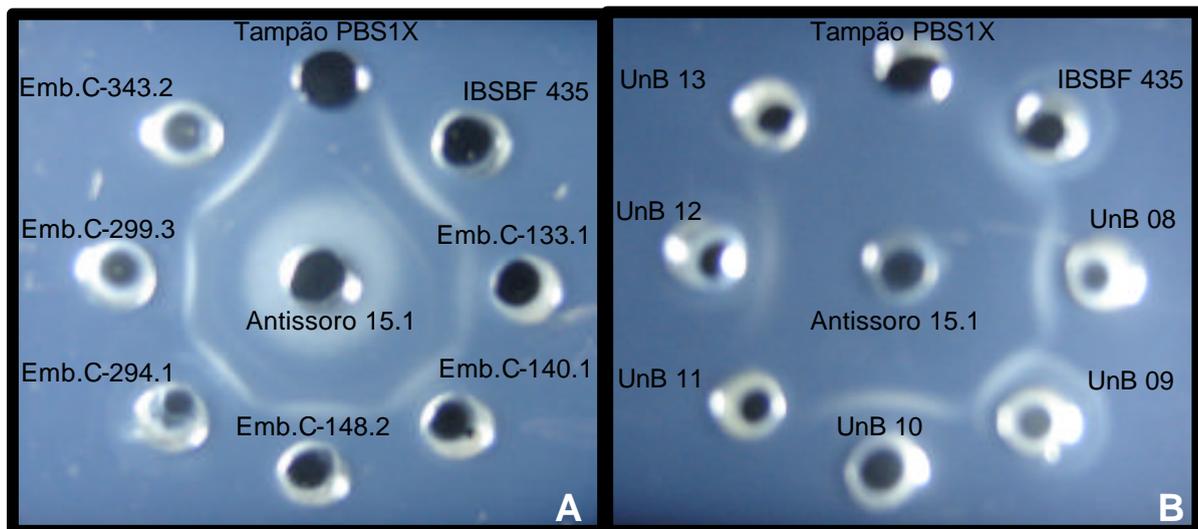


Figura 11. Lâminas de vidro recobertas com gel de agarose 1% em tampão PBS 1x para realização de teste de imunodifusão radial dupla. **A.** Isolados coletados na região de Brazlândia-DF (poços periféricos) no ano de 2001, em diferentes propriedades reagindo com antissoro anti-*E. psidii* (poço central); **B.** Isolados coletados na região de Brazlândia-DF (poços periféricos) no período de 2004 a 2005, em diferentes propriedades reagindo com antissoro anti-*E. psidii* (poço central).

Os experimentos de enriquecimento bacteriano em folhas de goiabeira maceradas foram conduzidos em ambiente natural sob temperaturas que variaram de 29 a 31°C durante o dia, e 26 a 27°C durante a noite. Alíquotas de suspensão bacteriana em crescimento foram analisadas pelo método de imunodifusão radial dupla, e plaqueadas para contagem da população bacteriana, a cada intervalo de 12 horas, até 60 horas.

A Tabela 5 apresenta as concentrações das populações bacterianas analisada a cada intervalo de 12 horas e o resultado da imunodifusão radial dupla nesse mesmo intervalo de tempo. A Figura 12 apresenta a curva de crescimento bacteriano em 60 horas, e as Figuras 13, 14 e 15 apresentam o resultado do teste de imunodifusão a cada intervalo de tempo analisado e o crescimento de cada população inoculada a concentrações diferentes separadamente.

O período correspondente à 0 hora, ou seja, imediatamente após a maceração das folhas da goiabeira, apresentou resultado condizente ao esperado, alíquotas das amostra inoculadas com suspensão 10^7 ufc/ml foram analisadas e após plaqueamento foi verificado que a concentração bacteriana ficou entre 10^6 ufc/ml para a repetição 1 e 10^7 ufc/ml para as demais repetições. O plaqueamento das suspensões a 10^5 ufc/ml apresentou contagem de bactérias entre 10^4 ufc/ml para as repetições 1, 2 e 4 e 10^5 ufc/ml para a repetição 3; as suspensões a 10^3 ufc/ml ficaram a 10^1 ufc/ml para a repetição 1, 10^2 para a repetição 2 e 4, e 10^3 ufc/ml para a repetição 3. Nenhuma das alíquotas analisadas no tempo 0 hora, apresentou reação sorológica positiva com o antissoro anti-*E. psidii*.

Tabela 5. Crescimento populacional de *Erwinia psidii* inoculada em diferentes concentrações, em folhas de goiabeira maceradas e limiars de detecção da bactéria por imunodifusão radial dupla.

Suspensão		0 hora		12 horas		24 horas		36 horas		48 horas		60 horas	
		Contagem	ID*	Contagem	ID								
10⁷	Rep 1	1,7x10 ⁶	-	2,8x10 ⁸	-	9,7x10 ⁷	-	1,4x10 ⁸	+	2,3x10 ⁸	+	1,1x10 ⁵	+
	Rep 2	3,7x10 ⁷	-	5,3x10 ⁸	+	7,0x10 ⁸	+	4,9x10 ⁸	+	1,2x10 ⁹	+	4,8x10 ⁸	+
	Rep 3	3,8x10 ⁷	-	1,3x10 ⁸	-	1,6x10 ⁸	+	3,9x10 ⁸	+	2,5x10 ⁷	+	6,3x10 ⁸	+
	Rep 4	5,7x10 ⁷	-	2,0x10 ⁸	-	1,3x10 ⁸	+	1,4x10 ⁸	+	1,3x10 ⁷	+	3,9x10 ⁸	+
10⁵	Rep 1	1,5x10 ⁴	-	1,0x10 ⁷	-	1,0x10 ⁷	+	2,1x10 ⁷	+	4,1x10 ⁷	-	9,0x10 ⁵	-
	Rep 2	1,7x10 ⁴	-	3,0x10 ⁵	-	3,9x10 ⁷	-	5,3x10 ⁸	+	4,9x10 ⁸	+	3,5x10 ⁸	+
	Rep 3	1,6x10 ⁵	-	1,9x10 ⁶	-	3,9x10 ⁷	-	2,0x10 ⁸	+	2,1x10 ⁹	+	9,3x10 ⁸	+
	Rep 4	8,0x10 ⁴	-	4,2x10 ⁵	-	8,8x10 ⁶	-	3,5x10 ⁸	-	4,5x10 ⁶	+	9,0x10 ⁷	+
10³	Rep 1	5	-	1,5x10 ⁵	-	8,3x10 ⁶	-	1,3x10 ⁷	-	8,2x10 ⁷	-	6,1x10 ⁸	+
	Rep 2	4,5x10 ²	-	9x10 ⁴	-	5,6x10 ⁵	-	1,2x10 ⁹	-	1,6x10 ⁹	+	1,5x10 ⁹	+
	Rep 3	1,4x10 ³	-	5,5x10 ⁴	-	1,1x10 ⁶	-	1,2x10 ⁹	+	3,8x10 ⁷	+	7,3x10 ⁸	-
	Rep 4	2,2x10 ²	-	3,5x10 ⁴	-	5,3x10 ⁵	-	6,5x10 ⁶	+	7,0x10 ⁵	-	8,0x10 ⁶	+

* ID: Método Imunodifusão radia dupla, quando for positiva indica que a concentração do antígeno foi suficiente para reagir com o antissoro, conseqüentemente produzindo uma banda de precipitação referente a reação entre eles.

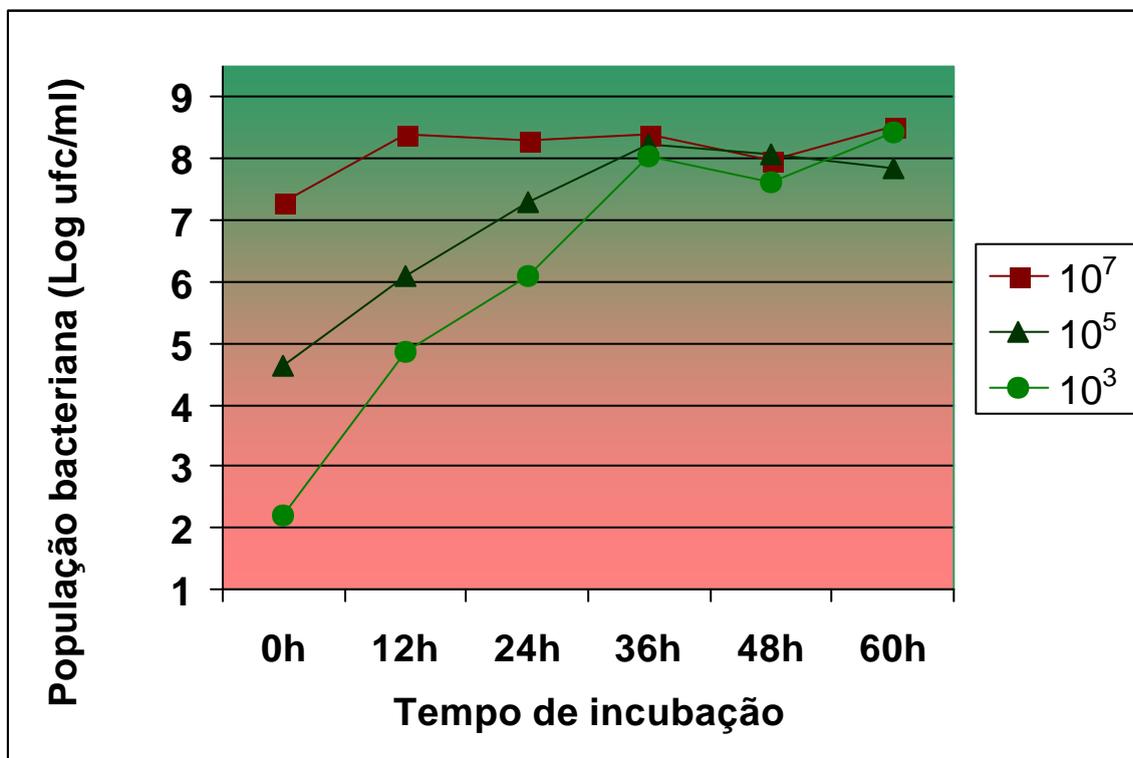


Figura 12. Evolução do crescimento populacional de *Erwinia psidii* em folhas de goiabeira maceradas, durante o intervalo de 60 horas, onde cada ponto representa a média de crescimento das quatro repetições analisadas para cada concentração inoculada inicialmente.

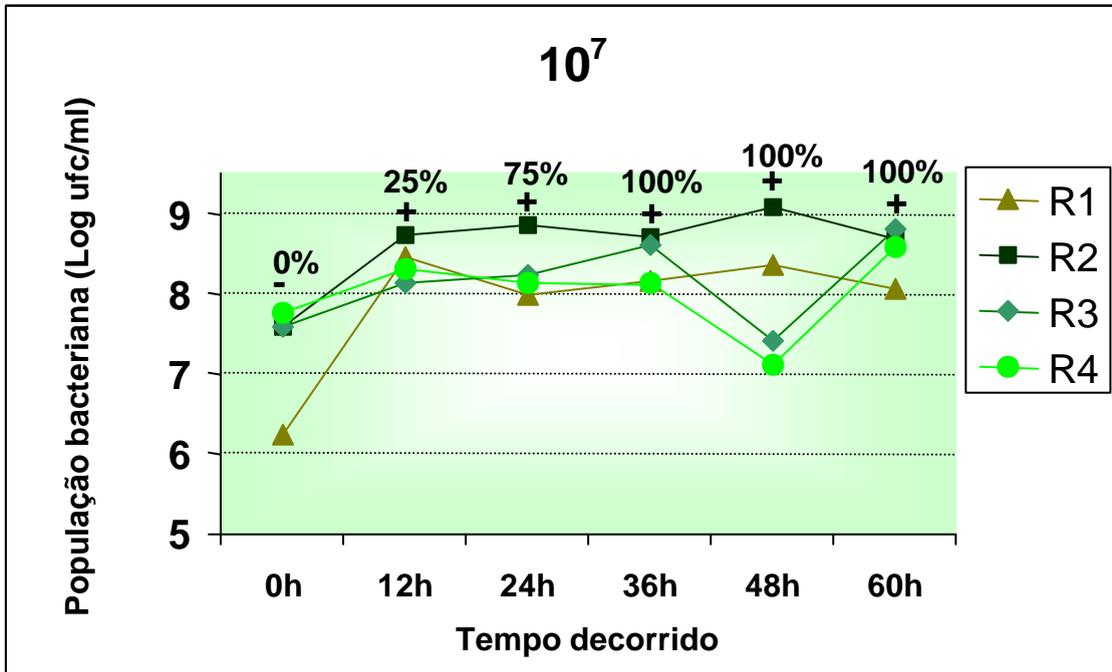


Figura 13 . Evolução do crescimento populacional de cada repetição de *Erwinia psidii* inoculadas a 10^7 ufc/ml em folhas de goiabeira maceradas e limiares de detecção da bactéria por imunodifusão.

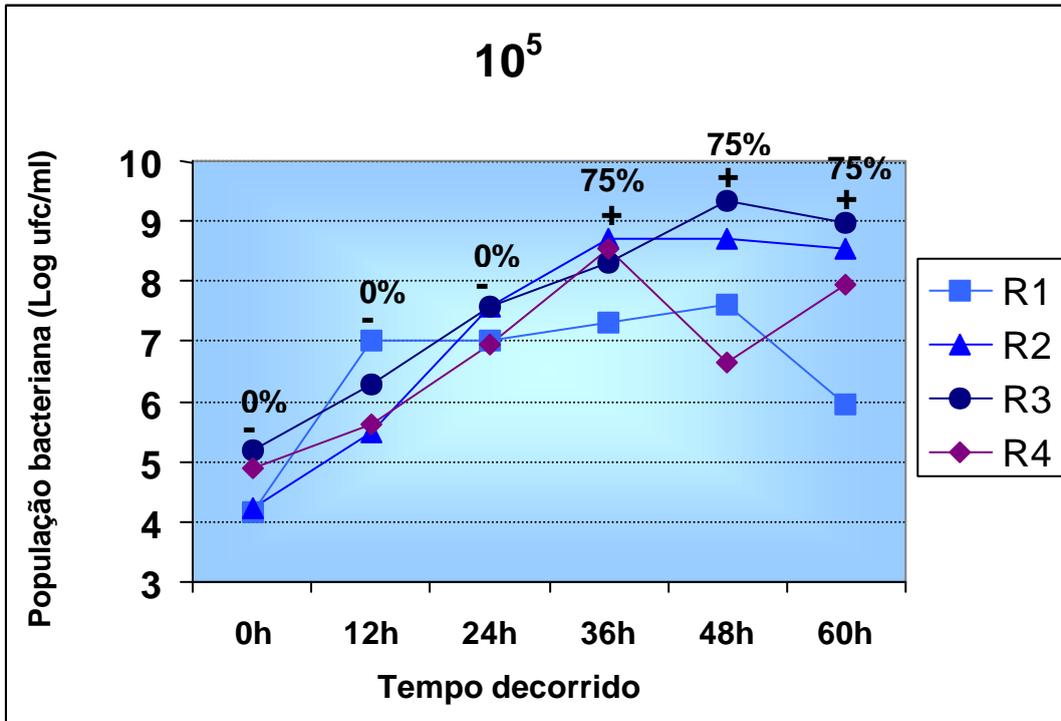


Figura 14 . Evolução do crescimento populacional de cada repetição de *Erwinia psidii* inoculadas a 10^5 ufc/ml em folhas de goiabeira maceradas e limiares de detecção da bactéria por imunodifusão.

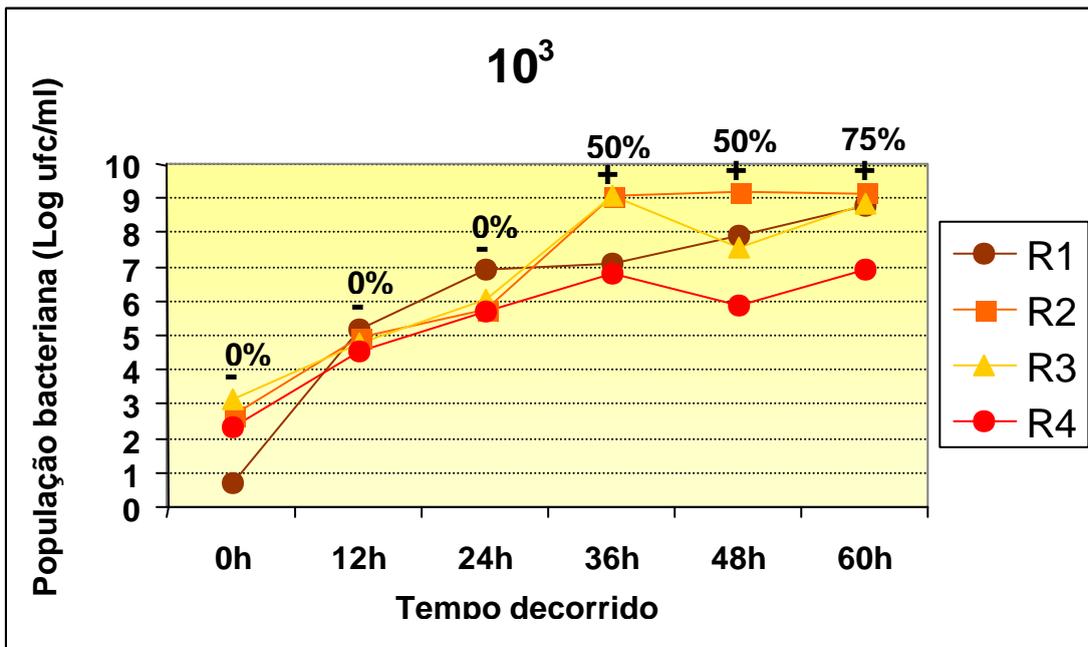


Figura 15 . Evolução do crescimento populacional de cada repetição de *Erwinia psidii* inoculadas a 10^3 ufc/ml em folhas de goiabeira maceradas e limiares de detecção da bactéria por imunodifusão.

No intervalo correspondente à 12 horas, foi observado um crescimento bacteriano de todas as amostras inoculadas a 10^7 ufc/ml, apresentando-se todas na concentração de 10^8 ufc/ml, 25% (1/4) dessas apresentaram resultado positivo para imunodifusão. As repetições inoculadas a 10^5 ufc/ml também apresentaram crescimento expressivo, a repetição 1 a uma concentração de 10^7 ufc/ml, as repetições 2 e 4 a 10^5 ufc/ml e a repetição 3, a 10^6 ufc/ml. Amostras inoculadas a 10^3 ufc/ml apresentaram um rápido crescimento em 12h. A repetição 1 passou de 10^3 ufc/ml para 10^5 ufc/ml, enquanto as demais apresentaram-se à concentração de 10^4 ufc/ml. Tanto para as suspensões inoculadas a 10^5 ufc/ml quanto a 10^3 ufc/ml, não foi possível verificar a formação de bandas relativas a fusão de antígeno-antissoro no teste sorológico, após 12h.

Após o intervalo de 24 horas a população inoculada a 10^7 ufc/ml manteve-se estável, com uma concentração a 10^8 ufc/ml, sendo possível nesse período a detecção de *E. psidii* em 75% das repetições por imunodifusão. A população inoculada a 10^5 ufc/ml continuou apresentando crescimento, com a repetição 4 apresentando-se a 10^6 ufc/ml e as demais a 10^7 ufc/ml, 25% das repetições apresentaram resultado positivo para imunodifusão. A população inoculada a 10^3 ufc/ml cresceu de 10^4 ufc/ml (12h) até $8,3 \times 10^6$ ufc/ml, máximo observado em uma das repetições, contudo, ainda não foi possível, nesta concentração, detectar a bactéria por imunodifusão.

Após 36 horas de inoculação, a população iniciada a 10^7 ufc/ml manteve seu crescimento estável com uma concentração de 10^8 ufc/ml, e apresentou reação sorológica positiva para 100% das amostras analisadas. A população inoculada a 10^5 ufc/ml apresentou uma concentração média de 10^8 ufc/ml, e

reação sorológica positiva para 75% das repetições. A população inoculada a 10^3 ufc/ml apresentou resultado variável de crescimento, apresentando concentrações de 10^6 até 10^9 ufc/ml; 50 % das repetições apresentaram reação sorológica positiva.

Após 48 horas a população inoculada a 10^7 ufc/ml, apresentou variação entre as repetições, caindo de 10^8 para 10^7 ufc/ml nas repetições 3 e 4, enquanto a repetição 2 variou de 10^8 para 10^9 ufc/ml; 100% das repetições continuaram apresentando reação positiva para o teste de imunodifusão radial dupla. A população inoculada a 10^5 ufc/ml apresentou concentrações variando de 10^6 a 10^9 ufc/ml, com 75% apresentando reação sorológica positiva, enquanto a população inoculada a 10^3 ufc/ml novamente oscilou em crescimento, variando de 10^5 a 10^9 ufc/ml, 50% dos isolados foram detectados pelo método de imunodifusão, nas concentrações de 10^7 e 10^9 ufc/ml (repetições 2 e 3).

Após 60 horas, em 100% das repetições inoculadas a 10^7 ufc/ml, o resultado foi positivo para a imunodifusão. As concentrações mantiveram-se estáveis, ficando em torno de 10^8 ufc/ml, com exceção da repetição 1 que apresentou queda no crescimento. A população inoculada a 10^5 ufc/ml foi detectada por imunodifusão em 75% dos casos, assim como também para a população inoculada a 10^3 ufc/ml.

Mudas de goiabeira aspergidas com suspensão bacteriana, apresentaram sintomas tanto em plantas com ferimentos quanto em plantas ilesas, das quais não foi retirado nenhuma folha do ponteiro (Tabelas 6 e 7). Os primeiros sintomas em média apareceram 48 após a inoculação do patógeno. Plantas que tiveram uma de suas folhas arrancadas, simulando ferimentos, apresentaram sintomas típicos da doença em 47% das plantas inoculadas, dessas 43% foram inoculadas com suspensão a 10^7 ufc/ml, 43% foram inoculadas com suspensão a 10^5 ufc/ml e 14% foram inoculadas com suspensão a 10^3 ufc/ml. Plantas que não sofreram nenhum tipo de ferimento apresentaram sintomas em 33% das mudas inoculadas, dessas 60% foram inoculadas com suspensão a 10^7 ufc/ml, 40% foram inoculadas com suspensão a 10^5 ufc/ml, já plantas inoculadas com suspensão a 10^3 ufc/ml não apresentaram nenhum sintoma típico durante os dez dias de observação. Os resultados indicaram que o patógeno é capaz de penetrar também por aberturas naturais, na ausência de ferimentos.

Tabela 6. Sintomas em brotos de goiabeira não sujeitas a ferimentos, inoculados com *Erwinia psidii* por aspersão.

Inóculo	17/09/2005	18/09/2005	19/09/2005	20/09/2005	21/09/2005	22/09/2005	23/09/2005	24/09/2005	25/09/2005	26/09/2005	27/09/2005
10 ⁷ Rep1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁷ Rep2	-	Necrose folha inoc. periferia foliar	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Pontuações periferia e final folha inoculada
10 ⁷ Rep3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁷ Rep4	-	-	Folha c/ pintas	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Necrose periferia e meio folha inoc.
10 ⁷ Rep5	-	-	-	Pontuação folha inoculada	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Necrose periferia e meio folha inoc
10 ⁵ Rep1	Folha curvada, c/ pintas pretas	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Folha cheia de pontos pretos, folha jovem ponto necrótico	Folha jovem ponto necrótico	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Necrose folha inoc. periferia e meio, folha jovem c/ pontuações.
10 ⁵ Rep2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁵ Rep3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁵ Rep4	-	-	Folha nova e inoculada, c/ pontos escuros	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Folha necrosada e enrolada, folha jovem necrosada.
10 ⁵ Rep5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³ Rep1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³ Rep2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³ Rep3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³ Rep4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³ Rep5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 7. Sintomas em brotos de goiabeira sujeitos a ferimentos, inoculados com *Erwinia psidii* por aspersão.

Inóculo	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11
10 ⁷ Rep1	-	Necrose folha inoculada (periferia)	Necrose 2 folhas inoculadas	Folha jovem c/ pontuações	Idem dia anterior	Folha enrolada, f. jovem c/ necrose					
10 ⁷ Rep2	-	Necrose folha inoculada (periferia)	Necrose folha inoc. (periferia e extremidade)	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Pontuações folha jovem e inoculada, exsudação
10 ⁷ Rep3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁷ Rep4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁷ Rep5	-	-	Necrose extremidade folha inoculada	Folha enrolada	Idem dia anterior	Pontuações folhas jovem e inoc.	Folhas jovem e inoc. c/pontuações e enroladas				
10 ⁵ Rep1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁵ Rep2	-	Peq. necrose periferia folha inoc.	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Folhas enroladas, c/ necrose
10 ⁵ Rep3	-	-	Ponto necrótico meio folha inoc.	Pontos necróticos folha inoculada	Idem dia anterior	Vários pontos necróticos folha jovem e inoc.					
10 ⁵ Rep4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁵ Rep5	-	-	Peq. Pontuação necrótica folha inoc.	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Necrose folha jovem e inoc., exsudação
10 ³ Rep1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³ Rep2	-	Necrose folha inoculada (periferia)	Folha com necrose (periferia), centro c/ pontos escuros	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Idem dia anterior	Folha inoc. necrosada e enrolada
10 ³ Rep3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³ Rep4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³ Rep5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4 - DISCUSSÃO

A sorologia é uma técnica que utiliza a interação antígeno-anticorpo para a detecção de microorganismos, e por isso, tem sido amplamente utilizada na diagnose de doenças (Zerbini Jr. *et al.*, 2002). Estudos realizados por Mendes *et al.* (2002) resultaram na produção de um anticorpo policlonal específico para o patógeno da seca dos ponteiros da goiabeira, podendo ser utilizado na detecção da bactéria através de várias técnicas sorológicas, entre elas, a imunodifusão radial dupla.

Um estudo preliminar utilizando enriquecimento de *E. psidii* aliado ao método sorológico de detecção foi realizado por Ribeiro *et al.* (2005). Esse trabalho mostrou que *E. psidii* se multiplicou em folhas de goiabeira maceradas após o 5º dia de inoculação, e após esse período, foi possível a detecção do patógeno através da técnica de imunodifusão. Nesse mesmo estudo, foi observado que o lavado de folhas inoculadas com suspensão bacteriana, não apresentou crescimento da bactéria, mesmo após cinco dias da obtenção do lavado, sugerindo que a seiva da goiabeira é um fator importante para o crescimento da bactéria.

Levando-se em conta esses resultados, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento bacteriano em extrato de folhas de goiabeira maceradas, inoculadas com suspensões a diferentes concentrações e, a partir desse enriquecimento, determinar os limiares de detecção do patógeno através do método de imunodifusão radial dupla.

De acordo com os resultados obtidos, suspensões bacterianas inoculadas a 10^7 , de maneira geral, mantiveram um crescimento bacteriano estável, com concentrações chegando a 10^8 após 12 horas de inoculação,

período qual já foi possível a detecção do antígeno em 25% das repetições. Pela análise das repetições inoculadas a 10^7 , o período ideal de detecção do patógeno por imunodifusão radial dupla se deu a partir de 36 h, em que 100% das repetições apresentaram bandas de precipitação relativas à reação antígeno-antissoro.

Em geral, os resultados mostraram que a concentração ideal da suspensão bacteriana reactante com o anticorpo anti-*E. psidii* encontrava-se a 10^8 , já que 75% das suspensões bacterianas detectadas pelo método de imunodifusão radial dupla estavam a essa concentração, embora muitas suspensões apresentando igual concentração não apresentou reação de imunodifusão positiva, indicando tratarem-se de falsos negativos. O caso contrário não acontece, falso positivo, já que através dos testes realizados o antissoro produzido se mostrou específico para *Erwinia psidii*, pois só seria possível a obtenção de falsos positivos se o antissoro não fosse específico para o patógeno. Apesar disso, a suspensão bacteriana referente à repetição 1 da amostra inoculada a 10^7 ufc/ml, estava a uma concentração de 10^5 ufc/ml, após 60h e reagiu com o antissoro policlonal, produzindo uma banda de precipitação relativa a reação antígeno-anticorpo.

Levando-se em conta que técnicas moleculares e sorológicas podem detectar tanto células viáveis quanto não viáveis (Saettler *et al.*, 1989, Theodoro & Maringoni, 2002) é possível que no caso da repetição 1, no período de 60 h, a população bacteriana tenha iniciado seu declínio, mas como no caldo foliar encontravam-se tanto células mortas como vivas, foi possível a detecção dessas células pelo antissoro policlonal.

Populações bacterianas inoculadas inicialmente com suspensões a 10^5 apresentaram crescimento maior após 24 horas de incubação, já que nesse período a concentração passou de 10^4 (0 h) para 10^7 . Somente após 24 h foi possível a detecção de 25% das suspensões bacterianas, mas de maneira geral, o período ideal para a detecção antígeno-antissoro se deu à 36h, período qual a concentração de 75% das repetições chegou a 10^8 , apresentando também igual porcentagem de detecção pelo método de imunodifusão radial dupla.

Diferentemente da repetição 1 da população bacteriana inoculada a 10^7 no período de 60 h, no mesmo tempo, a repetição 1 da população bacteriana inoculada a 10^5 não apresentou resultado positivo para o teste de imunodifusão, assim como também a população a 10^7 dessa mesma repetição no período de 48 h. Entretanto, no período de 36 h, a população se encontrava a 10^7 e reagiu com o antissoro. A maceração de tecidos é freqüentemente utilizada para a obtenção de células bacterianas a partir de tecidos de plantas (Taylor, 1970; Wharton, 1967), porém a maceração pode também aumentar a liberação de substâncias e materiais tóxicos que podem interferir no crescimento e na detecção do patógeno. É possível que, após o período de 48 h, houvesse no extrato de folhas, além de células vivas e células mortas, uma maior concentração de substâncias derivadas da degradação das folhas, como é o caso do quinino, substância encontrada em folhas de goiabeira e que poderia estar interferindo na reação antígeno-antissoro.

Analizando as suspensões inoculadas a 10^3 , observou-se que o crescimento bacteriano maior se deu a 36 h, período em que as populações saíram de uma concentração de $10 - 10^3$ (0 h) para uma concentração 10^6-10^9 ;

nesse período foi possível a detecção de *E. psidii* em 50% das repetições. Comparando as populações inoculadas a 10^3 às populações inoculadas a 10^5 e 10^7 , observou-se que o crescimento das primeiras (10^3) foi maior em um espaço de tempo menor, isso devido à uma menor competitividade entre as bactérias por espaço e alimento (fase logarítmica ou de crescimento exponencial) (Ferreira & Salgado, 1995).

A repetição 4 dessas populações apresentou reação de imunodifusão positiva, a partir de 36h, período em que a população atingiu a concentração 10^6 ufc/ml, também 10^5 (48 h) e novamente 10^6 (60 h). Foi observado que, em geral, a reação antígeno-antissoro ocorria a uma concentração de 10^8 ufc/ml, ou a uma concentração menor quando supostamente havia células viáveis e não viáveis. Sugere-se, portanto, que tenha ocorrido um crescimento abrupto entre o intervalo de 24 e 36h, até alcançar a concentração de 10^8 (não detectada por plaqueamento) e a posterior queda da população, sendo que a partir de 36h a detecção da população a 10^6 e 10^5 tenha sido de células viáveis e não viáveis.

De uma maneira geral, a detecção do patógeno pôde ser observada no intervalo de 36 a 60h de incubação, período em que a maioria das populações, não importando a concentração inicial do inóculo, foram reactantes com o antissoro policlonal produzido para *E. psidii*.

Os experimentos conduzidos em casa de vegetação para a verificação de aparecimento de sintomas em folhas de goiabeira inoculadas na ausência de ferimentos, concluíram que, além das lesões causadas por instrumentos de poda, grãos de areia levados pelo vento e outros instrumentos que causam injúrias nas folhas, servindo de porta de entrada da bactéria, esta pode também

penetrar através de aberturas naturais (como estômatos e hidatódios). Os experimentos foram conduzidos quando a temperatura do ambiente encontrava-se muito alta, em torno de 29-31°C durante o dia, condições propícias para entrada da bactéria, devido a abertura dos estômatos para a respiração celular. Sugere-se a complementação desses testes em épocas com temperaturas mais amenas ou frias, para a comprovação da entrada de *E. psidii* também através dessas aberturas naturais.

Segundo Saettler *et al.* (1989) as características para um método eficiente para a detecção de um patógeno são: reprodutibilidade, fácil execução para que pessoas não especializadas possam realizar os testes, acurácia e baixo custo.

Técnicas moleculares são bastante específicas e seguras, como demonstrado para várias fitobactérias, como por exemplo *Erwinia amylovora* (Bereswill *et al.*, 1992). O desenvolvimento de *primers* específicos para a detecção de *E. psidii* seria de grande valia, porém exigiria disponibilidade de equipamentos para PCR, recursos e mão de obra especializada. A utilização de uma metodologia mais simples, rápida, e que possa ser usada em condições de campo, ou em laboratório pouco equipados, seria mais vantajosa. Assim, o método de enriquecimento bacteriano em extrato de folhas de goiabeira aliado à técnicas sorológicas de detecção, como a imunodifusão radial dupla, uniria simplicidade, rapidez e sensibilidade ao baixo custo na obtenção de resultados, principalmente para o teste de grande número de amostras.

O método de enriquecimento bacteriano permite o aumento da população, mesmo que esta se encontre inicialmente a baixas concentrações

não detectáveis, como é o caso de mudas assintomáticas que possuem o patógeno e são comercializadas como livres da doença. A partir do enriquecimento bacteriano é possível a detecção do patógeno pelo método de imunodifusão, após um período de incubação em extrato de folhas de 36-60 hs. Assim, se mudas de goiabeiras assintomáticas forem portadoras da bactéria, esta certamente poderá ser detectada.

Os resultados obtidos no presente estudo poderão ser utilizados para o desenvolvimento de um *kit* de detecção de *E. psidii* em mudas, que poderá ser utilizado por técnicos da Defesa Vegetal para a certificação de viveiros. Isto contribuiria, certamente com a redução da disseminação da seca dos ponteiros para novos pomares no DF, além de impedir sua introdução em outros estados ou regiões produtores de goiaba no Brasil, como a região Nordeste que, até o momento, encontra-se livre da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. 10^a ed. São Paulo. FNP. 2005. pp.356-357.

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. 11^a ed. São Paulo. FNP. 2006. pp.329-332.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. Short protocols in molecular biology. 3rd ed. United States of America. John Wiley & Sons Inc. 1995.

BARZIC, M.R. & TRIGALET, A. Détection de *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson par la technique ELISA. Agronomie 2(4):389-398.1982.

BENLIOGLU, K. & OZAKMAN, M. Evaluation of two serological methods for identification of halo blight pathogen (*Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*) of beans. J. Turk. Phytopathology 22(2-3):75-84. 1993.

BERESWILL, S., PAHL, A., BELLEMANN, P., ZELLER, W. & GEIDER, K. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. Applied and Environmental Microbiology 58(11):3522-3526. 1992.

BRADBURY, J.F. Guide to plant pathogenic bacteria. United Kingdom. CAB International. 1986. 329pp.

BULTREYS, A. & GHEYSEN, I. Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. Applied and Environmental Microbiology 65(5): 1904-1909.1999.

CANO, G. MOSQUEDA & ESTRELLA, L.H. A simple and efficient PCR method for the specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seeds. World Journal of Microbiology & Biotechnology 13:463-437. 1997.

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. Fitopatologia Brasileira 27:186. 2002 (Resumo).

COELHO, M.V.S., MENDES, A.P. & MARQUES, A.S.dos A. Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização. Comunicado Técnico nº 59. Brasília. 8p. 2002a.

COELHO, M.V.S., MENDES, A.P., SANTOS, J.P.dos & MARQUES, A.S.dos.A. Incidência da seca dos ponteiros da goiabeira em Brazlândia-DF e desenvolvimento de teste de patogenicidade para *Erwinia psidii*. Fitopatologia Brasileira 27: 58. 2002b (Resumo).

COELHO, M.V.S., SANTOS, J.P.dos & MARQUES, A.S.dos A. Sobrevivência em cultura e avaliação de temperatura ótima para crescimento *in vitro* de *Erwinia psidii*, agente causal da seca dos ponteiros da goiabeira. Fitopatologia Brasileira 27:58. 2002c (Resumo).

COLÉNO, A., HINGAND, L. & BARZIC, M.R. Contribution a l'étude sérologique de *Pseudomonas phaseolicola* (Burk) Downson. Annales de Phytopathologie 2(1): 199-207. 1970.

CLARK, C.A, CHEN, C., RAINEY, N.W. & PETTIS, G.S. Diversity within *Streptomyces ipomoeae* based on inhibitory interactions, rep-PCR, and plasmid profiles. Phytopathology 88(11): 1179-1186. 1998.

CRUZ, C.M.V., ARDALES, E.Y., SKINNER, D.Z., NELSON, R.J., LOUWS, F.J., LEUNG, H., MEW, T.W. & LEACH, J.E. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. Phytopathology 86(12):1352-1359. 1996.

DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology 1992. 58(7): 2180-2187.

DYE, D.W. A taxonomic study of genus *Erwinia*: I. The “amylovora” group. New Zealand Journal Sci 11:590-607. 1968.

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

FERREIRA, L.P. & SALGADO, C.L. Bactérias. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H. & Amorim, L. (Eds.). Manual de Fitopatologia, Volume 1: Princípios e conceitos. 3ªed. São Paulo. Editora Agronômica Ceres. 1995. pp.97-131.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ªed. Brasília. Editora Embrapa. 1998. 220p.

FOX, R.T.V. Detection technology for plants pathogens. Edinburgh, Scotland. BCPC Symposium proceedings nº 63: Integrated crop Protection: Towards sustainability? 1995. pp.225-234.

FRANCISCO, V.L.F.S., BAPTISTELLA, C.S.L. & AMARO, A.A. A cultura da goiabeira em São Paulo. IEA-INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2005. Disponível em <http://www.iea.sp.gov.Br/out/verTexto.php?codTexto=1902>. Acessado em 06/12/2005.

FREITAS JR., OSMAR. A hora e a vez do ketchup de goiaba. Isto é. São Paulo. v1856. 11/05/2005. pp32-33.

FRUTISÉRIES, 1: Goiaba – Distrito Federal. In: Ministério da Integração Nacional(MI, SIH, DDH). Brasília. 8p. 2001.

GEORGE, M.L.C., NELSON, R.J., ZEIGLER, R.S. & LEUNG, H. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology* 88(3): 223-229. 1998.

GILSON, E., CLEMENT, J.M., BRUTLAG, D., & HOFNUNG, M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *The EMBO Journal* 1984. 3(6):1417-1421.

GHOSH, M., VERMA, S.C., MENGONI, A. & TRIPATHI, A.K. Enrichment and identification of bacteria capable of reducing chemical oxygen demand of anaerobically treated molasses spent wash. *Journal of Applied Microbiology*. 96:1278-1286. 2004.

GONZAGA NETO, L., SOARES, J.M., TEIXEIRA, A.H. de C. & MOURA, M.S.B. de. Goiaba: Produção - Aspectos Técnicos. Embrapa Semi-árido (Petrolina-PE), Informação Tecnológica (Coleção Frutas do Brasil 17). Brasília. 72p. 2001.

GOTO, M. *Fundamentals of Bacterial plant pathology*. Tokyo. 1992. 342p.

HORITA, M. & TSUCHIYA, K. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*.91(4):399-407. 2001.

HUGH, R. & LEIFSON, E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *Journal Bacteriological* 66:24-26. 1953.

IBGE. *Produção Agrícola Municipal*. 30. Brasil. 2003.

JUDD, A.K., SCHNEIDER, M., SADOWSKY, M.J. & DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Applied Environmental Microbiology* 59: 1702-1708. 1993.

JUNQUEIRA, N.T.V. Principais doenças da goiabeira. In: Zambolim, L & Monteiro, A.J.A. Doenças de Fruteiras Tropicais - 3º Encontro de Fitopatologia. Viçosa-MG.Universidade Federal de Viçosa.1999.pp.39-50.

JUNQUEIRA, N.T.V. Principais doenças e Pragas - Doenças. In: MANICA, I.(Ed.), Fruticultura tropical: 6. Goiaba. Porto Alegre. Cinco Continentes. 2000. pp. 225-248.

JUNQUEIRA, N.T.V. Doenças da goiabeira no cerrado. Circular Técnica nº15. Planaltina-DF. Embrapa Cerrados. 31p. 2001.

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

KAWATI, R. Cultivares. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA GOIABEIRA, 1. Anais. Jaboticabal. UNESP-FCAVJ/ FUNEP/ GOIABRAS.1997. PP.1-16.

Kovach, W.L. MVSP-Multivariate Statistical Package for Windows, Version 3.1. Pentraeth, Wales, UK. Kovach Computing Services. 1999.

LATOUR, X., CORBERAND, T., LAGUERRE, G., ALLARD, F. & LEMANCEAU, P. The composition of fluorescent pseudomonad population associated with roots is influenced by plant and soil type. Applied Environmental Microbiology 62(7): 2449-2456. 1996.

LEUNG, K. STRAIN, S.R., DE BRUIJN, F.J., & BOTTOMLEY, P.J. Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. Applied Environmental Microbiology 60:416-426. 1994.

LI, X. & de BOER, S.H. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Phytopathology* 85(8):837-842. 1995

LIMA, M. M.; JUNQUEIRA, N. T. V.; YAMANISHI, O. K.; MACHADO FILHO, J. A. ; BOA VENTURA, S. B. Cultura da Goiaba. In: SILVA, J. M. de M. coord. Incentivo a fruticultura no Distrito Federal. GDF. 2ª ed. 1999. pp.53-63.

LITTLE, E.L., BOSTOCK, R.M. & KIRKPATRICK, B.C. Genetic Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits in California. *Applied Environmental Microbiology* 64(10): 3818-3823. 1998.

LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W., STEPHENS, C.T. & DE BRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60(7):2286-2295. 1994.

LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W., STEPHENS, C.T. & DE BRUIJN, F.J. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85(5):528-536. 1995.

LOUWS, F.J., BELL, J., MEDINA-MORA, M., SMART, C.D., OPGENORTH, D., ISHIMARU, C.A., HAUSBECK, M.K., DE BRUIJN, F.J., & FULBRIGHT, D.W. rep-PCR mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology* 88(8):862-868. 1998.

LOUWS, F.J., RADEMAKER, J.L.W., DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 37:81-125. 1999.

LOZANO, J.C. & SEQUEIRA, L. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by leaf infiltration technique. *Phytopathology* 60:833-838. 1970.

LYONS, N.F. & TAYLOR, J.D. Serological detection and identification of bacteria from plants by the conjugated *Staphylococcus aureus* slide agglutination test. *Plant Pathology*. 39:584-590. 1990.

MANICA, I. Importância econômica. In: Manica, I.(Ed.), *Fruticultura tropical: 6. Goiaba*. Porto Alegre. Cinco Continentes. 2000a. pp. 9-22.

MANICA, I. Taxonomia – Morfologia - Anatomia. In: Manica, I.(Ed.), *Fruticultura tropical: 6. Goiaba*. Porto Alegre. Cinco Continentes. 2000b. pp. 23-35.

MANICA, I. Clima e solo. In: Manica, I.(Ed.), *Fruticultura tropical: 6. Goiaba*. Porto Alegre. Cinco Continentes. 2000c. pp. 37-56.

MARQUES, A.S.dos A., CORBIÈRE, R., GARDAN, L., TOURTE, C., MANCEAU, C., TAYLOR, J.D. & SAMSON, R. Multiphasic approach for the identification of the different classification levels of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. *European Journal of Plant Pathology*. 106:715-734. 2000.

MARQUES, A.S.dos A., COELHO, M.V.S. & FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização nutricional e molecular de *Erwinia psidii*, agente causal da seca dos ponteiros da goiabeira. *Fitopatologia Brasileira* 27:64. 2002 (Resumo).

MARTIN, A. Industrialização da goiaba. *Boletim do Centro Tropical de Pesquisa e Tecnologia de alimentos*. Campinas. 1967. n12. pp.37-54. Citado por GONZAGA NETO, L., SOARES, J.M., TEIXEIRA, A.H. de C. & MOURA, M.S.B. de. *Goiaba: Produção - Aspectos Técnicos*. Embrapa Semi-árido (Petrolina-PE), *Informação Tecnológica (Coleção Frutas do Brasil 17)*. Brasília. 72p. 2001.

MARTIN, B., HUMBERT, O., CAMARA, M., GUENZI, E., WALKER, J., MITCHELL, T., ANDREW, P., PRUDHOMME, M., ALLOING, G., HAKENBECK, R., MORRISON, D.A., BOULNOIS, G.J., CLAVERYYS, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research* 20:3479-3483. 1992.

MACMANUS, P.S. & JONES, A.L. Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains isolated from tree-fruit crops and *Rubus* spp. *Phytopathology* 85(2): 1547-1553. 1995.

MEDEIROS, R. B., FERREIRA, M.A.S.V., DIANESE, J.C. Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta patógeno. Brasília. Editora UnB. 2003.

MENDES, A.P., SANTOS, J.P. dos, VIEIRA, T.M., COELHO, M.V.S. & MARQUES, A.S.A. Produção e avaliação de antissoro policlonal contra *Erwinia psidii*, agente causal da seca dos ponteiros da goiabeira. *Fitopatologia Brasileira* 27:64. 2002.(Resumo).

MEUNIER, J.R. & GRIMONT, P.A.D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research Microbiological* 144:373-379. 1993.

MOREIRA, W.A. & SHARMA, R.D. Nematóides. In: BARBOSA, F.R. Goiaba – Fitossanidade. Embrapa Semi-árido (Petrolina-PE), Informação Tecnológica, (Série Frutas do Brasil, 18). Brasília. 63p. 2001.

MULLIS, K. & FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymology* 55:335-350.

NEWBURRY, S. F., SMITH, N.H., ROBINSON, E.C., HILES, I.D. & HIGGINS, C.F. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. *Cell* 1987. 48:297-310.

NORMAN, D.J., YUEN, J.M.F., RESENDIZ, R. & BOSWELL, J. Characterization of *Erwinia* populations from nursery retention ponds and lakes infecting ornamental plants in Florida. *Plant Disease* 87(2):193-196. 2003.

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 (Resumo).

OPGENORTH, D.C., SMART, C.D., LOUWS, F.J., DE BRUIJN, F.J. & KIRKPATRICK, B.C. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Disease* 80(8): 868-873. 1996.

OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy* 5: 1-78. 1958.

PAULA, R.D. Goiaba e seus produtos grandes fontes de vitaminas C. In: Congresso Brasileiro de Química. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Química. 1950. v3. pp.207-215. Citado por: GONZAGA NETO, L., SOARES, J.M., TEIXEIRA, A.H. de C. & MOURA, M.S.B. de. Goiaba: Produção - Aspectos Técnicos. Embrapa Semi-árido (Petrolina-PE), Informação Tecnológica (Coleção Frutas do Brasil 17). Brasília. 72p. 2001.

PENYALVER, R., GARCIA, A., FERRER, A., BERTOLINI, E. & LOPEZ, M.M. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Olive plants by enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 66(6):2673-2677. 2000.

PEREIRA, I.S. Amplificação de DNA por PCR. In: Azevedo, M.O., Felipe, M.S.S., Brígido, M.M, Maranhão, A.Q., Souza, M.T. (Eds). *Técnicas básicas em Biologia Molecular*. Brasília. Editora UnB.2003. pp.99-110.

PICCININ, E., PASCHOLATI, S.F. & DI PIERO, R.M. Doenças da goiabeira. In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bezerra Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.). *Manual de Fitopatologia, Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas*. 4ªed. São Paulo. Editora Agronômica Ceres. 2005. pp.401-405.

PIO, R., VALE, M.R., JUNQUEIRA, K.P. & RAMOS, J.D. Cultura da Goiabeira, 2001. Disponível em <http://www.editora.ufla.Br/boletim/pdfextensao/bol-27.pdf>. Acessado em 03/11/2005.

POOLER, M.R., RITCHIE, D.F. & HARTUNG, J.S. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA

PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for identification of this phytopathogen. *Applied Environmental Microbiology* 62(9): 3121-3127. 1996.

RADEMAKER, J.L.W. & DE BRUIJN, F.J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: Anolles, G.G. & Gresshoff, P.M.(Eds.). *DNA markers: protocols, applications & overviews*. New York. J. Willey & sons. 1997. pp.151-171.

RADEMAKER, J.L.W., LOWS, F.J. & DE BRUIJN, F.J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKermans, A.D.L., Elsas, J.D.Van & De Bruijn, F.J. *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1998.

RADEMAKER, J.L.W., HOSTE, B., LOUWS, F.J., KERSTERS, K., SWINGS, J., VAUTERIN, L., VAUTERIN, P. & DE BRUIJN, F.J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:665-677. 2000.

RANDHAWA, P.S., PANNU, S.S. & SCHAAD, N.W. Improved bio-PCR test for detection of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* in watermelon and cantaloupe seeds. (acessado em 20/02/2006 em http://www.cepheid.com/sites/cepheid/litpdfs/acidovorax_bio-pcr.pdf).2001.

RATHORE, D.S. Effect of season in the growth and chemical composition of guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Horticultural Science*. 51:1:41-47.1976. Citado por: GONZAGA NETO, L., SOARES, J.M., TEIXEIRA, A.H. de C. & MOURA, M.S.B. de. *Goiaba: Produção - Aspectos Técnicos*. Embrapa Semi-árido (Petrolina-PE), Informação Tecnológica (Coleção Frutas do Brasil 17). Brasília. 72p. 2001.

REZENDE, A.M., MIRANDA FILHO, R.J. & UESUGI, C.H. Sensibilidade de isolados de *erwinia psidii* a diferentes formulações cúpricas. Fitopatologia Brasileira 30:68. 2005. (Resumo).

RIBEIRO, R.G., MELO, L.A., SANTOS, J.P., MENDES, A.P., MARTINS, O.M. & MARQUES, A.S. Avaliação preliminar de técnicas sorológicas na detecção de *Erwinia psidii* em mudas de goiabeiras assintomáticas. Fitopatologia Brasileira 30:57. 2005. (Resumo).

RODRIGUES NETO, J., ROBBS, C. F. & YAMASHIRO, T. A bacteriose da goiabeira (*Psidium guajava* L.), provocada por *Erwinia psidii* sp. nov. Fitopatologia Brasileira 8(3):636. 1983

RODRIGUES NETO, J., ROBBS, C. F. & YAMASHIRO, T. A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. Fitopatologia Brasileira 12: 345-350. 1987.

ROBBS, C.F; RODRIGUES NETO, J. Enfermidades causadas por bactérias em fruteiras tropicais no Brasil. Summa Phytopathologica 25:1:73-76. 1999.

RODRIGUEZ, E.A. & MARQUES, A.S.A. Desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico do “fogo selvagem” do fumo, feijão e soja causado por *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*. Circular técnica 33. Brasília. Embrapa. 2004.

ROMEIRO, R.S.; MORAES, R.M.A.; OLIVEIRA, J.R.; COUTO, F.A.A. & RESENDE, S.T. Uma enfermidade da goiabeira de etiologia bacteriana no estado de Minas Gerais, Brasil. Fitopatologia Brasileira 18: 283. 1993 (Resumo).

ROMEIRO, R.S.; OLIVEIRA, J.R.; OLIVIRA, 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 (Resumo).

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

ROMEIRO, R.S. Bactérias Fitopatogênicas. 5ª ed. Viçosa-MG. Editora UFV. 417p. 2005.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOEFL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, G., HORN, G.T., MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

SAETTNER, A.W., SCHAAD, N.W., ROTH, D.A. Detection of Bacteria in Seed. St. Paul, Minnesota. APS Press. 1989.

SCHAAD, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul- Minnesota. APS Press (The American Phytopathological Society). 2001.

SCHAAD, N.W., CHEONG, S.S., TAMAKI, S., HATZILOUKAS, E. & PANOPOULOS, N.J. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolocola* in bean seed extracts. Phytopathology 85(2):243-248. 1995.

SLACK, S.A., DRENNAN, J.L. & WESTRA, A.A.G. Comparison of PCR, ELISA and DNA hybridization for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. in field-grown potatoes. Plant Disease 80(5):519-524. 1996.

SNEATH, P.H. & SKOAL, R.R. Numerical taxonomy. San Francisco, CA: W.H. Freeman and company, p.573.1973.

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

TAVARES, S. C. C. de H. & LIMA, M. F. Doenças. In: BARBOSA, F. R. Goiaba – Fitossanidade. Embrapa Semi-árido (Petrolina-PE), Informação Tecnológica, (Coleção Frutas do Brasil 18). Brasília. 63p. 2001.

TAYLOR, J.D. The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson. *Annual Applied Biology* 66:29-36. 1970.

TEIXEIRA, A.C.O., MARQUES, A.S. & FERREIRA, M.A. Caracterização bioquímica e molecular de isolados de *Erwinia psidii* do Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 60:58. 2005. (Resumo).

THEODORO, G.F. & MARINGONI, A.C. Sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em manipueira sob condições ambientais. *Pesquisa agropecuária brasileira* 37(7):945-953. 2002.

TODAFRUTA, 2002.
[Http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=602](http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=602).
Acessado em 04/04/2006.

TOKESHI, H.; VALDEBENITO, R.M.; DIAS, A.S. Ocorrência de bacteriose da goiabeira no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 6: 85-87. 1980.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R. & CASE, C.L. *Microbiologia*. 6ª ed. Porto Alegre. Artmed. 2003.

TRINDADE, L.C., LIMA, M.F. & FERREIRA, M.A.S.V. Molecular characterization of brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. *Fitopatologia brasileira* 30(1): 46-54. 2005.

TSUCHIYA, K., HOMMA, Y., KOMOTO, Y. SUZUI. Pratical Detection of *Pseudomonas cepacia* from Rhizosphere antagonistic to plant pathogens with a combination of selective medium and ELISA. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn 61:318-324.1995.

UESUGI, C. H.; MELO FILHO, P. de A.; LIMA, M. L. da P.; MORAES, C. A. TOMITA, C. K.; CAFÉ FILHO, A. C.; UENO, B. Ocorrência de *Erwinia psidii* em goiabeira no Distrito Federal. Summa Phytopathologica 27: 118. 2001(Resumo).

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. & LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research. 19(24):6823-6831. 1991.

VERSALOVIC, J., WOODS, C.R., GEORGHIOU, P.R., HAMILL, J.R., LUPSKI, J.R. DNA-Based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. Arch. Pathol. Lab. Med 117:1088-1098. 1993.

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F.J. & LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in molecular and cellular biology 5:25-40. 1994.

VINUESA, P., RADEMAKER, J.L.W., DE BRUIJN, F.J. & WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the canary islands by PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive Extragenic Palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. Applied Environmental Microbiology 64(6):2096-2104. 1998.

WEINGART, H. & VOLKSCH, B. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC-, REP-, and IS50-PCR. Journal of Phytopathology 145:339-345. 1997.

WHARTON, A.L. Detection of infection by *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson in white seeded dwarf bean seed stocks. Ann. Appl. Biol 60:305-312. 1967.

WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, L.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:6531-6535. 1990.

WONG, W.C. Production of monoclonal antibodies to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Letters in Applied Microbiology 10:241-244. 1990.

WOODS, R.C., WOODS JR., C.R., VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., LUPSKI, J.R. Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA fingerprints generated by repetitive sequence-based primers in the polymerase chain reaction. Journal of clinical microbiology 30:2921-2929. 1992.

ZAMBÃO , J.C. & BELLINTANI NETO, A.M. Cultura da goiaba. Campinas:CATI. Boletim Técnico 236.23p. 1998. Citado por: GONZAGA NETO, L., SOARES, J.M., TEIXEIRA, A.H. de C. & MOURA, M.S.B. de. Goiaba: Produção - Aspectos Técnicos. Embrapa Semi-árido (Petrolina-PE), Informação Tecnológica (Coleção Frutas do Brasil 17). Brasília. 72p. 2001.

ZERBINI JR, F.M., CARVALHO, M.G. de, ZAMBOLIM, E.M. Introdução à Virologia Vegetal. Viçosa. Editora UFV. 2002.

<http://www.guatchup.com.br/saude.html> acessado em 10/04/2006.

5. ANEXOS

5.1 – Caracterização bioquímica

5.2 – Planilhas de avaliação rep-PCR

5.1 – Caracterização bioquímica

5.1.1 – Teste de solubilidade em KOH

- Colônia bacteriana crescida por 48 horas em meio 523.

Reagente: Hidróxido de potássio (3%aq., p/v)

Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* limpa, colocar uma gota da solução de KOH sobre uma lâmina microscópica previamente esterilizada, com o auxílio de uma alça de *Drigalski*, remover uma pequena porção da colônia bacteriana e adicionar à gota de hidróxido de potássio, misturar até a obtenção de uma suspensão homogênea.

5.1.2 - Teste de Oxidação /Fermentação (OF) ou de Crescimento Anaeróbico

- Colônia bacteriana crescida por 48 horas em meio 523.

Meio OF:

Água.....100 ml
Dextrose.....1 g
Extrato de levedura.....100 mg
Peptona.....200 mg
Azul de bromotimol(abt) a 1%(*).0,5 a 1ml(**)

Ajustar pH a 7(verde), adicionar 300mg de ágar (Meio semi sólido) e aquecer o agár até dissolver. Transferir para tubos (Tubo comum: 5 ml; Tubo pequeno:2 ml) e autoclavar . Cobrir com óleo mineral 5 a 10 mm acima do meio.

Execução:

Inocular a bactéria introduzindo-a até o fundo do meio com a alça através do óleo. Incubar a 28-32°C por 24 h.

5.1.3 - Produção de Ácido a partir de carboidratos:

- Colônia bacteriana crescida por 48 horas em meio 523.

Meio Básico

Água destilada.....	900ml
(NH ₄)H ₂ PO ₄ (fosfato de amônio).....	500mg
K ₂ HPO ₄ (fosfato de potássio).....	500mg
MgSo ₄ . 7 H ₂ O(sulfato de magnésio).....	200mg
NaCl.....	500mg
Extrato de levedura.....	500mg
Azul de bromotimol(abt) a 1%.....	5ml

- Corrigir o pH em ponto neutro(pH7,0: para isto basta deixar o meio na cor verde claro).

- Para preparar meio semi-sólido, adicionar 3gde ágar/ litro. Neste caso, deve ser aquecido até a fervura para homogenizar o teor de ágar;

Carboidratos:

Os carboidratos são preparados na concentração de 15%, exceto aqueles menos solúveis em água e autoclavados ou filtrados em filtros de membrana.

Para cada frasco contendo 5ml de meio básico foram acrescentados 166,6µl de Manitol ou Rafinose 15%.

5.1.4 - Redução de Nitrato a Nitrito:

- Colônia bacteriana crescida por 48 horas em meio 523.

Meio de Nitrato:

Água.....100ml
Peptona.....1gr
KNO₃.(Nitrato de potássio).....200mg

Distribuir em tubos (5ml/tubo) e autoclavar.

Reativos:

A: 30mg de ácido sulfanílico dissolvido em 10 ml de ácido acético 30% (v/v de ácido acético glacial);

B: 50 mg de alfa naftilamina dissolvida em 10 ml de ácido acético 30%;

Execução e resultado:

- Inocular e incubar a 28-32°C por 2 a 3 dias;
- Adicionar 0,5ml de cada um dos reativos(para 5 ml do meio) e agitar;
- Aparecimento da cor vermelha indica a presença de Nitrato;
- Não aparecendo a cor vermelha há duas hipóteses:

1° O nitrato não foi reduzido;

2°O nitrato foi reduzido além do nitrato.

Para comprovar estas hipóteses, basta colocar um pouco de zinco. Caso aparecer a cor vermelha é porque a bactéria não reduziu o nitrato. Em caso contrário , comprova-se a segunda hipótese.

5.1.5 - Catalase

- Colônia bacteriana crescida por 48 horas em meio 523.
- **Reactante:** Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), 10 volumes

O teste de catalase é feito aplicando-se uma gota de água oxigenada (H_2O_2) de 10 volumes sobre a cultura líquida, colônia ou massa bacteriana colocada sobre uma lâmina de vidro.

5.1.6 - Reação de hipersensibilidade em plantas de fumo

Suspensão bacteriana formada a partir de cultura bacteriana de 48 horas de crescimento, equivalente a Escala de MacFarland (aproximadamente 10^9 ufc/ml).

Suspensões infiltradas sob a epiderme da folha no espaço internerval da face inferior da folha de fumo, por meio de uma seringa sem agulha.

5.2 – Planilhas de avaliação rep-PCR

5.2.1 – REP - PCR

Isolado	2100pb	2072pb	1958pb	1921pb	1844pb	1730pb	1500pb	1400pb	1365pb	1300pb	1200pb	1050pb	900pb	850pb	800pb	700pb	630pb	580pb	500pb	480pb	425pb	350pb	290pb	280pb
IBSBF435	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IBSBF446	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IBSBF453	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IBSBF454	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1
IBSBF493	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IBSBF1461	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IBSBF1480	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IBSBF1523	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IBSBF1347	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IBSBF1575	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IBSBF1576	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IBSBF1577	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IBSBF1579	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IBSBF452	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C76-1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C82-2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C133-1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C134-1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C140-1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C142-2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C148-2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C150-1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C151-2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C153-1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C294-1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C295-3	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C296-1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C299-3	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
Emb.C338-2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C342-1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C343-2	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1
Emb.C345-2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C400-3	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C421-2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C424-1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C432-1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C435-2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Emb.C439-3	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
UnB 1286	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
UnB 1285	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1
UnB 1287	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
UnB 1288	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1
UnB 1289	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1

5.2 – Planilhas de avaliação rep-PCR

5.2.2 – ERIC – PCR

Isolado	2787pb	2358pb	1886pb	1643pb	1500pb	1380pb	1260pb	1140pb	1020pb	960pb	920pb	900pb	780pb	720pb	700pb	600pb	580pb	560pb	540pb	480pb
IBSBF435	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF446	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF453	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF454	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF493	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF1461	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF1480	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF1523	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF1347	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF1575	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF1576	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF1577	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF1579	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
IBSBF452	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C76-1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C82-2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C133-1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C134-1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C140-1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C142-2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C148-2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C150-1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C151-2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C153-1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C294-1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C295-3	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C296-1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C299-3	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Emb.C338-2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C342-1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C343-2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C345-2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C400-3	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C421-2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
Emb.C424-1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C432-1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C435-2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Emb.C439-3	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
UnB 1286	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
UnB 1285	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
UnB 1287	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
UnB 1288	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
UnB 1289	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1

5.2 – Planilhas de avaliação rep-PCR

5.2.3 – BOX - PCR

Isolado	2642pb	2528pb	2414pb	2072pb	1929pb	1800pb	1643pb	1700pb	1786pb	1500pb	1400pb	1200pb	930pb	830pb	700pb	725pb	650pb	600pb	520pb	480pb	420pb	400pb	380pb
IBSBF435	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF446	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF453	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF454	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF493	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF1461	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF1480	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF1523	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF1347	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF1575	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF1576	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF1577	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF1579	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
IBSBF452	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C76-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C82-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C133-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C134-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C140-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C142-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C148-2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C150-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C151-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C153-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C294-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C295-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C296-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Emb.C299-3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
Emb.C338-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Emb.C342-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Emb.C343-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Emb.C345-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Emb.C400-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Emb.C421-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Emb.C424-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Emb.C432-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Emb.C435-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Emb.C439-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
UnB 1286	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
UnB 1285	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
UnB 1287	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
UnB 1288	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
UnB 1289	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1