

**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fitopatologia  
Pós-graduação em Fitopatologia**

**Desenvolvimento e aplicação de um método para detecção molecular  
de *Erwinia psidii*, agente causal da seca dos ponteiros da goiabeira**

**Claudênia Ferreira da Silva**

**Brasília – DF  
Julho 2011**

**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fitopatologia  
Pós-graduação em Fitopatologia**

**Desenvolvimento e aplicação de um método para detecção  
molecular de *Erwinia psidii*, agente causal da seca dos  
ponteiros da goiabeira**

**Claudênia Ferreira da Silva  
Orientadora: Professora Marisa A. S. Velloso Ferreira**

**Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Fitopatologia do  
Departamento de Fitopatologia da  
Universidade de Brasília, como  
requisito para a obtenção do  
Grau de Mestre em Fitopatologia**

**Brasília – DF  
Julho 2011**

**Trabalho de Dissertação 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 financeiro da CAPES.**

**Aprovado por:**

---

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

---

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

---

**Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller**  
**Universidade de Brasília - UnB**

**"Coisas são  
semelhantes, por isso a  
Ciência é possível.  
Coisas são diferentes,  
por isso a Ciência é  
necessária."**

**Anônimo**

## **Agradecimentos**

“Aquele que Foi, É e Sempre será o Supremo Rei. A Ele, toda Honra e Glória.”

A minha família, minha mãe Rosângela Maria, amiga, fortaleza e fonte infinita de amor. A meu irmão Felipe, meu “cara”, meu padrasto João... A vovó Maria por seu incentivo no que às vezes inalcançável se via...e vovô Fernando (*in memoriam*) pelo herói, pai e exemplo de dignidade. Essa vitória também é de vocês!

As amigas de sempre Jullie Kaori, Fernanda Pereira e Érica Santos, de quem a amizade transcende tempo e espaço, que independe de presença física, onde a comunicação acontece mesmo sem palavras.

A Paulo Yoshida que, por tempo suficiente se fez inesquecível em minha vida. A ele devo meu crescimento profissional e principalmente pessoal. Agradeço-te pelos momentos de risos, por ter chegado em minha vida sem pedir licença e bagunçar tudo e transformar meu mundo. Sem ti eu não seria o que hoje sou! Obrigado por fazer parte de minha vida!

Agradeço a professora Dr<sup>a</sup>. Marisa Álvares, pela orientação, pelos ensinamentos repassados e pelos momentos de debate e também a Dr<sup>a</sup>. Abi Marques, pelos ensinamentos, amizade, e disponibilidade de seu tempo em ajudar em fases do projeto.

Ao professor Robert Neil Gerard Miller por aceitar o convite para avaliação do presente trabalho e suas sugestões para melhoria do mesmo.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, pelos ensinamentos necessários para minha formação. Em especial ao professor Carlos Hidemi Uesugi, que tantas vezes esteve disposto a tirar-me dúvidas. Agradeço também aos funcionários do Departamento, Maria Evangelista, Arenildo, Arlindo e Kamila que de uma forma ou de outra me ajudaram e proporcionaram bons momentos de amizade e descontração. Obrigado a todos!

Agradeço em especial a José Cezar Castro, que muitas vezes, fora de suas funções ajudou-me sem pestanejar, sem queixar-se, apenas por amizade e afinal... ganhamos a batalha contra as cochonilhas!! Obrigado por sua amizade, carinho e disposição.

Aos senhores Kenshiro Tsusumi, Bruno Tsusumi e Takimi por disponibilizarem suas propriedades para realização das coletas em campo.

A toda a turma de amigos, que, seja de Mestrado ou Doutorado me fez ver que, além de muito trabalho, teria também muitos amigos para partilhar momentos felizes ou

nem tão alegres assim... Podem ser citados pelos nomes: Natália Lucinda, Naiara Pontes, Mikhail Leastro, Justino Dias, Liamar dos Anjos, Pablo Melo, Daniel Lage, Mônica Macedo, Esdras Henrique, Andressa Quintana, Maíra Andrade, Flávio Romero, Maria do Desterro, Ana Paula Pagani, Cecília Rodrigues, Eder Marques, Jessica Monteiro, Willian Soares, Eugênio Sperândio, Mariana Severo, Pedro Lemos, Guilherme Lapidus, Bárbara Alencar, Hugo Mota, enfim, a todos os made!

Agradeço também ao auxílio de Roberta Pereira, Tatiana Miranda e Anna Cristina Freitas.

À FAP/DF pelo apoio financeiro concedido (Processo 193.000.254/2007).

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de Mestrado (2009/2011).

Enfim, aos que auxiliaram ou participaram de alguma forma na realização do presente trabalho.

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica, justificativa e objetivos</b>	5
1.1 - A cultura da goiaba	5
1.2 - Importância da cultura no Brasil e no mundo	6
1.3 - Doenças da goiabeira no Brasil	7
1.4 - Bacteriose ou seca dos ponteiros da goiabeira	8
1.4.1 – Histórico e distribuição geográfica	8
1.4.2 – Etiologia	10
1.4.3 - Sintomatologia	11
1.4.4 – Epidemiologia	12
1.4.5 - Diagnose da seca dos ponteiros	13
1.4.6 – Controle	14
<b>2 - Justificativa e Objetivos</b>	15
<b>Referências Bibliográficas</b>	17
<b>Capítulo 2 – Desenvolvimento e comparação de métodos moleculares para detecção e identificação de <i>Erwinia psidii</i></b>	23
<b>Introdução</b>	25
<b>Material e Métodos</b>	28
Cultivo e preservação dos isolados	28
Extração de DNA	29
Amplificação do gene <i>recA</i>	30
Sequenciamento parcial do <i>recA</i> e seleção de iniciadores	30
Análise das sequencias, desenho e síntese dos oligonucleotídeos iniciadores	31
Especificidade dos iniciadores	31
Sensibilidade dos iniciadores	34
Detecção de <i>E. psidii</i> por PCR convencional, BIO-PCR e IC PCR	34
IC-PCR	34
BIO-PCR	35
PCR convencional	35
<b>Resultados</b>	36
Sequenciamento parcial do <i>recA</i> e seleção de iniciadores	36
Especificidade e sensibilidade dos iniciadores	37
Detecção de <i>E. psidii</i> por PCR, BIO-PCR e IC PCR	39
IC-PCR	39
BIO-PCR	40
PCR convencional	41
<b>Discussão</b>	42
<b>Referências Bibliográficas</b>	44

<b>Capítulo 3 – Detecção molecular de <i>Erwinia psidii</i> em goiabeira em casa de vegetação e campo</b>	52
<b>Introdução</b>	54
<b>Material e Métodos</b>	55
Detecção temporal de <i>Erwinia psidii</i> por PCR em goiabeiras inoculadas em casa de vegetação	55
BIO-PCR	55
PCR convencional	56
Detecção de <i>Erwinia psidii</i> por PCR em goiabeiras sintomáticas e assintomáticas de pomares do Distrito Federal	57
<b>Resultados</b>	57
Detecção temporal de <i>Erwinia psidii</i> por PCR em goiabeiras inoculadas em casa de vegetação	57
Detecção de <i>Erwinia psidii</i> por BIO-PCR em goiabeiras sintomáticas e assintomáticas de pomares do Distrito Federal	59
<b>Discussão</b>	62
<b>Referências Bibliográficas</b>	63
<b>Anexos</b>	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1** - Distribuição geográfica da seca dos ponteiros da goiabeira no Brasil (Coelho et al., 2002). 9
- Figura 2**-Aspecto das colônias de *Erwinia psidii* em meio de cultura 523 de Kado & Heskett, após 48 horas a 30 °C. 11
- Figura 3**- Sintomas causados por *Erwinia psidii* em plantas de goiabeira variedade Pedro Sato. A – Fruto mumificado aderido ao ramo. B – Folhas com escurecimento de nervuras e murcha. C – Início da frutificação mumificada. 12

### Capítulo 2

- Figura 1** – Etapas que seguem a BIO-PCR. Maceração do tecido afetado, plaqueamento em meio de cultura, diluição e PCR. 36
- Figura 2**- Sequencia de 355 pb do gene *recA* de *Erwinia psidii*. As sequencias destacadas representam os iniciadores selecionados: Sublinhado - Ep 2L, Negrito – Ep 1 L, Sublinhado – Ep 2 R, Negrito– Ep 1R, na respectiva ordem em que se encontra no quadro. 37
- Figura 3**- Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos da PCR com os pares Ep 2L/1R (A) e Ep 2L/2R (B), com as seguintes amostras: CN-Controle Negativo (água), 1 – 5: *Erwinia psidii*. 1-IBSBF 435, 2-IBSBF 1579, 3-IBSBF 1575, 4-Emb. B 81.3, 5-Emb. C 338.2, M-Marcador 100 pb DNA Ladder (Promega), 6 – 9: bactérias epifíticas e/ou endofíticas isoladas de goiabeira, 6-BG 6, 7-BG 1, 8-DNA de folha jovem de goiabeira, G, 9-*Colletotrichum gloeosporioides*, G, 10-*Pectobacterium carotovorum*, 11-*Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. 38
- Figura 4** - Eletroforese em gel de agarose a 1 % com produtos de IC-PCR a partir de suspensões de *Erwinia psidii* IBSBF 435 nas concentrações de  $10^8$  a  $10$  ufc/mL. Marcador de 100 pb DNA Ladder (Promega). CN-, controle negativo da PCR livre de DNA, CPD, controle positivo com DNA de IBSBF 435, CNF, controle negativo com macerado de folhas saudias de goiabeira, CPS, controle positivo com suspensão  $10^6$  ufc/mL de cultura de. IBSBF 435. 39
- Figura 5**- Eletroforese em gel de agarose a 1 % com os produtos da BIO-PCR a partir de suspensões de *Erwinia psidii* IBSBF 435 nas concentrações de  $10^7$  a  $10$  ufc/mL com incubação de 24 horas, e 3 repetições para cada diluição. Marcador de 100 pb DNA Ladder (Promega). 1 - suspensão bacteriana a  $10^6$  ufc/mL 2 - DNA purificado de IBSBF 435, 3 - controle negativo de folha de goiabeira macerada com água, 4 - controle negativo da PCR, livre de DNA. 40
- Figura 6**- Eletroforese em gel de agarose a 1 % com os produtos da BIO-PCR a partir de suspensões de *Erwinia psidii* IBSBF 435 nas concentrações de  $10^7$  a  $10$  ufc/mL com incubação de 48 horas, e 3 repetições para cada diluição. Marcador de 100 pb DNA Ladder (Promega). 1 - suspensão bacteriana a  $10^6$  ufc/mL 2 - DNA purificado de IBSBF 435, 3 - controle negativo de folha de goiabeira macerada com água, 4 - controle negativo da PCR, livre de DNA. 41

**Figura 7-** Eletroforese em gel de agarose a 1 %, mostrando os produtos da PCR convencional com os iniciadores específicos Ep 2L/Ep 2R para *Erwinia psidii*. (A) 1 e 2 – diluição 10<sup>1</sup> ufc/mL, 3 e 4 10<sup>2</sup> ufc/mL 1:10, 5 e 6 – 10<sup>2</sup> ufc/mL, 7 e 8 - 10<sup>2</sup> ufc/mL 1:10, 9 e 10 – 10<sup>3</sup> ufc/mL, 11 e 12 – 10<sup>3</sup> ufc/mL 1:10, 13 e 14 - 10<sup>4</sup> ufc/mL, 15 e 16 - 10<sup>4</sup> ufc/mL 1:10, 17 e 18 – 10<sup>5</sup> ufc/mL. (B) 19 e 20 – 10<sup>5</sup> ufc/mL 1:10, 21 e 22 - 10<sup>6</sup> ufc/mL, 23 e 24 - 10<sup>6</sup> ufc/mL 1:10. 25 e 26 – controle negativo de folha de goiabeira com água destilada, 27 e 28 – controle positivo de folha com suspensão bacteriana de *E. psidii* a 10<sup>7</sup> ufc/mL, 29 – controle negativo da PCR, 30 e 31 – controles positivos de DNA de *E. psidii* IBSBF 435.

### Capítulo 3

**Figura 1** – A: Eletroforese em gel de agarose a 1 %, mostrando os produtos da BIO-PCR com iniciadores Ep2L/Ep2R, de plantas de goiabeira inoculadas com *Erwinia psidii* (IBSBF 1576), após 10 dias da inoculação, sendo: M-Marcador 100 pb (Promega), CN- Controle negativo da PCR, CPS- Controle positivo com suspensão de células bacterianas, CPD- Controle positivo com DNA purificado, CNF- Controle negativo de folhas inoculadas com água estéril. Cada amostra corresponde a uma planta inoculada, com três repetições de cada no gel. B: planta inoculada mostrando início de necrose na axila e murcha da brotação aos 10 dias da inoculação.

**Figura 2** – A: Eletroforese em gel de agarose a 1 %, mostrando os produtos da PCR convencional com iniciadores Ep2L/Ep2R, de plantas de goiabeira inoculadas com *Erwinia psidii* (IBSBF 1576), após 10 dias, sendo: M-Marcador 100 pb (Promega), CN- Controle negativo da PCR, CPS- Controle positivo com suspensão de células bacterianas, CPD- Controle positivo com DNA purificado, CNF- Controle negativo de folhas inoculadas com água estéril. Cada amostra corresponde a uma planta inoculada, com duas repetições de cada no gel.

**Figura 3** – A, B e C - BIO-PCR para detecção de *Erwinia psidii* em pomares de goiabeiras no município de Brazlândia, DF, referente ao pomar 3. A) 1- controle negativo da PCR; 2- controle negativo com folhas saudáveis, 3- controle positivo de suspensão bacteriana do isolado IBSBF1576, 4- controle positivo de DNA desse isolado; 5 a 19: na parte superior e inferior, amostras dos brotos sem sintomas; B) e 1 a 7 em B: amostras de brotações sem sintomas 8 a 17 na parte superior e inferior, amostras de brotações coletados com sintomas;.C) 1-12: amostras de brotações coletados com sintomas. D) Ramo com sintomas de necrose e mumificação nas brotações.

**Figura 4** - BIO-PCR para detecção de *Erwinia psidii* em pomares de goiabeiras no município de Brazlândia, DF, referente ao pomar 1. 1- controle negativo da PCR; 2- controle negativo com folhas de goiabeira saudáveis, 3- controle positivo de suspensão bacteriana do isolado IBSBF1576, 4- controle positivo de DNA desse isolado; na parte superior e inferior, amostras dos brotos sem sintomas.

## ÍNDICE DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Tabela 1</b> - Produção de goiaba no Brasil por região	6
---	---

### Capítulo 2

<b>Tabela 1</b> - Isolados de <i>Erwinia psidii</i> utilizados no presente estudo	29
---	----

<b>Tabela 2</b> - Bactérias fitopatogênicas utilizadas nos testes de especificidade dos iniciadores de PCR para <i>Erwinia psidii</i>	32
---	----

<b>Tabela 3</b> - Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos endofíticos e/ou epifíticos de folhas de goiabeira.	33
--	----

<b>Tabela 4</b> - Sensibilidade dos iniciadores Ep 2L/2R e Ep 2L/1R testados com DNA purificado e suspensões bacterianas do isolado IBSBF 435 de <i>Erwinia psidii</i> .	39
--	----

### Capítulo 3

<b>Tabela 1</b> - Detecção de <i>Erwinia psidii</i> por PCR e BIO-PCR em mudas de goiabeira inoculadas em casa de vegetação em relação ao tempo e aparecimento de sintomas.	58
---	----

<b>Tabela 2</b> – Informações referentes às propriedades escolhidas para validação do método de BIO-PCR para detecção de <i>Erwinia psidii</i> em goiabeiras.	60
---	----

<b>Tabela 3</b> – Detecção de <i>Erwinia psidii</i> por BIO-PCR em pomares de goiabeira no Distrito Federal, 2011	60
---	----

## RESUMO

*Erwinia psidii* é o agente causal da seca dos ponteiros da goiabeira (*Psidium guajava*) no Brasil, sendo uma das doenças mais importantes para a cultura no país. Essa bactéria afeta ramos e brotações das plantas, o que reduz significativamente a produtividade da cultura. As medidas de controle existentes são ineficientes e a disseminação do patógeno ocorre com frequência através de material propagativo assintomático. Considerando a necessidade de um método sensível para detecção do patógeno em mudas de goiabeira, os objetivos deste trabalho foram: desenvolver iniciadores específicos para a detecção de *E. psidii* por PCR, comparar três métodos (IC-PCR, BIO-PCR e PCR convencional) com os iniciadores selecionados quanto ao seu potencial para detecção da bactéria em folhas de goiabeira e, finalmente, avaliar a BIO-PCR e PCR convencional para detecção em plantas inoculadas em casa de vegetação e em plantas sintomáticas e assintomáticas de pomares do Distrito Federal. A sequência de 355 pb de um fragmento amplificado do gene da recombinase A (*recA*) do isolado tipo IBSBF 435 foi usada para desenhar os iniciadores que foram testados quanto à sua especificidade com DNA de 59 isolados de *E. psidii*, 20 isolados de outras bactérias fitopatogênicas, 17 isolados endofíticos/epifíticos de goiabeira, bem como com o DNA de folhas de goiabeira e de *Colletotrichum gloeosporioides*, fungo patogênico à goiabeira. A sensibilidade foi testada com DNA purificado e suspensões bacterianas. O par de iniciadores Ep 2L/2R detectou 0,000001 pg de DNA de *E. psidii* e até o limite de 10 ufc/mL. BIO-PCR e PCR convencional foram mais sensíveis e mais rápidos do que a IC-PCR. Os limites de detecção em extratos de folhas misturados com suspensão bacteriana em diferentes concentrações foram de 10 e 10<sup>2</sup> ufc/mL, para BIO-PCR e PCR convencional, respectivamente. Em seguida, ambos os métodos foram testados em casa de vegetação com mudas de goiabeiras inoculadas com o isolado IBSBF 1576 (a 10<sup>7</sup> ufc/mL). Os tecidos inoculados foram coletados e analisados por PCR aos 0, 5, 10 e 15 dias após a inoculação. Os sintomas começaram a ser visualizados aos 5 dias e todas as amostras foram positivas para BIO-PCR e PCR convencional em todos os tempos amostrados. Em um segundo ensaio, 40 amostras foram coletadas de cada um dos três pomares de goiabeiras visitados em Brazlândia, DF, sendo 20 amostras com sintomas e 20 assintomáticas. Amostras de brotações jovens foram testadas por BIO-PCR com os iniciadores específicos. Das 60 amostras sintomáticas, 58 foram positivas (96,7 %), enquanto apenas quatro foram positivas entre

as assintomáticas (6,7%), demonstrando que o método pode ser aplicado para detecção da bactéria nos estágios iniciais da infecção. Este método representa uma valiosa ferramenta para o monitoramento da sobrevivência e disseminação de *E.psidii* e de novos registros da doença em pomares.

## ABSTRACT

*Erwinia psidii* causes bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) in Brazil, which is one of the most important phytosanitary problems of this crop in the country. The bacterium affects branches and twigs of guava trees, causing dieback, thus reducing yield significantly. Control measures are not effective and pathogen dissemination often occurs through contaminated but asymptomatic propagating plant material. Considering the need for a reliable and sensitive method for detecting the pathogen in plant material, the objectives of this study were to design *E. psidii*-specific PCR primers, to compare three methods, IC-PCR, BIO-PCR and conventional PCR with the selected primers, to evaluate the use of these primers in BIO-PCR and conventional PCR assays to detect *E. psidii* in inoculated guava plants grown in a greenhouse and to detect the pathogen by PCR in symptomatic and asymptomatic trees from guava orchards in Brasília, DF.

A 355 bp fragment of the recombinase A gene (*rec A*) amplified from the type *E. psidii* strain IBSBF435 was used for designing primers that were further tested for specificity with DNA from 59 *E. psidii* isolates, 20 isolates of other plant pathogenic bacteria, 17 isolates of epiphytic/endophytic bacteria from guava, as well as with DNA from guava leaves and DNA from *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic to guava. Sensitivity was tested with purified DNA and bacterial suspensions. Primer pair Ep2L/2R detected 0,000001 pg DNA and 10 cfu/mL and only amplified DNA from *E. psidii*. BIO-PCR and conventional PCR were more sensitive and less time-consuming than IC-PCR. The detection limit on extracts of macerated guava leaves mixed with bacterial suspensions at different concentrations were 10 and 10<sup>2</sup> cfu/ml for BIO-PCR and conventional PCR, respectively. In the greenhouse young guava shoots were inoculated with *E. psidii* strain IBSBF 1576 (10<sup>7</sup> cfu/mL) and plant tissue was analyzed by PCR at 0, 5, 10, and 15 days after inoculation. Symptoms were recorded after 5 days and all inoculated shoots were PCR positive at all times, by both BIO-PCR and conventional PCR. In a second assay, forty samples were collected from each of three guava orchards, 20 showing symptoms and 20 asymptomatic. Samples were tested by BIO-PCR with specific primers. PCR was positive for 58 out of 60 symptomatic samples (96.7%) and for 6.7% of asymptomatic samples, showing that the method can be used to detect the pathogen at early stages of infection. This specific PCR method represents also a valuable tool which can be used to monitor bacterial survival, dissemination and new disease outbreaks.

## **CAPÍTULO 1**

---

### **Revisão bibliográfica, justificativa e objetivos**

## CAPÍTULO 1

### 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1 – A cultura da goiaba

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é originária da América Tropical, com centro de origem entre o México e o Brasil, distribuída hoje, nas áreas tropicais e subtropicais do mundo (Kwee & Chong, 1990; Gonzaga Neto & Soares, 1994). Pertence à família Myrtaceae que inclui um grande número de espécies frutíferas (Pereira & Nachtigal, 2002; Ray, 2002; Kwee & Chong, 1990; Subramanyan et al., 1992). É uma planta perene, de porte arbustivo ou semiarbustivo, com 3 a 7 m de altura. As folhas são opostas, têm formato elíptico-oblongo e caem após a maturação. Os frutos são variáveis em seu tamanho, forma, sabor e peso em função da cultivar. A coloração da polpa pode ser branca, creme, amarela, rosa ou vermelha (Jacomino, 2008). No Brasil, as cultivares mais plantadas são Paluma, Rica, Pedro Sato, Kumagai, Ogawa, Yamamoto e Século XXI, todas de polpa vermelha. Uma das únicas cultivares de polpa branca amplamente utilizada é a Sassaoka (Pommer et al, 2006).

A goiaba é um fruto tropical muito importante nutricionalmente devido aos elevados teores de açúcares, vitaminas A, B e C, fibras e minerais como ferro, cálcio e fósforo, além de excelente digestibilidade. Deve-se ressaltar também o sabor e aroma que atribuem a essa fruta características únicas (Manica et al., 2001). A fruta destina-se tanto ao consumo *in natura* quanto à industrialização, na forma de compotas, massas, sorvetes, sucos e geléias (Embrapa Rondônia, 2004). Pode ser usada de forma medicinal contra algumas doenças, como por exemplo, o escorbuto (Cid & Carneiro, 2007) e o chá de suas folhas combate a disenteria (Seagri, 2010).

Cultivada desde a década de 70, a cultura da goiaba foi ganhando cada vez mais notoriedade no Brasil com o desenvolvimento de novas tecnologias de produção ao longo dos anos (Jacomino, 2008). A goiabeira pode ser propagada através de semente, ou vegetativamente através de enxertia e estaquia de ramos e raízes, sendo recomendada a propagação por enxertia ou estaquia, por produzirem frutos de melhor qualidade (Manica et al., 2001), mantendo-se assim características desejáveis para a formação de um pomar uniforme do ponto de vista agrônômico.

## 1.2 - Importância da cultura da goiaba no Brasil e no mundo

O Brasil apresenta imensas áreas de clima e solo favoráveis à produção comercial da goiabeira, sendo esse aspecto importante, não apenas pelo valor nutritivo da fruta, mais também pela perspectiva que representa no incremento da produção agrícola, na ampliação da atividade industrial e no potencial de exportação (Rozane et al., 2010). Por ser uma planta nativa de região tropical, com grande adaptação a climas subtropicais, desenvolve-se muito bem em quase todo o território nacional. Pomares comerciais de goiaba para a industrialização são encontrados desde o Rio Grande do Sul, passando por São Paulo, Minas Gerais, Goiás até o Norte e Nordeste brasileiros. No Estado de São Paulo, praticamente não existem limitações climáticas (Toda Fruta, 2003).

O cultivo comercial de goiabeiras representa importante papel na economia brasileira, pois nos últimos anos a área plantada aumentou 45% no Nordeste do Brasil, onde é produzida intensivamente sob irrigação (Pommer et al., 2006). No ano de 2004, o país atingiu uma produção de 408 mil toneladas em uma área plantada de aproximadamente 18 mil hectares, representando um aumento de cerca de 4% na produção e 5,6% de área cultivada em relação ao ano de 2000 sendo, até o presente momento, o ápice da produção nacional (Tabela 1). No Brasil, a produção comercial concentra-se principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste, sendo os principais produtores os Estados de São Paulo e Pernambuco (Agrianual, 2010). O Estado do Espírito Santo é responsável pela produção de 6,5 toneladas de goiabas por ano (Agrianual, 2010), sendo Santa Teresa o município com maior área de cultivo e produção dessa fruteira (LSPA, 2005).

Tabela 1 - Produção de goiaba no Brasil por região

Produção (toneladas)							
Região	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
<b>Norte</b>	1.333	3.364	3.191	2.333	4.432	4.985	5.911
<b>Nordeste</b>	110.620	140.800	155.078	216.445	156.886	135.988	136.285
<b>Sudeste</b>	135.108	135.381	132.564	145.262	142.200	146.122	138.365
<b>Sul</b>	8.038	12.176	13.164	12.375	10.429	11.215	10.243
<b>Centro Oeste</b>	26.003	29.406	24.750	31.868	31.586	29.945	25.497
<b>Total</b>	<b>281.102</b>	<b>321.127</b>	<b>328.747</b>	<b>408.283</b>	<b>345.533</b>	<b>328.255</b>	<b>316.301</b>

Fonte: Agrianual (2010).

Conforme dados coletados pela Divisão Técnica de Planejamento – DITEP (2009), a Central de Abastecimento comercializou 20.606,9 toneladas de goiaba. Deste montante apenas 1,6 % dos frutos foram produzidos no Ceará, os demais 98,4 % foram provenientes de Pernambuco, Bahia e São Paulo (Ceasa, 2009).

O aumento no consumo de frutas de mesa e de sucos naturais é uma tendência mundial que pode ser aproveitada como um incentivo para uma produção de qualidade (Zambão & Neto, 1998). O Brasil é o terceiro maior exportador mundial da fruta, destacando-se na produção de goiabas vermelhas.

Em nível mundial, a Índia, o Paquistão, o Brasil e o México destacam-se na produção de goiaba em cultivos comerciais (SIAP, 2003). Na Índia, o maior produtor mundial, a goiaba é cultivada em mais de 150.900 hectares (Fruits, 2006) produzindo mais de 1,6 milhões de toneladas, mas a produtividade é bastante baixa, em torno de 10-12 t/ha, devido ao fraco manejo e perdas em pós-colheita (Khushk & Lashari, 2006). A Índia possui o maior número de árvores, mas em cultivos dispersos e pouco produtivos, utilizados para a produção de suco de goiabas brancas. O Paquistão, por sua vez, aparece como o principal exportador da fruta *in natura* com produção de 20 a 35 t/ha (Pommer et al., 2006).

### **1.3 - Doenças da goiabeira no Brasil**

Há algumas décadas a cultura da goiaba no Brasil encontra-se com excelentes possibilidades de melhoria tanto para o setor industrial do mercado quanto para o consumo *in natura*. As exportações de goiaba e seus produtos industrializados ainda são pequenas, o que faz a produção brasileira ser voltada exclusivamente para o mercado interno (Piedade Neto et al., 2002). No entanto, a grande demanda por mudas e outros materiais de propagação por parte de fruticultores de todas as regiões do país tem favorecido a disseminação de doenças causadas por bactérias, fungos e nematóides, por meio de mudas contaminadas (Junqueira et al., 2000). Deve-se considerar também a entrada de materiais de propagação e de frutas de outros estados e países, mesmo sendo de outras espécies, sem as devidas medidas de segurança exigidas pelos órgãos de fiscalização, o que pode estar facilitando a entrada de doenças e patógenos exóticos no Brasil. Como exemplo, pode-se citar a constatação da podridão parda da goiaba, causada por *Dothiorella dominicana* (Junqueira et al, 1999) e a podridão dos frutos da goiabeira por *Phyllosticta psidicola* (Tozetto & Ribeiro, 1993) no Distrito Federal, duas

doenças comuns na Oceania e Ásia. Esses fatos indicam que novas doenças estão sendo introduzidas de forma desordenada (Junqueira, 2000).

Entre as doenças mais importantes da cultura está a ferrugem das Mirtáceas, causada pelo fungo *Puccinia psidii*, cujos primeiros sintomas aparecem nos frutos, botões florais e folhas novas (Junqueira et al., 2001). O fungo infecta flores e frutos em desenvolvimento, podendo ocasionar perdas significativas (Junqueira et al., 2001). Pode-se citar também a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, afetando severamente a fase de florescimento, maturação e pós-colheita. Na estação chuvosa, aparece crestamento dos ramos novos que vão adquirindo coloração púrpura, tornando-se pardo-escuros mais tarde e quebradiços (Junqueira et al., 2001).

Entre as doenças causadas por nematóides destacam-se o declínio das folhas da goiabeira, que é causado pelo nematóide das galhas, *Meloidogyne enterolobii* (sin. *M. mayaguensis*). As plantas infectadas mostram redução de crescimento, clorose generalizada, deficiência nutricional e redução qualitativa e quantitativa de produção. As raízes severamente infestadas apresentam-se pouco desenvolvidas e deformadas pela presença de múltiplas galhas de tamanho variado (Siqueira et al., 2009). Pode-se ainda citar outras doenças causadas por *M. incognita* raça 2 e *Basiria* sp. (Junqueira et al., 2001).

As viroses têm pouca expressão na cultura da goiaba destacando-se o mosaico amarelo das folhas, causada por um caulimovírus (Junqueira et al., 2001).

Quanto às doenças bacterianas, tem-se o relato de mancha bacteriana em 1979, atribuída a *Pseudomonas* sp. (Tokeshi & Valdebenito, 1980) e posteriormente a seca dos ponteiros causada por *Erwinia psidii* (Rodrigues Neto et al., 1987), objeto do presente estudo.

## **1.4 - Bacteriose ou seca dos ponteiros da goiabeira**

### **1.4.1 – Histórico e distribuição geográfica**

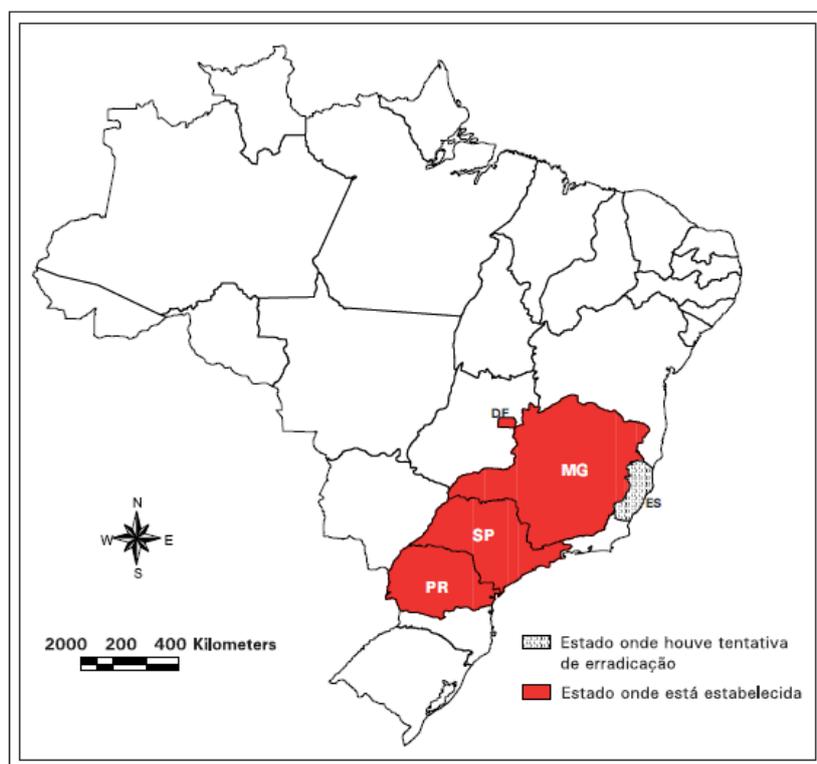
A bacteriose é um dos principais problemas fitossanitários e um dos fatores limitantes ao cultivo da goiabeira em algumas regiões como, por exemplo, na região Centro-Oeste (Marques et al., 2007).

O primeiro relato da doença ocorreu em 1982 em São Paulo, nos municípios de Valinhos e Pindamonhangaba (Rodrigues Neto et al., 1987). Atualmente encontra-se disseminada em outras regiões do estado como Mogi das Cruzes, Campinas, Registro, Itariri, Jacareí, Ariflana e Santa Isabel (Piccinin & Pascholati, 1997). Foi registrada em Minas Gerais (Romeiro et al., 1994), Espírito Santo (Oliveira et al., 2000), Carlópolis,

no Paraná, em 2000 e no Distrito Federal (Lima et al., 1999; Uesugi et al., 2001; Junqueira et al., 2001) (Figura 1).

Levantamentos realizados nos pomares da região de Brazlândia, Distrito Federal, em 1999, mostraram que as perdas de um pomar das variedades Paluma e Pedro Sato chegaram a 85% (Lima et al., 1999). A seca dos ponteiros provoca danos expressivos, sendo confirmada sua presença em 10 das 19 propriedades inspecionadas (52,6 %) em 2001 no Distrito Federal (Coelho et al., 2002). No estado de São Paulo o patógeno está amplamente disseminado em diversos municípios, principalmente em pomares instalados por meio de mudas propagadas vegetativamente. Isso sugere a disseminação da doença através de mudas provenientes de plantas com a doença (Rodrigues Neto et al., 1987). Apesar da importância de *E. psidii* para a cultura da goiaba no Brasil, existem poucos estudos sobre sua biologia, distribuição e prevalência da doença nas áreas de cultivo.

Registros da ocorrência da bactéria em outros países eram inexistentes até recentemente. O primeiro relato de ocorrência de *E. psidii* fora do Brasil foi registrado por Coutinho et al. (2011), no Uruguai e Argentina, onde o patógeno foi detectado em plantas de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) causando sintomas de murcha de ramos novos, necrose de nervuras e folhas.



**Figura 1** - Distribuição geográfica da seca dos ponteiros da goiabeira no Brasil (Coelho et al., 2002).

### 1.4.2 – Etiologia

A seca dos ponteiros da goiabeira é causada pela bactéria *Erwinia psidii* Rodrigues Neto et al. (1987). Devido às suas características bioquímicas e fisiológicas, foi descrita como pertencente ao grupo “amylovora” e, por não apresentar similaridade com outra espécie deste grupo, foi descrita como uma nova espécie, *Erwinia psidii* sp. nov. (Rodrigues Neto et al., 1983).

Estudos anteriores realizados por Tokeshi & Valdebenito (1980), identificaram uma bactéria atacando goiabeiras no estado de São Paulo, que induziam sintomas similares aos da seca dos ponteiros. 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 as bactérias deste primeiro estudo não foram preservadas, não sendo possível uma comparação com *E. psidii*, agente causal da seca dos ponteiros.

*E. psidii* é uma bactéria Gram negativa, forma colônias de coloração esbranquiçada em meios de cultura não seletivos (Figura 2) e apresenta reação negativa aos testes de hipersensibilidade em folhas de fumo e podridão em batata. É uma bactéria móvel que possui flagelos peritríquios e que se assemelha, em valores de concentração de GC do DNA (52%), a *E. tracheiphila* e *Brenneria rubrifaciens*, ambas pertencentes ao grupo “amylovora”. No entanto, *E. psidii* diferencia-se de *B. rubrifaciens* pela redução de substâncias a partir da sacarose. Diferencia-se de *E. tracheiphila* por requerer fatores de crescimento e pela utilização diferenciada de carboidratos para produção de ácidos (Rodrigues Neto et al., 1987).

Para a identificação de *E. psidii* por testes bioquímicos, a seguinte lista mínima de testes nutricionais e fisiológicos foi sugerida por Marques et al. (2007): teste de Gram, oxidação-fermentação, atividade de catalase, inoculação em hospedeira (*P. guajava*), degradação de pectato, indução de hipersensibilidade em folhas de fumo, produção de ácido a partir de manitol (positivo) e rafinose (negativo), redução de nitrato a nitrito e produção de urease.

Para crescimento da bactéria em cultura Marques et al. (2007) verificaram que a faixa ótima para desenvolvimento *in vitro* foi de 33 °C, quando uma população de 10<sup>3</sup> ufc/mL inicial passou para 10<sup>8</sup> ufc/mL em 16 horas de incubação. Verificou-se ainda, o tempo de sobrevivência do patógeno em cultura, que foi estimado em menos de 10 dias, sendo que aos 10 dias, já não foi possível encontrar células viáveis. Já em suspensão aquosa, as células permaneceram viáveis por até 120 dias.

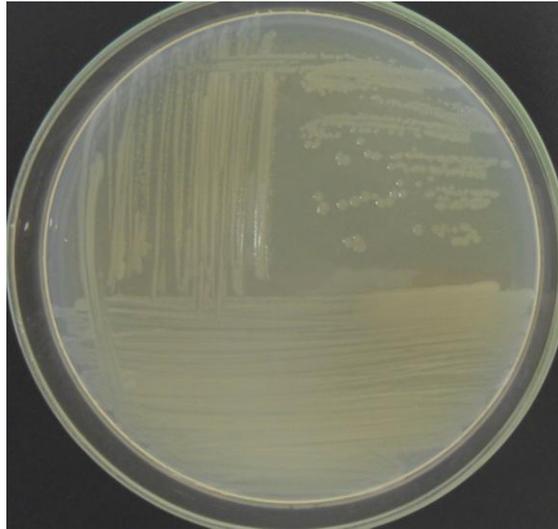


Figura 2-Aspecto das colônias de *Erwinia. psidii* em meio de cultura 523 de Kado & Heskett, após 48 horas a 30 °C

### 1.4.3 - Sintomatologia

Nas plantas de goiaba, a bacteriose ou seca dos ponteiros, causada por *E. psidii*, manifesta-se nas extremidades de ramos novos, nas flores e frutos jovens. O patógeno ataca os ramos pouco lignificados, e as brotações evoluem em direção à parte apical. Os brotos afetados exibem coloração parda avermelhada, seguida de um murchamento repentino. Removendo-se a casca dos ramos e brotações atacadas, observa-se no córtex uma coloração que vai de marrom a preta.

As folhas e frutos e os restos florais, permanecem aderidos aos ramos secos. A doença não progride para as folhas e ramos mais velhos, ficando restrita à região dos ponteiros (Junqueira, 2000).

Os principais sintomas descritos em pomares comerciais de goiabeiras são: seca dos ramos novos, necrose das nervuras, encharcamento do tecido foliar, abortamento de frutinhas, mumificação de frutos jovens, enegrecimento acentuado da ráquis dos ramos novos (Coelho et al., 2002; Marques et al., 2007)(Figura 3).



Figura 3- Sintomas causados por *Erwinia psidii* em plantas de goiabeira variedade Pedro Sato. A – Fruto mumificado aderido ao ramo. B – Folhas com escurecimento de nervuras e murcha. C – Início da frutificação mumificada.

#### 1.4.4 – Epidemiologia

Segundo Romeiro et al. (1994), a doença assume formas mais graves quando se tem temperaturas e umidade elevadas. As características climáticas da região de cultivo e o sistema de produção empregado irão influir diretamente na severidade da doença. Segundo Junqueira et al. (2000) em Brasília, DF, durante o período seco e frio, a incidência da doença no cultivo irrigado diminuiu e nos plantios não irrigados praticamente desaparece. Excesso de adubação nitrogenada pode favorecer o desenvolvimento da doença.

A bactéria *E. psidii* pode penetrar na planta através de aberturas naturais ou por ferimentos provocados pelas operações de poda ou colheita (Ribeiro et al., 1985). Existem evidências de mecanismos de “quorum sensing” em *E. psidii*, relacionados à produção de acil-homoserina lactonas (Acyl-HSL), envolvidas na comunicação intercelular e produzidas por diversas bactérias Gram-negativas (Pomini et al. 2005).

A bactéria aparentemente coloniza órgãos jovens da planta e não há evidência de morte das árvores (Coelho et al., 2002).

Testes de patogenicidade com inoculação artificial, realizados por Rodrigues Neto et al., 1987 em outras espécies da família Myrtaceae, demonstraram que a bactéria é capaz de infectar também araquê (*Psidium cattleianum*), jambo-vermelho (*Eugenia jambolana*) e melaleuca (*Melaleuca viridiflora*). Em condições de infecção natural, a bactéria é capaz de infectar o eucalipto (Coutinho et al., 2011). A longevidade de *E. psidii* em restos de cultura infectados e a sua possível sobrevivência no solo ou associada a plantas hospedeiras alternativas ainda não são conhecidas (Coelho et al., 2002).

#### **1.4.5 – Diagnose da seca dos ponteiros**

A diagnose da seca dos ponteiros pode ser realizada por observação dos sintomas, isolamento da bactéria, realização de testes bioquímicos e de patogenicidade. Os testes de patogenicidade existentes podem ser longos e dispendiosos, considerando-se o tempo necessário à obtenção de mudas provenientes de sementes ou do enraizamento de estacas. Visando contornar este problema, Marques et al. (2007) desenvolveram um teste simples para avaliação de virulência de isolados de *E. psidii* a partir de ramos e folhas destacados com resultados mais rápidos. A bactéria não sobrevive por muito tempo em meio de cultura, sendo necessárias repicagens sucessivas que podem levar os isolados a perder a virulência ou se tornarem atípicos (Coelho et al. 2002; Teixeira et al., 2008).

Alguns métodos sorológicos permitem a identificação rápida, simples e precisa de microrganismos, e têm como princípio a união de macromoléculas (anticorpo) ao mesmo tipo de indutor de sua produção (antígeno) (Tortora et al., 2005). Métodos como ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) tem sido utilizados na detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas (Singh et al., 2000; Lee et al., 2001; Sahin et al., 2003; Yorinori, et al., 2003; Carneiro Jr. et al., 2004). As desvantagens dos métodos sorológicos são a incapacidade de distinção de células viáveis de inviáveis e a baixa sensibilidade.

Teixeira et al. (2008) produziram o antissoro As 15-1 contra *E. psidii*, que foi testado com 47 isolados da bactéria, 10 isolados de outros gêneros de bactérias fitopatogênicas e frente a 10 bactérias saprofíticas isoladas de partes da planta de goiabeira para verificação de especificidade. Os resultados foram positivos para todos

os isolados de *E. psidii*, negativos para as demais bactérias fitopatogênicas e apresentou reação cruzada com dois dos isolados saprofiticos, indicando a presença de epitopos em comum. Esse tipo de reação é freqüente quando se usa antissoros policlonais (Trigalet et al., 1978). Em seguida, determinou-se os limiares de detecção usando-se o enriquecimento da bactéria em extrato de folhas de goiabeira, seguido de imunodifusão radial dupla (ID). Este método consiste na aplicação do antissoro em gel de ágar ou agarose onde pode ser observada linha de precipitação entre os orifícios, caso a reação seja positiva. Resultados obtidos mostraram que, com o enriquecimento, foi possível detectar a bactéria mesmo na concentração mais baixa,  $10^3$  ufc/g, após 36 horas de enriquecimento.

Teixeira et al. (2009) usaram a amplificação de DNA genômico de 42 isolados de *E. psidii* com os iniciadores REP, ERIC e BOX, que amplificam regiões entre elementos repetitivos no genoma. Os perfis genômicos entre os isolados revelaram-se bem homogêneos, indicando a ocorrência de prováveis sequências alvo para o desenvolvimento de iniciadores específicos para PCR.

#### **1.4.6 – Controle**

A grande variabilidade genética da goiabeira, cujas plantas são, em sua maioria, oriundas de propagação por sementes, resulta em diversos materiais com diferentes graus de resistência ou suscetibilidade a pragas e doenças (Tavares & Lima, 2001). Não existem, contudo, relatos de resistência genética em *P. guajava* a *E. psidii*, somente observações de campo sugerindo que algumas cultivares são mais suscetíveis ao patógeno que outras. As variedades de polpa branca apresentam maior tolerância à bacteriose do que as variedades de polpa vermelha (Piccinin et al., 2005).

Não há medidas fitossanitárias eficientes para o controle desta bacteriose no campo, sendo necessário, no atual estágio de conhecimento da doença, admitir a convivência com a bactéria nos pomares (Coelho et al., 2002).

Em trabalho realizado por Rezende (2006), testou-se o uso de alguns compostos cúpricos para o controle da seca dos ponteiros, entre os quais, sulfato de cobre, oxiclreto de cobre, hidróxido de cobre e compostos orgânicos. Avaliou-se a eficiência dos compostos citados quanto à sua eficiência no controle da doença e fitotoxicidade em frutos jovens. Não se obteve resultados satisfatórios quanto ao controle da bacteriose e observou-se alta fitotoxicidade em florações e início da frutificação. Resultados mostraram-se promissores com o uso de composto bioativo líquido que pode funcionar

como fertilizante orgânico, favorecendo o aparecimento de antagonistas, equilibrando componentes do agrossistema (Rezende et al., 2008).

Na ausência de controle efetivo da doença, deve-se realizar o controle preventivo, para evitar a chegada da bactéria ao pomar, recomendando-se assim a aquisição de mudas saudáveis, produzidas em viveiros controlados pela fiscalização sanitária (Manica et al., 2000). No caso da doença encontrar-se já estabelecida no pomar, as seguintes medidas são recomendadas:

- Condução de poda com formação em taça aberta, garantindo assim bom arejamento, insolação intensa e penetração de produtos químicos.

- Podar ramos atacados, cortando até 20 centímetros depois da área da haste infectada.

- Evitar podas contínuas, que darão origem a novas brotações, principalmente durante períodos quentes e úmidos, realizando as mesmas nos períodos mais quentes do dia e períodos de seca.

- Desinfetar ferramentas de poda em solução de 1:3 de água e hipoclorito de sódio ou amônia quaternária.

- Pulverizar as goiabeiras preventivamente com fungicidas cúpricos a fim de manter a estabilidade da planta em relação ao patógeno (Manica *et al.*, 2000).

- É necessário cuidado com a água de irrigação, principalmente quando se tem outros produtores na mesma região, pois esse pode ser um importante meio de disseminação da bactéria (Piccinin et al., 2005).

## **2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

Atualmente, a seca dos ponteiros é um dos fatores limitantes na cultura da goiaba em alguns estados, principalmente no Distrito Federal, não só pelas perdas causadas aos produtores, mas também pela fácil disseminação nos pomares e difícil controle. A doença já foi relatada nos estados de São Paulo (Rodrigues Neto et al., 1987), Minas Gerais (Romeiro et al., 1994), Espírito Santo (Oliveira et al., 2000) e Distrito Federal (Uesugi et al., 2001), causando prejuízos.

*Erwinia psidii* é um patógeno de distribuição restrita a algumas regiões do Brasil, no entanto, não está incluído na atual lista de pragas quarentenárias A2 (MAPA, IN nº 41 de 2008). Assim, tem-se a necessidade de métodos rápidos para detecção precoce do

patógeno em mudas assintomáticas, que dêem aos produtores a certeza de aquisição de mudas sadias.

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de um método molecular para a detecção do patógeno em mudas assintomáticas de goiabeira e que possa ser empregado para a avaliação fitossanitária de mudas e pomares.

Foram os objetivos específicos:

1- Determinar a especificidade e sensibilidade dos iniciadores (*primers*) candidatos já desenhados com base na seqüência do gene da recombinase (*rec A*).

2- Comparar a eficiência dos métodos moleculares IC-PCR, PCR convencional e BIO-PCR, usando os iniciadores selecionados, a partir de culturas puras da bactéria, folhas inoculadas artificialmente e mudas de goiabeira inoculadas em casa-de-vegetação.

3- Validar o método considerado mais eficiente em condições de campo, em plantas naturalmente infectadas, com e sem sintomas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agriannual (2010) Goiaba. São Paulo. FNP pp.341-344.

Carneiro Jr JB, Silveira SF, Souza Filho GA, Olivares FL, Giglioti EA (2004) Especificidade de anti-soro policlonal a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Fitopatologia Brasileira 29: 614-619

Ceasa/CE – Central de Abastecimento do Ceará S/A – Tabela dos principais produtos hortigranjeiros comercializados em 2009. <http://www2.ceasa-ce.com.br/boletins.php.?pagina=ppmensais-2008.htm>.

Cid LPB, Carneiro R (2007) Embrapa investe em técnicas de biotecnologia para controlar nematóide da goiabeira. <[http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_3/goiabeira/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_3/goiabeira/index.htm)>

Coelho MVS, Mendes AP, Marques ASA (2002) Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização. Brasília, DF. Embrapa Recursos genéticos. Comunicado Técnico 59.

Coutinho TA, Brady CL, van der Vaart M, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Perez C, Wingfield MJ (2011) A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. Australasian Plant Pathology 40: 55-60.

Divisão técnica de planejamento – DITEP (2008) Disponível em [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/image/RELATORIO\\_GESTAO/SFA/CE/2009.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/image/RELATORIO_GESTAO/SFA/CE/2009.pdf)

Embrapa Rondônia - Fruticultura na Amazônia (2004) <http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/bases/frut/goiaba/pratica.htm>

Fruits - Current Status in India. (2006) Capt. <http://agricoop.nic.in/hort/hortrevo5.htm> March.

Gonzaga Neto L, Soares JM (1994) Goiaba para exportação: aspectos técnicos da produção. Embrapa-SPI. (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 5) pp. 49.

Jacomino AP (2008) A cultura da goiabeira. Universidade de São Paulo. Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”. Disponível em: <http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/A%20CULTURA%20DA%20GOIABEIRA.pdf>

Junqueira NTV, Icuma IM, Veras MCM, Oliveira MAS, Dos Anjos JRN In: Silva JM de M (1999) Incentivo à fruticultura no Distrito Federal: Manual de fruticultura. Ed. COOLABORA pp.42-52.

Junqueira NTV (2000). Doenças e pragas. In: Manica, I. Fruticultura Tropical 6. Goiaba. Ed. Cinco Continentes.

Junqueira NTV, Andrade LRM, Pereira M, Lima MM, Chaves RC (2001) Doenças da goiabeira no cerrado. Planaltina. Embrapa. Circular Técnica, 15.

Kwee, LT, Chong KK (1990). Botany and Cultivars. In: Guava in Malaysia production, pests and diseases. Kuala Lumpur. Tropical Press pp. 21-51.

Khushk AM, Lashari MI (2006). Factors affecting guava produce. <http://www.dawn.com/2005/10/24/abr5.htm>.

Lee IM, Lukaesko LA, Maroon CJM (2001) Comparison of Dig-labeled PCR, Nested PCR, and ELISA for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field-grown potatoes. Plant Disease 85: 261-266.

Lima MM, Junqueira NTV, Yamanish OK, Machado Filho JA, Boaventura SB (1999) Cultura da goiabeira. In: OCDF/COOLABORA (Ed.) Incentivo à fruticultura no Distrito Federal. Manual de Fruticultura. pp.53-63.

LSPA (2005). Goiaba. In: GCEA/ES. Levantamento sistemático da produção agrícola. IBGE. pp.31.

Manica, I. (2001) Fruticultura Tropical 6. Goiaba. Ed. Cinco Continentes.

MAPA (2008) - INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18212>

Marques ASA, Coelho MVS, Ferreira MASV, Damasceno JPS, Mendes AP, Vieira TM (2007). Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. Revista Brasileira de Fruticultura. 29: 488-493

Oliveira JR, Ventura JA, Silva IT, Costa H (2000) Ocorrência da bacteriose da goiabeira, causada por *Erwinia psidii*, no Estado do Espírito Santo. Fitopatologia Brasileira 25: 328

Pereira FM, Nachtigal JC (2002) Goiabeira. In: Bruckner CH (2002) Melhoramento de Fruteiras Tropicais. Ed. Viçosa. UFV. pp. 267-289.

Piccinin E, Pascholati SF (2005) Doenças de goiabeira (*Psidium guajava*). In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (2005) Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas. Ed. Ceres. pp. 401 - 422.

Piedade Neto A (2002) Goiaba: o trunfo das virtudes, só agora reveladas. In: Agriannual. Goiaba. FNP. pp. 364

Pommer CV, Murakami KRN, Watlington F (2006) Goiaba no mundo. O Agrônomo, 58(1/2).

Pomini AM, Manfio GP, Araújo WL, Marsaioli AJ (2005) Acyl-homoserine lactones from *Erwinia psidii* R. IBSBF 435<sup>T</sup>, a guava phytopathogen (*Psidium guajava* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 6262-6265.

Ray PK (2002) Guava. Breeding Tropical and Subtropical Fruits. Springer, New Delhi. pp.143- 154.

Rezende AMFA (2006) Estudo sobre a resistência genética a produtos químicos no controle da bacteriose da goiabeira (*Psidium guajava*) causada por *Erwinia psidii*. Brasília. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, DF.

Rezende AMFA, Tomita CK, Uesugi CH (2008) Fungicidas cúpricos, cloretos de benzalcônio e composto bioativo líquido (Bokashi): fitotoxicidade e controle da seca dos ponteiros cauda por *Erwinia psidii* em goiabeiras. *Tropical Plant Pathology* 33: 288-294.

Ribeiro IJA, Sugimori MH, Rodrigues Neto J, Yamashiro T, Piza Júnior C de T, Prates HS, Frediani AJA (1985) A bacteriose da goiabeira. CATI. Instruções Práticas, 231. pp. 13.

Rodrigues Neto J, Robbs CF, Yamashiro T (1983) A bacteriose da goibeira (*Psidium guajava* L.) provocada por *Erwinia psidii* sp. nov. *Fitopatologia Brasileira* 8: 636.

Rodrigues Neto J, Robbs CF, Yamashiro TA (1987) A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. *Fitopatologia Brasileira* 12: 345-350.

Romeiro RS, Moraes RMA, Oliveira Jr., Couto FFA, Rezende ST (1994) Uma enfermidade de etiologia bacteriana no Estado de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* 18: 283.

Rozane DE, Oliveira DA, Lirio VS. Importância Econômica da cultura da goiabeira. [www.nutricaoeplantas.agr.br/.../Livrogoiaba.../13\\_importanciaeconomica.pdf](http://www.nutricaoeplantas.agr.br/.../Livrogoiaba.../13_importanciaeconomica.pdf). Acesso em Dezembro de 2010.

Sahin F, Abbasi PA, Ivey MLL, Zhang J, Miller SA (2003) Diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* from lettuce. *Phytopathology* 93: 64-70.

Seagri – Secretaria de agricultura, irrigação e reforma agrária da Bahia. Acesso em Janeiro de 2011. [http:// www.seagri.bahia.gov.br/goiaba.htm](http://www.seagri.bahia.gov.br/goiaba.htm).

SIAP. (2003). Avance de siembras y cosechas. Perennes 2003. Servicio de Informacion y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA, Mexico. [www.siea.sagarpa.gob.mx/indexavnc.html](http://www.siea.sagarpa.gob.mx/indexavnc.html)

Singh U, Trevors CM, de Boer SH, Janse JD (2000) Fimbrial specific monoclonal antibody- based ELISA for European potato strains of *Erwinia chrysanthemi* and comparison to PCR. *Plant Disease* 84: 443-448.

Siqueira KMS, Freitas VM, Almeida MRA, Dos Santos MFA (2009) Detecção de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e mamoeiro no estado de Goiás, usando marcadores moleculares. *Tropical Plant Pathology* 34: 256-260.

Subramanyam MD, Dinesh MR, Braganza M (1992). Varietal evaluation and floral biology studies in the genus *Psidium*. *Acta Horticulturae* 321: 211-219.

Tavares SCCH, Lima MF (2001) In: Goiaba: Fitossanidade. Frutas do Brasil. Embrapa Semi-Árido pp. 18.

Teixeira ACO, Ferreira MASV, Marques ASA (2008) Detecção de *Erwinia psidii* via enriquecimento em extrato de folhas de goiabeira e imunodifusão radial dupla. *Tropical Plant Pathology* 33: 212-218.

Teixeira ACO, Marques ASA, Ferreira MASV (2009) Low genetic diversity among pathogenic strains of *Erwinia psidii* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 678-684.

Toda Fruta – Goiaba. <http://www.todafruta.com.br>. Acesso em Novembro de 2010.

Tokeshi H, Valdebenito RM, Dias AS (1980) Ocorrência da bacteriose da goiabeira no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 6: 85-87.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2005) *Microbiologia*. 8ª Ed. Artmed.

Tozetto LJ, Ribeiro WRC (1993) Ocorrência de podridão dos frutos de goiabeira (*Psidium guajava*) causada por *Phyllosticta* sp. em Brasília, DF. *Fitopatologia Brasileira* 18: 160.

Trigalet A, Samson R, Coléno A (1978) Problems related to the use of serology in phytobacteriology. *Proceedings, 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Angers. 271-288.

Uesugi CH, Melo Filho P A, Paz-Lima ML, Moraes CA, Tomita CK, Café Filho AC, Ueno B (2001). Ocorrência de *Erwinia psidii* em goiabeira no Distrito Federal. Summa Phytopathologica 27: 118.

Yorinori MA, Ribas AF, Ueno B, Massola Jr NS, Leite Jr RP (2003) Detecção de *Xylella fastidiosa* em germoplasma de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 28: 427-430.

Zambão LC, Neto AMB (1998) Cultura da Goiaba, Boletim Técnico – CATI 236, Cap.1, pp. 01-03.

## Capítulo 2

---

### **Desenvolvimento e comparação de métodos moleculares para detecção e identificação de *Erwinia psidii***

## Desenvolvimento e comparação de métodos moleculares para detecção e identificação de *Erwinia psidii*

Claudênia F. Silva<sup>1</sup>, Priscila Torres<sup>1</sup>, Naiara P. D. Oliveira<sup>1</sup>, Abi S. A. Marques<sup>2</sup> & Marisa A. S. V. Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, 79919-970, Brasília, DF, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 70849-979, Brasília, DF, Brasil

Autor para correspondência: Marisa A.S.V Ferreira, e-mail: marisavf@unb.br

### RESUMO

*Erwinia psidii* é o agente causal da seca dos ponteiros da goiabeira (*Psidium guajava*) no Brasil, sendo uma das doenças mais importantes para a cultura no país. Essa bactéria afeta ramos e brotações das plantas, o que reduz significativamente a produtividade da cultura. As medidas de controle existentes são ineficientes e a disseminação do patógeno ocorre com frequência através de material propagativo assintomático. Considerando a necessidade de um método sensível para detecção do patógeno em mudas de goiabeira, os objetivos deste trabalho foram: desenvolver iniciadores específicos para a detecção de *E. psidii* por PCR, e comparar três métodos (IC-PCR, BIO-PCR e PCR convencional) com os iniciadores selecionados quanto ao seu potencial para detecção da bactéria em folhas de goiabeira. A sequência de 355 pb de um fragmento amplificado do gene da recombinase A (*recA*) do isolado tipo IBSBF 435 foi usado para desenhar os iniciadores que foram testados quanto à sua especificidade com DNA de 59 isolados de *E. psidii*, 20 isolados de outras bactérias fitopatogênicas, 17 isolados endofíticos/epifíticos de goiabeira, bem como com o DNA de folhas de goiabeira e de *Colletotrichum gloeosporioides*, fungo patogênico à goiabeira. A sensibilidade foi testada com DNA purificado e suspensões bacterianas. O par de iniciadores Ep 2L/2R detectou 0,000001 pg de DNA de *E. psidii* e até o limite de 10 ufc/mL. BIO-PCR e PCR convencional foram mais sensíveis e rápidos do que a IC-PCR. O limite de detecção em extratos de folhas misturado com suspensão bacteriana em diferentes concentrações foi de 10 e 10<sup>2</sup> ufc/mL, para BIO-PCR e PCR convencional, respectivamente. Os iniciadores aqui descritos poderão ser utilizados para o desenvolvimento de um protocolo prático para detecção precoce desse patógeno em plantas assintomáticas.

Palavras-chave: PCR, seca dos ponteiros, *Psidium guajava*, diagnose

### ABSTRACT

*Erwinia psidii* causes bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) in Brazil, which is one of the most important phytosanitary problems of this crop in the country. The bacterium affects branches and twigs of guava trees, causing dieback, thus reducing yield significantly. Control measures are not effective and pathogen dissemination often occurs through contaminated but asymptomatic propagating plant material. Considering the need for a reliable and sensitive method for detecting the pathogen in plant material, the objectives of this study were to design *E. psidii*-specific PCR primers and to compare three methods, IC-PCR, Bio-PCR and conventional PCR, with the selected primers and to evaluate their potential for detecting *E. psidii* in guava leaves. A 355 bp fragment of the recombinase A gene (*recA*) amplified from the type *E. psidii* strain IBSBF435 was

used for designing primers that were further tested for specificity with DNA from 59 *E. psidii* isolates, 20 isolates of other plant pathogenic bacteria, 17 isolates of epiphytic/endophytic bacteria from guava, as well as with DNA from guava leaves and DNA from *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic to guava. Sensitivity was tested with purified DNA and bacterial suspensions. Primer pair Ep2L/2R detected 0,000001 pg DNA and 10 cfu/mL and only amplified DNA from *E. psidii*. Bio-PCR and conventional PCR were more sensitive and less time-consuming than IC-PCR. The detection limit on extracts of macerated guava leaves mixed with bacterial suspensions at different concentrations were 10 and 10<sup>2</sup> cfu/ml for Bio-PCR and conventional PCR, respectively. The PCR primers here described would be useful for developing a practical PCR protocol for early detection of this pathogen in asymptomatic plants.

Keywords: PCR, bacterial disease of guava, *Psidium guajava*, diagnosis

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de goiaba (*Psidium guajava* L.), tendo como principais estados produtores São Paulo e Pernambuco (Pommer et al., 2006). Um dos fatores limitantes da cultura é a seca-dos-ponteiros da goiabeira. Esta doença é causada pela bactéria *Erwinia psidii* Rodrigues Neto et al. (1987), descrita pela primeira vez no Brasil com ocorrência em várias regiões dos estados de São Paulo, Paraná, Espírito Santo, Minas Gerais e no Distrito Federal (Junqueira et al., 2001). Além do Brasil, a bactéria também foi registrada na Argentina e Uruguai afetando o eucalipto (Coutinho et al., 2011).

A avaliação fitossanitária de mudas de goiabeira é geralmente baseada na análise subjetiva das plantas quanto à presença de sintomas da doença, tais como murcha dos ponteiros seguida de seca, amarelecimento e encharcamento do tecido foliar próximo às nervuras e por fim necrose e mumificação de flores e frutos imaturos (Rodrigues Neto et al., 1987; Coelho et al., 2002; Marques et al., 2007). Entretanto, a análise visual não garante a aquisição de mudas livres do patógeno. Mesmo aparentemente sadias, as mudas contaminadas apresentarão sintomas, aproximadamente, dois anos após sua instalação no pomar, tempo necessário para o início da frutificação (Gonzaga Neto et al., 2001). Por esse motivo há a necessidade de técnicas mais rápidas e eficientes para diagnose da doença em mudas de goiabeira assintomáticas (Marques et al., 2007; Teixeira et al., 2008).

Os métodos hoje disponíveis para diagnose e identificação da bactéria são baseados na análise visual de sintomas, testes nutricionais e sorológicos (Romeiro et al.,

2001; Mendes et al., 2002; Coelho et al., 2002; Teixeira et al., 2008) e testes de patogenicidade em planta hospedeira (Marques et al., 2007).

Diversas técnicas sorológicas são usadas na detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas (Singh et al., 2000; Lee et al., 2001; Carneiro Jr. et al., 2004), destacando-se ELISA (*Enzyme – linked immunosorbent assay*) e imunodifusão radial dupla (ID) (Alvarez & Marques, 2004; Ribeiro et al., 2005; Teixeira et al., 2008; Lopéz et al., 2009). Estes métodos permitem a identificação rápida, simples e precisa de microrganismos e tem como princípio o reconhecimento “antígeno – anticorpo”, ou seja, a união de macromoléculas (anticorpo) ao mesmo tipo de indutor de sua produção (antígeno) (Romeiro, 2001; Tortora et al., 2003; Carneiro Jr. et al., 2004; Madigan et al., 2008). Apesar da simplicidade e rapidez, imunoenaios apresentam algumas desvantagens como a não distinção entre células viáveis e não viáveis e por isso não identificam o real perigo de disseminação de determinado patógeno. Os limiares de detecção são elevados e amostras contendo alta concentração de contaminantes saprofíticos podem sofrer interferências devido à competição desses com o patógeno alvo (Saettler et al., 1989; Teixeira et al., 2008; Lopéz et al., 2009). Para *E. psidii*, antissoros policlonais específicos designados As 15.1 e As 14.1 foram desenvolvidos e usados em imunodifusão radial dupla (Mendes et al., 2002; Teixeira et al., 2008).

Métodos baseados na análise de ácidos nucleicos são sensíveis e específicos para a detecção de fitopatógenos (Vincelli & Tisserat, 2008). Comparada aos métodos tradicionais de detecção e identificação, a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) oferece muitas vantagens, principalmente por não necessitar de cultivo prévio do organismo em meio de cultura. Apresenta sensibilidade para detectar uma única molécula em uma mistura complexa (Weller et al., 2006; Lopez et al., 2009). A imunocaptura (IC-PCR) (Nolasco et al., 1993; Wetzel et al., 1992; dos Santos & Reis, 2004), consiste no uso de um antissoro específico (Khooodoo et al., 2005; Munford et al., 2006, Peckham et al., 2010) para concentrar as células-alvo antes da PCR (Louws et al., 1999). Segundo Xiao et al. (2007) a IC-PCR é 100 vezes mais sensível do que a PCR convencional.

Um método que favorece a diagnose preventiva, melhorando a sensibilidade na detecção de fitobactérias e evitando possíveis inibidores é a BIO-PCR (Schaad et al., 1995), a qual consiste em promover a multiplicação das células bacterianas presentes

numa amostra por incubação em meios de cultura antes da PCR (Randhawa et al., 2001; Song et al., 2004; Fatmi et al., 2005).

A caracterização molecular de isolados de *E. psidii* foi realizada por rep-PCR (PCR repetitiva) (Teixeira et al., 2009). Um total de 42 isolados da bactéria obtidos de goiabeiras com sintomas da seca dos ponteiros procedentes do Distrito Federal, São Paulo, Espírito Santo e Paraná, e coletados em épocas distintas, foram comparados. Observou-se que os isolados possuíam um alto grau de similaridade e baixo polimorfismo, mesmo entre aqueles coletados em locais e épocas diferentes. Adicionalmente, a análise do rep-PCR evidenciou um número considerável de possíveis sequências alvo que poderiam ser usadas no desenvolvimento de uma ferramenta molecular para detecção do patógeno. No entanto, os iniciadores desenvolvidos a partir da sequência de um fragmento ERIC geraram bandas inespecíficas, além do fragmento alvo. Assim, procurou-se uma estratégia alternativa para o desenvolvimento de iniciadores específicos para *E. psidii*.

O gene *recA*, que codifica a recombinase A, pode servir como marcador para a identificação de patógenos bacterianos (Ludwing & Schleifer, 1999). A recombinase A codifica uma proteína multifuncional envolvida na recombinação homóloga, reparo do DNA e na resposta SOS (Einsen, 1995). Waleron et al. (2002) relataram a diferenciação de espécies do gênero *Erwinia* com base na análise de restrição (PCR-RFLP) de um fragmento de 730 pb do gene *recA*. No entanto, apenas o isolado tipo de *E. psidii* (IBSBF 435) foi incluído nesse estudo. El Tassa & Duarte (2006) utilizaram também a sequência do gene *recA* para identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

Estudos preliminares com cerca de 50 isolados já caracterizados de *E. psidii*, procedentes do DF e de outros três estados brasileiros (SP, ES e PR), mostraram que o perfil de RFLP com a enzima *Alu I* do fragmento de 730 pb do gene *recA* foi idêntico entre os isolados, independente de sua origem geográfica (Torres et al., 2008).

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver iniciadores específicos para *E. psidii* com base nas sequências parciais do gene *recA*, testar a especificidade e

sensibilidade desses iniciadores, otimizar e comparar três métodos para detecção e identificação de *E. psidii* em folhas de goiabeira inoculadas artificialmente.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultivo e preservação dos isolados

Os 59 isolados de *E. psidii* utilizados neste trabalho foram obtidos da coleção de bactérias fitopatogênicas do Instituto Biológico (IBSBF), das coleções da Universidade de Brasília e do Laboratório de Quarentena Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Tabela 1). Os isolados foram recuperados em meio de cultura 523 (Kado e Heskett, 1970), cultivados por 48 horas a 30 °C em duplicatas. As culturas foram utilizadas para a extração de DNA e para nova preservação dos isolados.

Todos os isolados foram mantidos pelo método de preservação em água destilada estéril que consistiu na adição de uma alça de massa bacteriana cultivada por 48 horas em 1 mL de água destilada estéril em tubos Eppendorf de 1,5 mL autoclavados. Os tubos foram devidamente identificados e armazenados em câmara fria a 4 °C.

**Tabela 1-** Isolados de *Erwinia psidii* utilizados no presente estudo

Isolados	Origem	Ano de Coleta
IBSBF <sup>1</sup> 435 (isolado tipo)	São Paulo	1982
IBSBF 446	São Paulo	1982
IBSBF 452	Valinhos-SP	1983
IBSBF 453	Valinhos-SP	1983
IBSBF 454	Valinhos-SP	1983
IBSBF 493	Itariri-SP	1984
IBSBF 954	São Paulo	1992
IBSBF 1347	Brazlândia-DF	1997
IBSBF 1461	Urupês- SP	1999
IBSBF 1480	Santa Tereza-ES	2000
IBSBF 1523	Carlópolis-PR	2000
IBSBF 1574	São Paulo	2001
IBSBF 1575	Brazlândia-DF	2000
IBSBF 1576	Brazlândia-DF	2001
IBSBF 1577	Brazlândia-DF	2001
IBSBF 1578	Brazlândia-DF	2001
IBSBF 1579	Brazlândia-DF	2001
Emb <sup>2</sup> . A 18-7	Brazlândia-DF	2000
Emb. C 76.1; 081.3; 082.2	Brazlândia-DF	2002
Emb. C 133.1; 134.1	Brazlândia-DF	2002
Emb. C 142.2; 148.2; 150.1	Brazlândia-DF	2002
Emb. C 151.2; 153.1; 1576	Brazlândia-DF	2002
Emb. C 294.1; 294.2	Brazlândia-DF	2002
Emb. C 295.3; 296.1; 299.3	Brazlândia-DF	2002
Emb. C 338.2	Brazlândia-DF	2002
Emb. C 342.1; 343.2; 344.2; 345.2	Brazlândia-DF	2002
Emb. C 400.3; 421.2; 424.1	Brazlândia-DF	2002
Emb. C 432.1; 433.2; 434.2; 434.3	Brazlândia-DF	2002
Emb. C 435.2; 435.3; 436.3	Brazlândia-DF	2002
Emb. C 438.2; 439.3	Brazlândia-DF	2002
Emb. C 441.3; 442.1	Brazlândia-DF	2004
UnB <sup>3</sup> 1285; 1286; 1287; 1288; 1289; 1290	Brazlândia-DF	2005

<sup>1</sup> Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, <sup>2</sup> Coleção Bacteriológica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, <sup>3</sup> Coleção Bacteriológica do Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília.

## Extração de DNA

O DNA dos isolados de *E. psidii* foi extraído a partir de culturas de 48 horas em meio 523 (Kado & Heskett, 1970), utilizando-se o Kit Wizard® (Promega) segundo instruções do fabricante ou o protocolo descrito por Li & De Boer (1995).

Para extração do DNA das demais bactérias fitopatogênicas, endofíticas e epifíticas utilizou-se do protocolo descrito por Ausubel (1995), e para extração do DNA

das folhas de goiabeira e do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, seguiu-se o protocolo CTAB segundo Doyle & Doyle (1987) com algumas modificações, descritas em Ferreira & Grattapaglia (1998). As amostras foram ressuspensas em água destilada estéril para um volume final de 50 µL e armazenadas a -20 °C. A quantificação foi realizada através de eletroforese em gel com comparação com o marcador High Mass DNA (Promega®) e após a estimativa da concentração de DNA, foram feitas diluições para 10 ng/µL.

### **Amplificação do gene *recA***

Para a amplificação do gene *recA*, foram feitas reações para um volume final de 50 µL, usando 100 ng de DNA de *E. psidii*, tampão 1 X (50 mM de KCl, 10 mM Tris HCl), 1 µM do iniciador *recA* F (5´GGT AAA GGG TCT ATC ATG CG3´) e 1 µM do iniciador *recA* R (5´CCT TCA CCA TAC ATA ATT TGG A3´) (Waleron et al., 2002), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de cada um dos dNTPs, 1 U de *Taq* DNA polimerase e completou-se com água Milli-Q.

As amostras foram submetidas à desnaturação inicial de 95 °C durante 3 minutos, seguidos por 32 ciclos de 94 °C por 1 minuto. 47 °C por 1 minuto para anelamento dos iniciadores e 72 °C por 2 minutos para a extensão da nova fita e 72 °C por 5 minutos para extensão final em termociclador modelo PTC-100™ (MJ Research, Inc.). Após a PCR, os produtos da amplificação (5 µL adicionados a 1 µL de tampão de carregamento) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1 % preparado em tampão TBE 0,5 X. Os géis foram corados em brometo de etídeo a 0,5 µg/mL por 5 minutos, descorados em água destilada por 10 minutos, visualizados e fotodocumentados em sistema LPix, Loccus®.

### **Seqüenciamento parcial do *recA* e seleção de iniciadores**

Inicialmente, cada produto de amplificação do gene *recA* foi precipitado com 25 µL de acetato de sódio (7,5 M) e 125 µL de etanol absoluto, deixando-se a -20 °C por no mínimo 12 horas, seguida de centrifugação por 40 minutos a 14.000 rpm em câmara fria. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µL de etanol 70 % em cada tubo. Em seguida, centrifugou-se por 5 minutos a 5.000 rpm em temperatura ambiente. Novamente descartou-se o sobrenadante cuidadosamente, deixando os tubos

secarem em estufa a 37 °C por 1 hora. Decorrido esse período, o DNA foi ressuspendido em 15 µL de água Milli-Q estéril e mantido por 2 horas na geladeira.

Foram seqüenciados produtos de PCR de 20 isolados de *E. psidii* e para cada isolado foram preparadas duas reações para o seqüenciamento, cada uma correspondendo a cada uma das fitas do fragmento. Na primeira reação foram adicionados 5 µl do produto de PCR precipitado e 1 µl do iniciador *recA forward* (10 µM). Na segunda, 5 µl do produto de PCR precipitado e 1 µl do iniciador *recA reverse* (10 µM). Os produtos foram seqüenciados de acordo com o procedimento de marcação fluorescente (Dynamic ET Terminator, Amersham Biosciences). O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático MegaBace (Pharmacia Biotech), realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

### **Análise das sequencias, desenho e síntese dos oligonucleotídeos iniciadores**

As vinte sequencias geradas foram analisadas com o programa BLASTN (Altschul et al., 1990) e alinhadas pelo programa computacional BioEdit versão 7.0.9.0 (Hall, 1999). A partir dos alinhamentos obtidos foi realizada a síntese de iniciadores utilizando-se o programa *Primer 3* versão 0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000). Para a seleção dos iniciadores procurou-se localizá-los em regiões de divergência entre as sequências de *E. psidii* e as sequencias de outras espécies de *Erwinia* e de gêneros próximos presentes no GenBank: *E. mallotivora* (AY217064), *E. tracheiphila* (DQ859879), *E. persicina* (DQ859883), *Pectobacterium cypripedii* (DQ859876), *Pantoea agglomerans* (AY219007), *Pantoea stewartii* (AY219003). As sequencias selecionadas dos iniciadores foram enviadas para síntese comercial (IDT, Integrated DNA Technologies, Inc., Prodimol, Belo Horizonte, MG).

### **Especificidade dos iniciadores**

Foram selecionados quatro iniciadores, utilizados em três combinações: Ep 1R/1L, Ep2L/2R e Ep 2L/1R. Após a seleção dos pares de iniciadores candidatos, verificou-se a especificidade dos mesmos em ensaios de PCR com DNA purificado de

59 isolados de *E. psidii*, 20 bactérias fitopatogênicas (Tabela 2) e 17 isolados endofíticos e/ou epifíticos que foram isolados das folhas de goiabeira (Tabela 3).

**Tabela 2-** Bactérias fitopatogênicas utilizadas nos testes de especificidade dos iniciadores de PCR para *Erwinia psidii*

<b>Designação</b>	<b>Identificação</b>	<b>Origem</b>
UnB 1253	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Feijão
UnB 1151	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Tomate
UnB 1159	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	Mandioca
UnB 828	<i>Xanthomonas. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Couve
UnB 1079	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i>	Alface
MG 2006	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	Videira
IBSBF 2585	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>spondiae</i>	Cajá
IBSBF 2586	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	Manga
FAL	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	Maracujá
IBSBF 2579	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardii</i>	Caju
UnB 1273	<i>Ralstonia solanacerum</i>	Tomate
UnB 1138	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tomate
UnB 1142	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Tomate
UnB 1232	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Melão
UnB 336	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Acelga
UnB 1036	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Nabo
UnB 97	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i>	Alface
UnB 845	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i>	Alface
UnB 646.2	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Melão
UnB 1147	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Tomate

O isolamento das bactérias da flora da goiabeira foi realizado pela impressão abaxial e adaxial das folhas, e pela maceração das mesmas em água estéril seguida de plaqueamento em meio 523. Colônias com aspectos culturais distintos foram selecionadas, culturas puras foram estabelecidas e submetidas aos testes bioquímicos de

solubilidade em KOH, catalase e O/F, segundo os protocolos descritos em Mariano & Silveira (2005) (Tabela 3).

**Tabela 3-** Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos endofíticos e/ou epifíticos de folhas de goiabeira

Isolado	O/F <sup>a</sup>	KOH <sup>b</sup>	Catalase	Coloração da colônia
BG 1	-	+	+	Rosa
BG 2	+	+	+	Amarela
BG 3	+	+	+	Amarela
BG 4	+	+	+	Creme
BG 5	-	-	+	Amarela
BG 6	-	-	+	Branca
BG 7	-	-	-	Branca
BG 8	+	+	+	Laranja
BG 9	-	-	+	Branca
FV1	-	-	+	Rosa
FV3	-	-	-	Alaranjada
FV4	-	-	+	Branca
FV6	-	+	+	Alaranjada
FJ1	-	+	+	Amarela
HV1	-	+	+	Creme
HV2	+	+	+	Amarela
HV3	-	+	+	Amarela

<sup>a</sup> O/F- Teste de Hugh & Leifson, indica se o metabolismo da bactéria é fermentativo ou oxidativo, considerando positivo o isolado que conseguiu acidificar o meio em condições anaeróbias. <sup>b</sup> - Teste de solubilidade em KOH a 3%, sinal positivo indica lise da parede celular, que ocorre em Gram negativas. BG- Bactéria isolada de folhas de goiabeira. FV- Bactéria isolada de folha madura, FJ- Bactéria isolada de folha jovem, HV- Bactéria isolada de haste madura.

Os iniciadores também foram testados com o DNA purificado de um isolado de goiabeira de *C. gloeosporioides* e com DNA extraído de folhas de goiabeira da variedade Pedro Sato.

As reações de amplificação foram compostas por tampão 1X (50 mM de KCl, 10 mM Tris HCl), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador a ser testado, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase e 30 ng de DNA. O volume de água estéril foi ajustado para 25 µL de reação.

O programa utilizado para a amplificação foi composto pelas etapas de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguido por 32 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 64 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e 72 °C por 5 minutos no termociclador PT-100 (MJ Research. Inc.).

### **Sensibilidade dos iniciadores**

Com o objetivo de determinar o limiar de detecção dos dois pares de iniciadores Ep 2L/2R e Ep 2L/1R selecionados, utilizou-se DNA do isolado tipo IBSBF 435, que foi diluído em série de 10 a 10<sup>-6</sup> ng de DNA por reação

O mesmo teste foi repetido com suspensão de células obtida de uma cultura de 48 horas do isolado tipo de IBSBF 435, lavando-se a placa com 2 mL de água estéril. Ao lavado, adicionou-se 5 mL de água destilada estéril, obtendo-se uma suspensão turva denominada “suspensão-estoque”. A partir desta foi preparada uma suspensão calibrada em espectrofotômetro a 8 % de transmitância. Foram feitas diluições em série colocando 0.5 ml da suspensão em 4,5 mL água destilada estéril até 10 ufc/mL. Após as diluições, foram adicionadas a cada reação para amplificação, 3 µL de suspensão bacteriana.

### **Deteção de *E. psidii* por IC-PCR, PCR e BIO-PCR**

#### **IC – PCR**

Para os testes de IC-PCR, usou-se o antissoro policlonal As 14.1 produzido contra o isolado tipo IBSBF 435 de *E. psidii* (Mendes et al., 2002; Teixeira et al., 2008). Utilizou-se placas de polipropileno e diluições do antissoro A 14.1 a 1:200 em tampão de cobertura (carbonato de sódio 0,05 mol dm<sup>-3</sup>, pH 9,6). Em cada poço foram adicionados 100 µl do antissoro e incubou-se a 4 °C por 16 horas. Folhas jovens de goiabeira da variedade Pedro Sato foram coletadas, pesadas e acondicionadas em sacos plásticos onde foram maceradas com 2 mL de água destilada. Em seguida, lavou-se os poços 3 vezes com tampão PBST (Tampão fosfato salino com Tween 2 %) e adicionou-se 100 µL das suspensões da bactéria nas concentrações de 10<sup>8</sup> a 10 ufc/ml misturadas ao macerado das folhas de goiabeira. Incubou-se a 4 °C por 16 horas. Descartou-se a

suspensão e procedeu-se 3 lavagens com PBST, retirando-se o excesso de tampão com batidas vigorosas sobre papel toalha.

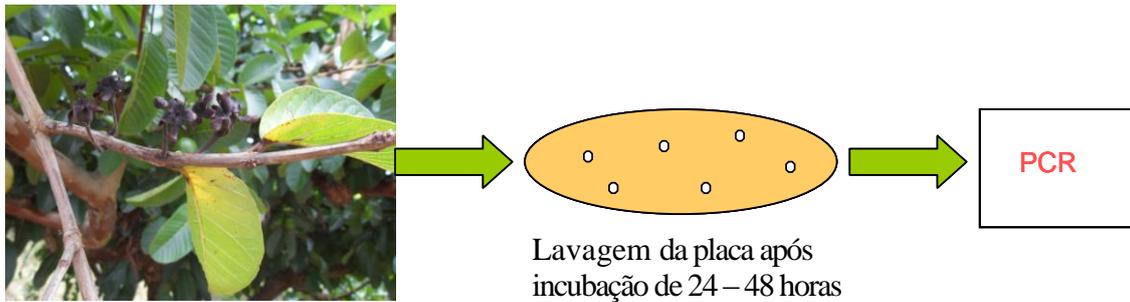
Após o procedimento, preparou-se as reações para amplificação utilizando os iniciadores Ep 2L/2R conforme descrito anteriormente e adicionou-se 25 µl de reação a cada poço. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (M J Research, Inc.) seguindo as condições já descritas anteriormente.

Como controles negativos foram usadas reações com água e reações acrescidas de extrato de folha de goiabeira macerada com 2 mL de água estéril. Para os controles positivos foram usados DNA purificado de *E. psidii* e suspensão de células a  $10^6$  ufc/mL do isolado tipo IBSBF 435.

## **BIO-PCR**

O método de BIO-PCR foi testado seguindo-se as etapas ilustradas na Figura 1. Preparou-se uma suspensão com 8% de transmitância a partir de uma cultura de 48 horas do isolado IBSBF 435 de *E. psidii*, seguindo-se de diluição seriada de  $10^8$  até 10 ufc/ml. Coletou-se cerca de 1 g de folhas jovens de goiabeira da variedade Pedro Sato, que foram lavadas em água destilada e secas com lenço de papel. As folhas foram separadas em sacos plásticos e a cada um deles foram adicionados 2 mL de suspensão nas diluições  $10^7$  a 10 ufc/mL. As folhas foram maceradas dentro do saco plástico e, em seguida, plaqueou-se 100 µl do extrato em meio 523, com três repetições para cada diluição (Figura 1).

Após incubação por 24 ou 48 horas, cada placa foi lavada com 2 ml de água estéril, obtendo-se uma suspensão concentrada. Da placa, retirou-se 1 ml que foi diluído em 9 ml de água estéril. Dessa diluição, foram retirados 3 µl para a PCR com os iniciadores Ep 2L/2R. Controles negativos, positivos e condições para PCR foram preparados conforme descrito anteriormente.



**Figura 1** – Etapas da Bio-PCR para detecção de *Erwinia psidii* em goiabeira: maceração do tecido afetado, plaqueamento em meio de cultura, diluição e PCR.

### PCR convencional

Folhas de goiabeiras da variedade Pedro Sato destacadas foram inoculadas com pulverizador com suspensão de  $10^6$  a  $10^7$  ufc/mL em água estéril de culturas de 24 horas do isolado IBSBF 435 e deixou-se secar por 4 horas a temperatura ambiente.

Para o método de lavagem das folhas, procedeu-se o corte das mesmas em pequenos fragmentos que foram colocados em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo de 5 mL de água destilada estéril, deixando-se por 1 hora a 200 rpm em agitador horizontal. Após agitação, o lavado foi centrifugado por 10 minutos a 13.200 rpm. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 250  $\mu$ L de tampão gelado do kit Pathoscreen® (Agdia), a base de sulfito de sódio, azida sódica, polivinilpirrolidona e albumina e realizou-se duas diluições 1:10 e 1:100. Procedeu-se PCR com iniciadores Ep 2L/2R adicionando-se 3  $\mu$ l de cada diluição na reação. Controles negativos, positivos e condições para PCR foram preparados conforme descrito anteriormente.

## RESULTADOS

### Sequenciamento parcial do gene *recA* e seleção de iniciadores

A partir da amplificação da região do gene *recA*, os produtos de PCR obtidos do DNA de vinte isolados diferentes foram seqüenciados. Dentro da região de 730 pb do gene *recA* foi escolhida uma região mais conservada de 355 pb para seleção de candidatos a oligonucleotídeos iniciadores específicos para *E. psidii*. As sequencias obtidas foram alinhadas em relação à sequencia referencia da estirpe tipo IBSBF 435.

Observou-se uma elevada identidade entre as sequencias, que foram, em seguida, comparadas às sequencias presentes no GenBank com identidade superior a 85 % em relação a *E. psidii*. A partir de regiões de máxima identidade entre as estirpes e de maior variabilidade entre as espécies e gêneros, foram selecionados dois pares de iniciadores candidatos para amplificação específica do DNA de *E. psidii*. Esses pares de iniciadores foram denominados: Ep 1L (5' AGGCGTTGGAAATCTGTGAC 3'), Ep 2L (3' CCAAAAAGCTTGGTGTGGATA 5'), Ep 1R (5' GAAGCAGTCCAATACCCTGC 3') e Ep 2R (3' AAATTGGTGACTCGCACATG 5') (Figura 2) com 20 nucleotídeos cada um e tamanhos de produtos esperados de 197 pb e 182 pb, respectivamente.

A PCR com o par de iniciadores Ep 2L/ Ep 2R produziu um fragmento único de aproximadamente 200 pb para todas os isolados testados de *E. psidii* (Tabela 1), independente de sua origem geográfica. No entanto, com o par de iniciadores Ep 1L/Ep 1R, não ocorreu amplificação do DNA de alguns dos isolados gerando rastros de fragmentos. Optou-se, portanto, por otimizar as condições da PCR, reduzindo a concentração de MgCl<sub>2</sub> pela metade (de 2,5 a 1,25 mM). Com esta alteração, houve amplificação de todos os isolados testados de *E. psidii*.

```

5'- CCAAAAAGCTTGGTGGTGGATATCGACAATCTGCTGTGTTACAGCCCGAT
ACGGGTGAGCAGGCGTTGGAAATCTGTGACGCACTGGCGCGTTCCGGTGCC
GTTGACGTGATTATTGTCGACTCCGTGGCCGCTCTGACACCAAAGCAGAAAT
TGAAGGGGAAATTGGTGACTCGCACATGGGCCTTGCGGCACGCATGATGAGC
CAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAACCTGAAGCAGTCCAATACCCTGCTGA
TTTTTATTAACCAAATTCGTATGAAAATCGGTGTGATGTTTGGTAACCCGGAAA
CCACCACCGGGGGGAATGCCCTGAAGTTTTACGCCTCTGTCCG -3'

```

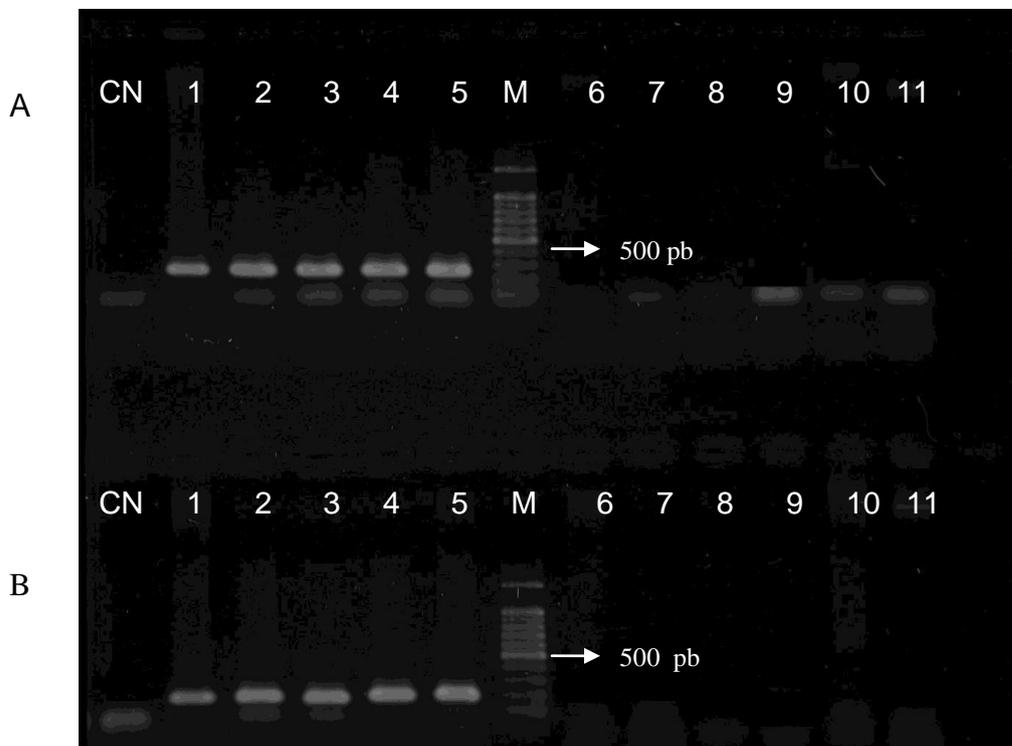
**Figura 2-** Sequencia de 355 pb do gene *recA* de *Erwinia psidii*. As sequencias destacadas representam os iniciadores selecionados: Sublinhado - Ep 2L, Negrito – Ep 1 L, Sublinhado – Ep 2 R, Negrito– Ep 1R, na respectiva ordem em que se encontra no quadro.

### Especificidade e sensibilidade dos iniciadores

Nos testes de especificidade, os iniciadores foram usados em três combinações (Ep 1L/Ep 1R, Ep 2L/ Ep 2R e Ep 2L/Ep 1R). Após otimizações das condições da PCR, amplificações não desejadas ainda ocorreram com o par de iniciadores Ep 1L/Ep 1R. Já

para as outras duas combinações de iniciadores, ocorreram apenas amplificações do DNA de *E. psidii*.

Com os resultados obtidos com os iniciadores Ep 2R/2L e Ep 2L/1R, deu-se continuidade ao estudo testando-se sua especificidade em reações com DNA de 20 bactérias fitopatogênicas, 17 bactérias endofíticas e/ou epifíticas, DNA de folhas de goiabeira e do fungo *C. gloeosporioides* isolado de goiabeira. Obteve-se apenas a amplificação dos isolados de *E. psidii* e nenhum produto foi detectado para as demais amostras de DNA (Figura 3). Quanto aos limiares de detecção, o par de iniciadores Ep 2L/2R mostrou-se 10 vezes mais sensível tanto com DNA purificado, quanto com suspensão de células bacterianas (Tabela 4).



**Figura 3** - Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos da PCR com os pares Ep 2L/1R (A) e Ep 2L/2R (B), com as seguintes amostras: CN-Control Negativo (água), 1 – 5: *Erwinia psidii*. 1-IBSBF 435, 2-IBSBF 1579, 3-IBSBF 1575, 4-Emb. B 81.3, 5-Emb. C 338.2, M-Marcador 100 pb DNA Ladder (Promega), 6 – 9: bactérias epifíticas e/ou endofíticas isoladas de goiabeira, 6-BG 6, 7-BG 1, 8- DNA de folha jovem de goiabeira, G, 9-*Colletotrichum gloeosporioides*, G, 10-*Pectobacterium carotovorum*, 11-*Xanthomonas campestris* pv. *vitians*.

**Tabela 4-** Sensibilidade dos iniciadores Ep 2L/2R e Ep 2L/1R testados com DNA purificado e suspensões bacterianas do isolado IBSBF 435 de *Erwinia psidii*

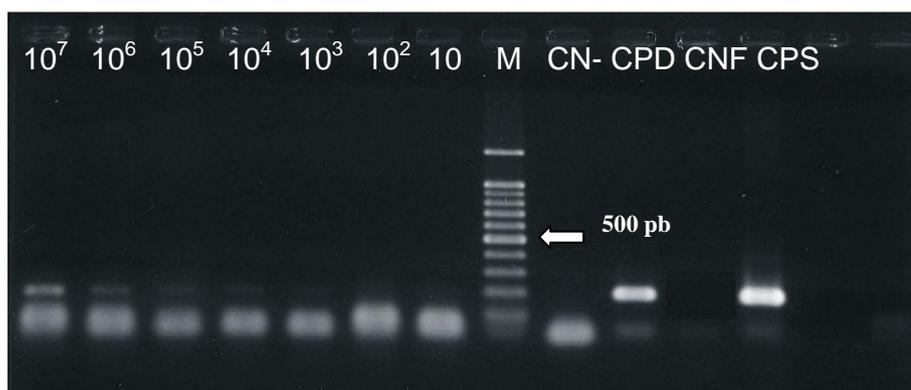
		Diluições							
		DNA (ηg)							
Iniciadores		10	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001
Ep 2L/2R		+	+	+	+	+	+	+	-
Ep 2L/1R		+	+	+	+	+	+	-	-
		Suspensão (ufc/mL)							
Iniciadores		10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10
Ep 2L/2R		+	+	+	+	+	+	+	+
Ep 2L/1R		+	+	+	+	+	+	+	-

(+): Amplificação visualizada em gel de agarose; (-): Ausência de amplificação em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

### Detecção de *E. psidii* por IC-PCR, PCR e BIO-PCR

#### IC-PCR

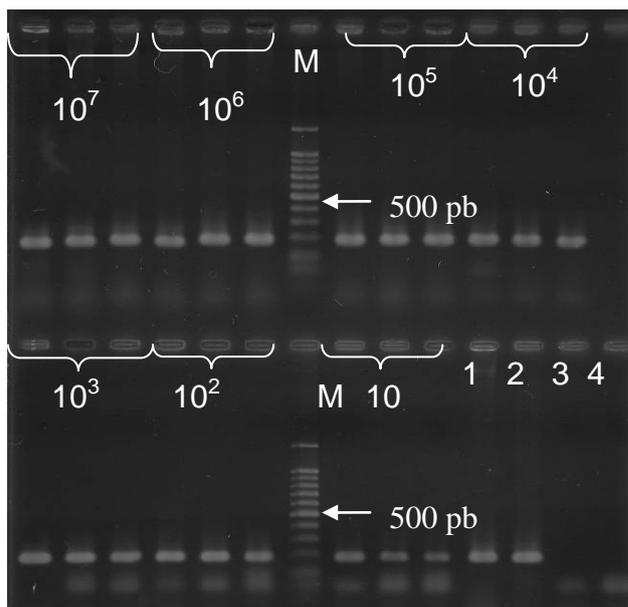
Através de imunocaptura-PCR com o antissoro As 14.1, com suspensões bacterianas variando de 10<sup>8</sup> a 10 ufc/mL e misturadas ao macerado das folhas de goiabeira e os iniciadores Ep 2L/2R, foi possível observar amplificação até a diluição a 10<sup>4</sup> ufc/mL da bactéria, embora na forma de uma banda de fraca intensidade, tanto nos ensaios somente com suspensão, quanto com suspensão adicionada aos macerados das folhas de goiabeira (Figura 4).



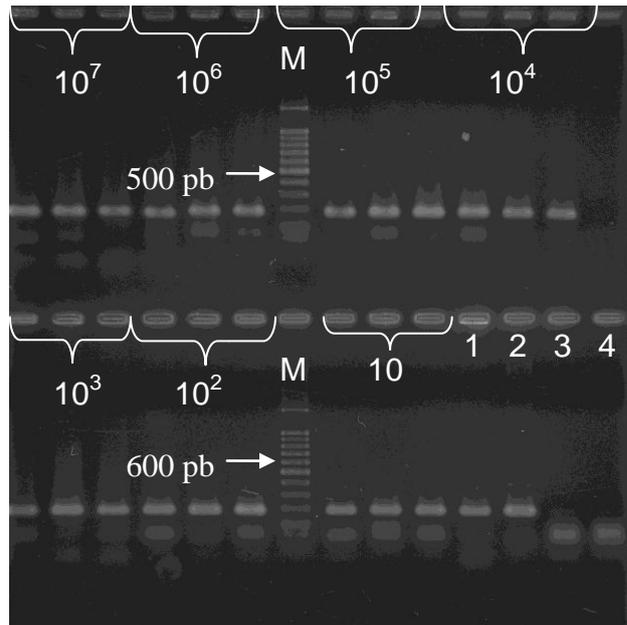
**Figura 4** - Eletroforese em gel de agarose a 1 % com produtos de IC-PCR a partir de suspensões de *Erwinia psidii* IBSBF 435 nas concentrações de 10<sup>7</sup> a 10 ufc/mL. Marcador de 100 pb DNA Ladder (Promega). CN-, controle negativo da PCR, reação livre de DNA, CPD, controle positivo com DNA de IBSBF 435, CNF, controle negativo com macerado de folhas sadias de goiabeira, CPS, controle positivo com suspensão 10<sup>6</sup> ufc/mL de cultura de IBSBF 435.

## BIO-PCR

Não houve diferença nos resultados das ampliações empregando-se 24 ou 48 horas de enriquecimento da população bacteriana em meio 523, indicando que o método pode ser realizado com 24 horas com sucesso, o que reduz o tempo envolvido. Com o par de iniciadores Ep 2L/2R, houve amplificação nas concentrações de  $10^7$  até  $10$  ufc/mL (Figuras 5 e 6).



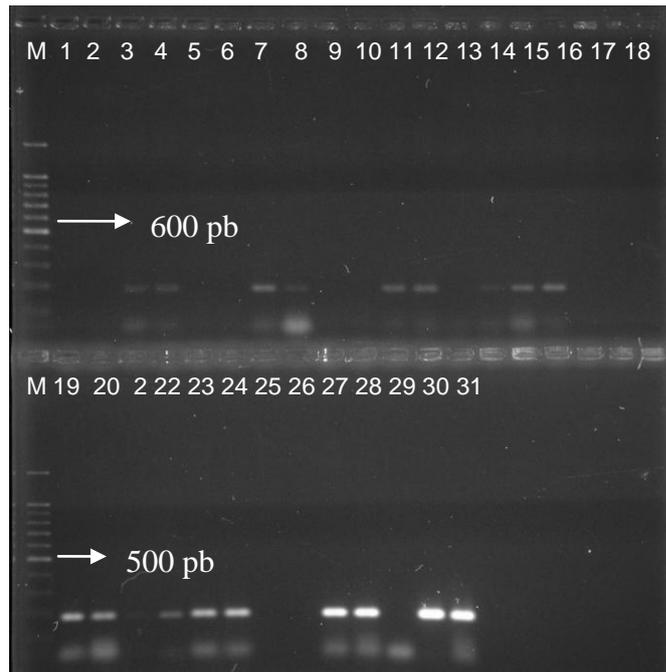
**Figura 5-** Eletroforese em gel de agarose a 1 % com os produtos da BIO-PCR a partir de suspensões de *Erwinia psidii* IBSBF 435 nas concentrações de  $10^7$  a  $10$  ufc/mL com incubação de 24 horas, e 3 repetições para cada diluição. Marcador de 100 pb DNA Ladder (Promega). 1 - suspensão bacteriana a  $10^6$  ufc/mL 2 - DNA purificado de IBSBF 435, 3 - controle negativo de folha de goiabeira macerada com água, 4 - controle negativo da PCR, livre de DNA.



**Figura 6-** Eletroforese em gel de agarose a 1 % com os produtos da BIO-PCR a partir de suspensões de *Erwinia psidii* IBSBF 435 nas concentrações de  $10^7$  a 10 ufc/mL com incubação de 48 horas, e 3 repetições para cada concentração. Marcador de 100 pb DNA Ladder (Promega). 1 - suspensão bacteriana a  $10^6$  ufc/mL 2 - DNA purificado de IBSBF 435, 3 - controle negativo de folha de goiabeira macerada com água, 4 - controle negativo da PCR, livre de DNA.

### PCR convencional

A amplificação foi positiva quando as folhas inoculadas foram picotadas e lavadas sob agitação. Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 250  $\mu$ L de tampão gelado, e diluído a 1:10 no mesmo tampão. Apenas com esse procedimento, foi possível amplificar DNA da bactéria com os iniciadores Ep 2L/2R nas concentrações de  $10^6$  até 10 ufc/mL (Figura 7).



**Figura 7-** Eletroforese em gel de agarose a 1 %, mostrando os produtos da PCR convencional com os iniciadores específicos Ep 2L/Ep 2R para *Erwinia psidii*. (A) 1 e 2 –  $10^1$  ufc/mL, 3 e 4 –  $10^2$  ufc/mL 1:10, 5 e 6 –  $10^2$  ufc/mL, 7 e 8 –  $10^2$  ufc/mL 1:10, 9 e 10 –  $10^3$  ufc/mL, 11 e 12 –  $10^3$  ufc/mL 1:10, 13 e 14 –  $10^4$  ufc/mL, 15 e 16 –  $10^4$  ufc/mL 1:10, 17 e 18 –  $10^5$  ufc/mL. (B) 19 e 20 –  $10^5$  ufc/mL 1:10, 21 e 22 –  $10^6$  ufc/mL, 23 e 24 –  $10^6$  ufc/mL 1:10. 25 e 26 – controle negativo de folha de goiabeira com água destilada, 27 e 28 – controle positivo de folha com suspensão bacteriana de *E. psidii* IBSBF 435a  $10^7$  ufc/mL, 29 – controle negativo da PCR, 30 e 31 – controles positivos de DNA de *E. psidii* IBSBF 435.

## DISCUSSÃO

PCR, no formato convencional ou em tempo real, tem sido utilizada com grande sucesso para identificação e detecção de bactérias fitopatogênicas de importância econômica tais como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Coletta-Filho et al., 2005), *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Trindade et al., 2007) e *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Adikini et al., 2011).

Diversas regiões genômicas têm sido usadas para o desenvolvimento de iniciadores específicos para fitobactérias, tais como genes plasmidiais ou localizados no cromossomo (Kabadjova-Hristova et al., 2006; Bereswill et al., 1992.). Muito comumente são utilizadas regiões intergênicas, que contêm maior variabilidade entre espécies, servindo assim para o desenho de iniciadores específicos (Adikini et al., 2011).

As sequências do gene *recA*, localizado no cromossomo bacteriano e aparentemente de cópia única (Morrison et al., 1999; Bork et al., 2001) têm sido usadas para diferenciação de espécies de *Erwinia* (Waleron et al., 2002) e para realocações de espécies dentro do gênero *Dickeya* (Parkinson et al., 2009). Em *Erwinia*, o polimorfismo existente nas sequências (SNPs) foi suficiente para distinção das 19 espécies do gênero. El Tassa & Duarte (2006) avaliaram um par de iniciadores selecionados de um fragmento do gene *recA* para identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, no entanto, mesmo sob diferentes temperaturas de anelamento, a especificidade desejada não foi alcançada.

No presente estudo, foram selecionados dois pares de iniciadores Ep 2L/2R e Ep 2L/1R, a partir da região *recA*. Ambos os pares mostraram-se específicos para *E. psidii*, porém, quanto à sensibilidade, o par Ep 2L/2R foi 10 vezes mais sensível tanto para DNA purificado, quanto para suspensão bacteriana. Obteve-se amplificação positiva com suspensão de células de *E. psidii* na concentração mais baixa testada (10 ufc/mL), indicando uma sensibilidade superior àquelas relatadas por outros autores para *E. amylovora* (Bereswill et al., 1992; Stoger et al., 2006).

Entre os três métodos comparados nesse estudo, a IC-PCR mostrou-se menos sensível que os métodos de BIO-PCR e PCR convencional em ensaios com folhas de goiabeira artificialmente inoculadas com suspensões de *E. psidii*. O antissoro As.14.1 foi testado com diferentes concentrações de células bacterianas, de  $10^6$  a 10 ufc/mL, mas a amplificação foi positiva somente com concentrações iguais ou superiores a  $10^4$  ufc/ $\mu$ L. Já no trabalho realizado por Khoodoo et al. (2005), a IC-PCR teve desempenho superior à PCR convencional, pois detectou-se a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* em 88,9 % das amostras com extrato de folhas de *Anthurium* sp., enquanto a PCR convencional detectou 47,2 % das amostras com infecções latentes, possivelmente devido aos compostos fenólicos inibidores presentes nas folhas de *Anthurium* sp. Folhas de goiabeira contêm muitos compostos fenólicos (Marinho et al., 2008) potencialmente inibidores da PCR. Os resultados preliminares com a PCR convencional foram negativos quando se usou extratos de folhas macerados em água, mesmo quando diluídos. O problema foi contornado somente quando se adotou o uso de tampão com antioxidantes e diluiu-se os extratos.

A BIO-PCR tem sido empregada para a detecção de bactérias fitopatogênicas tais como *E. amylovora* em macieiras (Vanneste et al., 2008), *Pantoea stewartii* em plantas de milho (Wensing et al., 2010), e *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* em sementes

de melão (Xiao et al. 2007). Neste último, demonstrou-se que a técnica foi aproximadamente 100 vezes mais sensível do que a PCR. Entre as vantagens da BIO-PCR estão a capacidade de detectar apenas células viáveis, e com isso gerar menos falsos positivos. No presente trabalho, o limiar de detecção da BIO-PCR foi até 10 ufc/mL em extrato de folhas de goiabeira, e com o menor tempo de enriquecimento de 24 horas. A principal desvantagem, contudo, é o próprio tempo de enriquecimento em meio de cultura e o maior número de passos no protocolo.

Os resultados sugerem, portanto, o potencial de uso da BIO-PCR para detecção de *E. psidii* em plantas assintomáticas, uma vez que é capaz de detectar populações reduzidas do patógeno. A aplicação de métodos de detecção molecular (como a BIO-PCR ou mesmo a PCR convencional) bem como do método de imunodifusão radial dupla desenvolvido por Teixeira et al. (2008), poderão ser utilizados pela Defesa Vegetal para a certificação de mudas de goiabeira em viveiros, contribuindo para a redução da disseminação da bactéria para áreas livres da doença e garantindo maior segurança ao produtor na instalação de novos pomares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adikini S, Tripathi L, Beed F, Tusiime G, Magembe EM, Kim DJ (2011) Development of a specific molecular tool for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *Plant Pathology* 1-10.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman J G, Smith J A, Struhl K (1995) *Short protocols in molecular biology*. 3<sup>rd</sup> Ed. John Wiley & Sons Inc.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.

Alvarez E, Marques ASA (2003) Caracterização molecular, sorológica e nutricional de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* provenientes de fumo, feijão e soja: desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico do fogo selvagem. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e desenvolvimento, 52.

Bereswill S, Pahl A, Bellemann P, Zeller W, Geider K. (1992) Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by PCR-analysis. Applied and Environment Microbiology 58 :3522–3526.

Bork JM, Cox MM, Inman RB (2001) The RecOR proteins modulate RecA protein function at 5' ends of single-stranded DNA. The EMBO Journal 20: 7313 – 7322.

Carneiro Junior JB, Silveira SF, Souza Filho GA, Olivares FL, Giglioti EA (2004) Especificidade de anti-soro policlonal a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Fitopatologia Brasileira 29: 614-619.

Coelho MVS, Mendes AP, Marques ASA (2002) Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico 59.

Coletta-Filho HD, Takita MA, de Souza AA, Neto JR, Destéfano SAL, Hartung JS, Machado MA (2005) Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. Journal of Applied Microbiology 100: 279-285.

Coutinho TA, Brady CL, van der Vaart M, Venter SN, Telecheae N, Rolfo M, Perez C, Wingfield MJ (2011) A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. Australian Plant Pathology 40: 55: 60.

Dos Santos CCR, Reis VM (2004) Desenvolvimento do método de Imunocaptura de bactérias para aplicação em solo argiloso. Seropédica Embrapa Agrobiologia Comunicado Técnico 64.

Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.

Einsen JA (1995) The *recA* protein as a model molecule for systematic studies of bacteria: Comparison of trees of *recA* and 16S rDNAs from the same species. Journal of Molecular Evolution 41: 1105-1123.

El Tassa SOM, Duarte V (2006) Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* através de PCR-RFLP do gene *recA*. Fitopatologia Brasileira 31: 23-28.

Fatmi M, Damsteegt VD, Schaad NW (2005) A combined agar-absortion and BIO-PCR assay for rapid, sensitive detection of *Xylella fastidiosa* in grape and citrus. Plant Pathology 54, 1-7.

Ferreira ME, Gratapaglia D (1995) Introdução ao uso de marcadores, RAPD e RFLP em análise genética. Embrapa Cenargen. pp. 123.

Gonzaga Neto L, Soares JM, Teixeira AHC, Moura MSB (2001) Goiaba: produção – aspectos técnicos. Embrapa Semi-árido, Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica. Frutas do Brasil 17.

Hall TA (1999) Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium 41: 95-98.

Junqueira NTV, Andrade LRM, Pereira M, Lima MM, Chaves RC (2001) Doenças da goiabeira no cerrado. Planaltina, Embrapa. pp.25. Circular Técnica 15.

Kabadjova-Histova P, Atanasova I, Dousset X, Moncheva P (2006) Multiplex PCR assay for identification of *Erwinia amylovora* – the causal agent of fire blight. Biotechnology & Biotechnological Equipment 20: 21-25.

Kado CE, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60: 969-976.

Khoodoo MHR, Sahin F, Fakim YJ (2005) Sensitive detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* on *Anthurium andreaeanum* by imunocapture-PCR (IC-PCR) using primers designed from sequence characterized amplified regions (SCARS) of the blight pathogen. European Journal of Plant Pathology 112: 379-390.

Lee IM, Lukaesko LA, Maroon CJM (2001) Comparison of Dig-labeled PCR, Nested PCR, and ELISA for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field-grown potatoes. *Plant Disease* 85: 261-266.

Li X, De Boer S (1995). Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Phytopathology* 85: 837-842.

López MM, Llop P, Olmos A, Marco-Noales E, Cambra M, Bertolini E (2009) Are Molecular Tools Solving the Challenges Posed by Detection of Plant Pathogenic Bacteria and Viruses? *Current Issues Molecular Biology* 11: 13-46.

Louws FJ, Rademaker JLW, De Bruijin FJ (1999) The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, Detection and Disease Diagnosis. *Annual Review Phytopathological* 37: 81-125.

Ludwig W, Schleifer KH (1999) Phylogeny of bacteria beyond the 16 rDNA standard. *ASM News* 65: 752-757.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2008) *Microbiologia de Brock*. Décima edição. Prentice Hall.

Mariano RLR, Silveira EB (2005) *Manual de práticas em fitobacteriologia*. 2ª Edição. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Marinho JS, Oliveira MGA, Guedes RNC, Pallini A, Oliveira CA (2008) Inibidores de proteases de hospedeiros nativos e exóticos e sua ação em intestinos de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea*. *Revista Árvore* 32: 1125 – 1132.

Marques ASA, Coelho MVS, Ferreira MASV, Damasceno JPS, Mendes AP, Vieira TM (2007) Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29: 488-493.

Mendes AP, Santos JP, Vieira TM, Coelho MVS, Marques ASA (2002) Produção e avaliação de antissoro policlonal contra *Erwinia psidii*, agente causal da seca dos ponteiros da goiabeira. *Fitopatologia Brasileira* 27: 64.

Morrison TB, Ma Y, Weis JH, Weis JJ (1999) Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*- Infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 987 – 992.

Munford R, Boonham N, Tomlinson J, Barker I (2006) Advances in molecular phytodiagnostics – new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology* 116: 1–19.

Nolasco G, DeBlas C, Torres V, Ponz F (1993) A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtitre plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods*, 45: 201–218.

Parkinson N, Stead D, Bew J, Heeney J, Lahkim LT, Elphistone J (2009) *Dickeya* species relatedness and clade structure determined by comparison *recA* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2388-2393.

Peckham GD, Kaneshiro WS, Luu V, Berestecky JM, Alvarez AM (2010) Specificity of monoclonal antibodies to strain of *Dickeya* sp. that cause bacterial rot of pineapple. *Hybridoma* 29: 383-389.

Pommer CV, Murakami KRN, Watlington F (2006) Goiaba no mundo. *O Agrônomo*, 58(1/2).

Randhawa PS, Pannu SS, Schaad NW (2001) Improved Bio-PCR for detection of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* in watermelon and cantaloupe seeds. *APS/MSA/SON*. 25-29.

Ribeiro RG, Melo LA, Santos JP, Mendes AP, Martins OM, Marques ASA (2005) Avaliação preliminar de técnicas sorológicas na detecção de *Erwinia psidii* em mudas de goiabeiras assintomáticas. *Fitopatologia Brasileira* 30: 57.

Rodrigues Neto J, Robbs CF, Yamashiro TA (1987) A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. Fitopatologia Brasileira 12: 345-350.

Romeiro RS (2001) Métodos em bacteriologia de plantas. Editora UFV. pp. 235.

Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer 3 on the WWW for general user and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Totowa NJ. Humana Press. pp 365-386. Disponível em: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

Saettler AW, Schaad NW, Roth DA (1989) Detection of bacteria in seed and other planting material. APS Press.

Sahin F, Abbasi PA, Ivey MLL, Zhang J, Miller SA (2003) Diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* from lettuce. Phytopathology, 93:64-70.

Schaad NW, Cheong SS, Tamaki S, Hatziloukas E, Panopoulos NJ (1995) A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. Phytopathology 85: 243-248.

Singh U, Trevors CM, de Boer SH, Janse JD (2000) Fimbrial specific monoclonal antibody-based ELISA for European potato strains of *Erwinia chrysanthemi* and comparison to PCR. Plant Disease 84: 443-448.

Song WY, Kim HM, Hwang CY, Schaad NW (2004) Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. Journal of Phytopathology 152: 667-676.

Stoger A, Schaffer J, Ruppitsch W (2006) A Rapid and Sensitive Method for Direct Detection of *Erwinia amylovora* in Symptomatic and Asymptomatic Plant Tissues by Polymerase Chain Reaction. Journal of Phytopathology 154: 469 – 473.

Teixeira ACO, Ferreira MASV, Marques ASA (2008) Detecção de *Erwinia psidii* via enriquecimento em extrato de folhas de goiabeira e imunodifusão radial dupla. Tropical Plant Pathology 33: 212-218.

Teixeira ACO, Marques ASA, Ferreira MASV (2009) Low genetic diversity among pathogenic strains of *Erwinia psidii* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 678-684.

Torres P, Marques ASA, Ferreira MASV (2008) Sequenciamento e análise das sequencias do gene da recombinase (*recA*) em *Erwinia psidii*. *Tropical Plant Pathology* 33: S 95.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2005) *Microbiologia*. 8ª Ed. Artmed.

Trindade LC, Marques E, Lopes DB, Ferreira MASV (2007) Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Summa Phytopathologica* 33: 16 – 23.

Vanneste JL, Yu J, Boyd RJ, Cornish DA (2008) Detection of *Erwinia amylovora* in symptomless apple plants by BIO-PCR and BIO-DUPLEX PCR. *Acta Hortifrut* 793:517-518

Vincelli P, Tisserat N (2008) Nucleic Acid-based Pathogen Detection in Applied Plant Pathology. *Plant Disease* 92: 5.

Xiao W, Le Z, Fu-Shou X, Li-Han Z, Guan-Lin X (2007) Immuno-capture PCR method for detecting *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from watermelon. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* 4: 173–179.

Waleron M, Waleron K, Podhajaska AJ, Lojkowska E (2002) Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology* 148: 583-595.

Walker GC (1984). Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiology Review* 48: 60-83.

Weller AS, Elphinstone JG, Parkinson N, Thwaites R (2006) Molecular diagnosis of plant pathogenic bacteria. *Arab Journal of plant protection* 24: 143 – 146.

Wensing A, Zimmermann S, Geider K (2010) Identification of the corn pathogen *Pantoea stewartii* by spectrometry of whole-cell extracts and its detection with novel PCR primers. *Applied and environmental microbiology* 76: 6248-6256.

Wetzel T, Candresse T, Macquaire G, Ravelonandro M, Dunez J (1992) A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* 39: 27–37.

## Capítulo 3

---

### Detecção molecular de *Erwinia psidii* em goiabeiras em casa-de-vegetação e campo

## Detecção molecular de *Erwinia psidii* em goiabeiras em casa-de-vegetação e campo

Claudênia F. Silva<sup>1</sup>, Abi S. A. Marques<sup>2</sup> & Marisa A. S. V. Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, 79919-970, Brasília, DF, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 70849-979, Brasília, DF, Brasil.

Autor para correspondência Marisa A. S. V. Ferreira; e-mail: marisavf@unb.br

### RESUMO

*Erwinia psidii* é o agente causal da seca dos ponteiros da goiabeira (*Psidium guajava*) no Brasil, sendo uma das doenças mais importantes para a cultura no país. Essa bactéria afeta ramos e brotações das plantas, o que reduz significativamente a produtividade da cultura. As medidas de controle existentes são ineficientes e a disseminação do patógeno ocorre com frequência através de material propagativo assintomático. Considerando a necessidade de um método para detecção do patógeno em mudas de goiabeira, foram desenhados iniciadores específicos para PCR (Ep 2L/2R) e testados anteriormente quanto à especificidade e sensibilidade. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar o uso desses iniciadores empregando-se BIO-PCR e PCR convencional para detecção de *E. psidii* em mudas inoculadas em casa de vegetação, e detectar o patógeno por PCR em plantas sintomáticas e assintomáticas de pomares do Distrito Federal. O isolado IBSBF 1576 foi inoculado (a  $10^7$  ufc/mL) em folhas jovens de goiabeira, que foram analisadas por PCR aos 0, 5, 10 e 15 dias após a inoculação. Os sintomas começaram a ser visualizados aos 5 dias e todas as amostras foram positivas para BIO-PCR e PCR convencional em todos os tempos amostrados. Em um segundo ensaio, 40 amostras foram coletadas de cada um dos três em pomares de goiabeiras visitados em Brazlândia, DF, sendo 20 amostras com sintomas e 20 assintomáticas. Amostras de brotações jovens foram testadas por BIO-PCR com os iniciadores específicos. Das 60 amostras sintomáticas, 58 foram positivas (96,7 %) enquanto apenas quatro (6,7 %) foram positivas entre as assintomáticas, demonstrando que o método pode ser aplicado para a detecção da bactéria nos estágios iniciais da infecção. Este método representa uma valiosa ferramenta para o monitoramento da sobrevivência e disseminação de *E. psidii* e de novos registros da doença em pomares.

Palavras-chave: BIO-PCR, PCR, seca-dos-ponteiros, diagnose

### ABSTRACT

*Erwinia psidii* causes bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) in Brazil, which is one of the most important phytosanitary problems of this crop in the country. The bacterium affects branches and twigs of guava trees, causing dieback, thus reducing yield significantly. Control measures are not effective and pathogen dissemination often occurs through contaminated but asymptomatic propagating plant material. Considering the need for a reliable and sensitive method for detecting the pathogen in plant material, *E. psidii*-specific PCR primers (Ep2L/Ep2R) have been designed and tested for specificity and sensitivity. The objectives of this work were to evaluate the use of these primers in Bio-PCR and conventional PCR assays to detect *E. psidii* in inoculated guava plants grown in a greenhouse and to detect the pathogen by PCR in symptomatic and asymptomatic trees from guava orchards in Brasília, DF. *E. psidii* strain IBSBF 1576

was inoculated ( $10^7$  cfu/mL) into young guava shoots and plant tissue was analyzed by PCR at 0, 5, 10, and 15 days after inoculation. Symptoms were recorded after 5 days and all inoculated shoots were PCR positive at all times, by both Bio-PCR and conventional PCR. In a second assay, forty samples were collected from each of three guava orchards, 20 showing symptoms and 20 asymptomatic. Samples were tested by Bio-PCR with the specific primers. PCR was positive for 58 out of 60 symptomatic samples (96.7%) and for 6.7% of asymptomatic samples, showing that the method can be used to detect the pathogen at early stages of infection. This specific PCR method represents also a valuable tool which can be used to monitor bacterial survival, dissemination and new disease outbreaks.

Keywords: BIO-PCR, PCR, bacterial disease of guava, diagnosis

## INTRODUÇÃO

A detecção precoce do agente causal de uma doença em plantas é uma etapa crucial no sistema de controle e proteção da agricultura. O emprego de medidas preventivas e de controle pode ser mais eficiente se for aplicado em estágios precoces do desenvolvimento da doença. O diagnóstico baseado em sintomatologia pode, muitas vezes, não ser confiável uma vez que a expressão dos sintomas pode apresentar variações. Diversas doenças são transmitidas por sementes ou por outros órgãos de propagação tais como tubérculos e explantes, e um método eficiente de controle é a liberação de material sadio (Rosato et al, 2002).

Técnicas moleculares e sorológicas têm se mostrado instrumentos valiosos na detecção precoce de patógenos em plantas, especialmente bactérias, pois oferecem maior rapidez, especificidade, sem a necessidade de isolamento do patógeno. Os métodos baseados no uso do DNA têm suplantado, em muitos aspectos, o uso das técnicas sorológicas ou imunológicas, principalmente no aspecto da sensibilidade (Lopes et al., 2005).

Os testes sorológicos, quando baseados em anticorpos monoclonais podem ser demasiadamente específicos, enquanto os policlonais podem apresentar reação cruzada com outras bactérias saprofíticas ou com outras espécies fitopatogênicas (Rosato et al., 2002). Dentre as técnicas moleculares adotadas na diagnose de doenças, pode-se citar a PCR (polymerase chain reaction) que, com o uso de iniciadores específicos, identifica o DNA-alvo em misturas complexas (Mumford et al., 2006).

Uma das limitações da cultura da goiaba (*Psidium guajava*) no Brasil é a seca dos ponteiros, causada pela bactéria *Erwinia psidii* (Rodrigues Neto et al., 1987). A

doença é caracterizada por murcha, enegrecimento e necrose de frutos, flores e partes jovens da planta, comprometendo assim sua produção. Esta doença foi descrita primeiramente no estado de São Paulo, em 1983. Atualmente é encontrada também nos estados do Paraná, Espírito Santo, Minas Gerais. No Distrito Federal é considerada uma das doenças mais importantes da cultura por causar grandes perdas e por sua fácil disseminação de planta para planta e entre pomares próximos (Coelho et al., 2002).

Com o avanço dos métodos de detecção e a necessidade de um método rápido e seguro para diagnose da doença em mudas, esse trabalho teve como objetivo a detecção temporal de *E. psidii* em mudas inoculadas de goiabeira por PCR e BIO-PCR e o emprego e validação da BIO-PCR na detecção da bactéria em pomares de goiabeiras no Distrito Federal.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Detecção temporal de *Erwinia psidii* em goiabeiras inoculadas em casa de vegetação**

#### **BIO-PCR**

Para a inoculação de *E. psidii*, foram utilizadas 20 mudas sadias de goiabeira da variedade Pedro Sato, com pelo menos 6 brotos cada, mantidas em casa de vegetação em vasos, sob temperaturas variando de 23 a 30 °C. O experimento foi realizado seguindo um delineamento experimental casualizado com quatro tratamentos e quatro plantas (sendo cada planta correspondendo a uma repetição) por tratamento, sendo três inoculadas e uma testemunha. Cada tratamento correspondeu aos tempos 0, 5, 10 e 15 dias após a inoculação.

As mudas foram inoculadas com uma suspensão a  $10^7$  ufc/mL do isolado IBSBF 1576 de *E. psidii*, cultivado em meio 523 por 24 horas a 29 °C. Este isolado foi escolhido para os ensaios por ser virulento, conforme ensaios preliminares, e por ter sido coletado em um pomar de Brazlândia, no DF, em 2001. A inoculação das mudas foi feita a partir de um pequeno ferimento na axila do primeiro par de folhas totalmente expandidas com o auxílio de agulha hipodérmica. Em seguida, foi depositada sobre o ferimento uma gota de uma suspensão bacteriana. Foram inoculados seis brotos em cada planta. Após a inoculação, os brotos inoculados foram cobertos com saco plástico e

permaneceram sob câmara úmida por 72 horas. As plantas mantidas como testemunhas foram pulverizadas com água destilada estéril.

A partir do tempo zero, coletou-se amostras de brotos de cada uma das três plantas inoculadas e da testemunha não inoculada, que foram submetidas aos métodos de BIO-PCR e PCR convencional.

O método de BIO-PCR foi realizado com os iniciadores Ep2L/2R, específicos para *E. psidii* (Capítulo 2) e consistiu em macerar em 2 mL de água destilada estéril os tecidos dos brotos em cadinhos estéreis e, desse macerado, alíquotas de 100 µL foram plaqueadas em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970), em triplicatas. Decorridas 24 horas, as placas foram lavadas com 2 mL de água destilada estéril, recuperando-se 1 mL dessa suspensão que, em seguida, foi diluída na proporção de 1:10. Dessa diluição, foram retirados 3 µL para amplificação por PCR. As reações de amplificação foram compostas por tampão 1X (50 mM de KCl, 10 mM Tris HCl), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador, Ep 2L (3' CCAAAAAGCTTGGTGTGGATA 5') e Ep 2R (3' AAATTGGTGACTCGCACATG 5') e, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase e 30 ng de DNA purificado de *E. psidii* IBSBF 435 (para o controle positivo). O volume de água destilada estéril foi ajustado para 25 µL de reação.

O programa utilizado para a amplificação foi composto pelas etapas de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguido por 32 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 64 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e 72 °C por 5 minutos no termociclador PT-100 (M J Research. Inc.). Foram utilizados como controles positivos uma suspensão bacteriana a 10<sup>6</sup> ufc/mL e DNA purificado de *E. psidii* e como controles negativos extrato de folhas de goiabeira sadia e reação livre de DNA da bactéria.

### **PCR Convencional**

Após a coleta dos tecidos dos brotos, procedeu-se o corte dos mesmos em pequenos fragmentos que foram colocados em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo de 5 mL de água destilada estéril, deixando-se por 1 hora a 200 rpm em agitador horizontal. Após agitação, o lavado foi centrifugado por 10 minutos a 13.200 rpm. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 250 µL de tampão gelado do kit Pathoscreen® (Agdia), a base de sulfito de sódio, azida sódica, polivinilpirrolidona e albumina e realizou-se duas diluições 1:10 e 1:100. Procedeu-se

PCR com iniciadores Ep 2L/2R adicionando-se 3 µL de cada diluição na reação. Controles negativos, positivos e condições para PCR foram preparados conforme descrito acima.

### **Deteção de *Erwinia psidii* por PCR em goiabeiras sintomáticas e assintomáticas de pomares do Distrito Federal.**

Foram escolhidas aleatoriamente três propriedades em Brazlândia, DF, com pomares de goiabeira da variedade Pedro Sato e com histórico de seca dos ponteiros. Entre janeiro e fevereiro de 2011, foram coletadas, em cada um dos pomares, 40 amostras sendo 20 constituídas de brotações sem sintomas aparentes e 20 de brotações com sintomas de murcha e enegrecimento dos brotos. Em alguns casos, devido à dificuldade de se encontrar plantas saudáveis, coletou-se brotações saudáveis de plantas doentes. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos em câmara fria (4°C) até o processamento por BIO-PCR, conforme o protocolo descrito acima.

## **RESULTADOS**

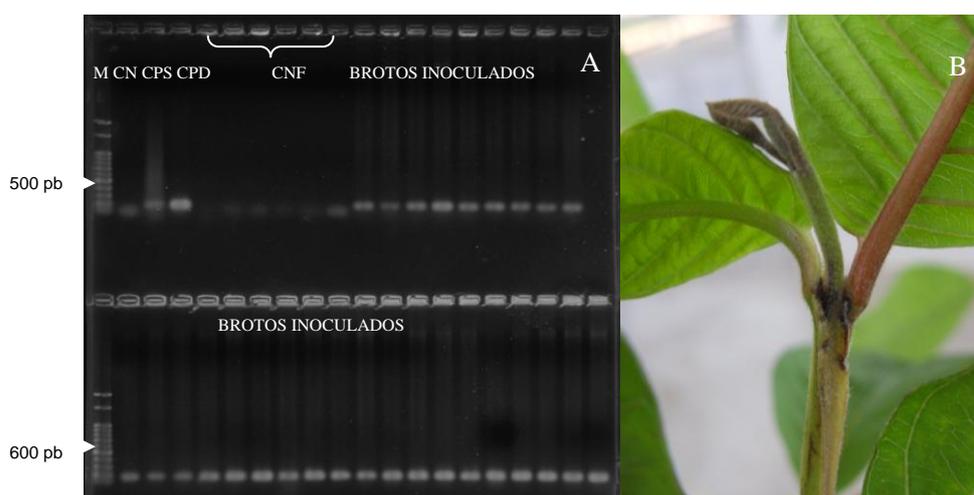
### **Deteção temporal de *Erwinia psidii* em goiabeiras inoculadas em casa de vegetação**

A partir do tempo zero, obteve-se amplificação positiva das amostras de todas as plantas inoculadas, tanto por PCR quanto pelo método de BIO-PCR (Tabela 1). A partir do quinto dia, sintomas de encharcamento e enegrecimentos das nervuras já podiam ser observados e tornaram-se bastante evidentes aos 10 dias (Figura 1B). Aos 15 dias, as plantas inoculadas exibiam sintomas de murcha e enegrecimento com início de necrose dos brotos. Todas as plantas inoculadas com água geraram resultado negativo para PCR e BIO-PCR (Figuras 1 e 2)

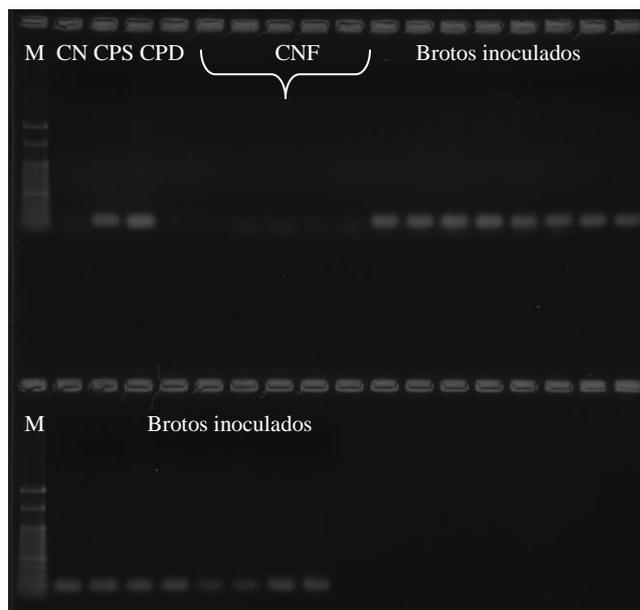
**Tabela 1-** Detecção de *Erwinia psidii* por PCR e BIO-PCR em mudas de goiabeira inoculadas em casa de vegetação em relação ao tempo e aparecimento de sintomas

Tempo (dias após inoculação)	Sintomas	PCR <sup>c</sup>	BIO-PCR
0	-	6/6	9/9
5	+ <sup>a</sup>	6/6	9/9
10	+	6/6	9/9
15	++ <sup>b</sup>	6/6	9/9

<sup>a</sup> sintoma de encharcamento e início de enegrecimento das nervuras; <sup>b</sup> sintoma de necrose dos brotos; <sup>c</sup> número de reações positivas em relação ao total de amostras. Para cada tempo, foram amostradas 3 plantas com reações em duplicata para PCR e em triplicatas para BIO-PCR.



**Figura 1** – A: Eletroforese em gel de agarose a 1 %, mostrando os produtos da BIO-PCR com iniciadores Ep2L/Ep2R, de plantas de goiabeira inoculadas com *Erwinia psidii* (IBSBF 1576), após 10 dias da inoculação, sendo: M-Marcador 100 pb (Promega), CN- Controle negativo da PCR, CPS- Controle positivo com suspensão de células bacterianas, CPD- Controle positivo com DNA purificado, CNF- Controle negativo de folhas inoculadas com água estéril. Cada amostra corresponde a uma planta inoculada, com três repetições de cada no gel. B: planta inoculada mostrando início de necrose na axila e murcha da brotação aos 10 dias da inoculação.



**Figura 2** – A: Eletroforese em gel de agarose a 1 %, mostrando os produtos da PCR convencional com iniciadores Ep2L/Ep2R, de plantas de goiabeira inoculadas com *Erwinia psidii* (IBSBF 1576), após 10 dias da inoculação, sendo: M-Marcador 100 pb (Promega), CN- Controle negativo da PCR, CPS- Controle positivo com suspensão de células bacterianas, CPD- Controle positivo com DNA purificado, CNF- Controle negativo de folhas inoculadas com água estéril. Cada amostra corresponde a uma planta inoculada, com duas repetições de cada no gel.

### **Deteção de *Erwinia psidii* por PCR em goiabeiras sintomáticas e assintomáticas de pomares do Distrito Federal.**

Os três pomares visitados na região de Brazlândia, DF, possuíam histórico de ocorrência da seca-dos-ponteiros (Tabela 2). Na primeira saída de campo, observou-se um pomar muito atacado, com plantas apresentando sintomas típicos de seca dos ponteiros e baixa incidência de plantas com brotações sadias. Das 40 amostras coletadas, detectou-se a presença de *E. psidii* por BIO-PCR em 18 das 20 amostras com sintomas, e em apenas três das amostras sem sintomas visíveis (Tabela 3).

No segundo pomar também se observou a maioria das plantas de goiabeira afetadas pela seca dos ponteiros. Do total de amostras coletadas com sintomas, confirmou-se a presença do patógeno em 100% delas por BIO-PCR. Entre as 20 amostras sem sintomas, apenas uma foi positiva.

O terceiro pomar visitado havia sido estabelecido há três anos, e já apresentava incidência da doença. Confirmou-se a presença da bactéria em 100% das amostras com

sintomas, mas em nenhuma das amostras sem sintomas (Figura 3, Tabela 3). Dentre as amostras com sintomas, nem todas foram positivas inicialmente (Figura 3C). Com essas amostras, realizou-se então uma nova diluição dos lavados, de 1:100, o que resultou em PCR positiva para todas.

**Tabela 2** – Informações referentes às propriedades escolhidas para validação do método de BIO-PCR para detecção de *Erwinia psidii* em goiabeiras

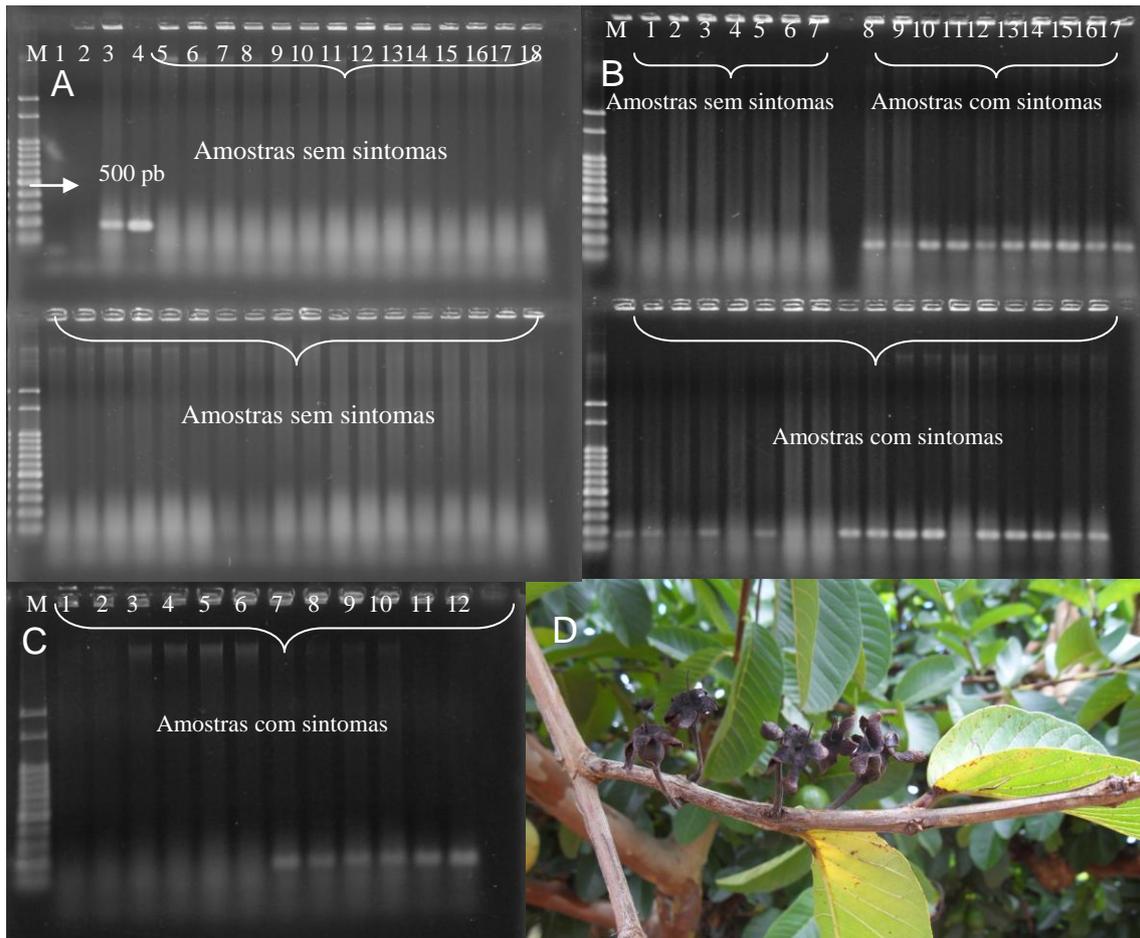
Área	Cultivar	Idade do Pomar	Última poda	Irrigação	Histórico da doença *
Pomar 1	Pedro Sato	13 anos	15/2/2011	aspersão	2004
Pomar 2	Pedro Sato	11 anos	17/2/2011	aspersão	2004
Pomar 3	Pedro Sato	3 anos	20/2/2011	aspersão	Recente

\*época da primeira constatação

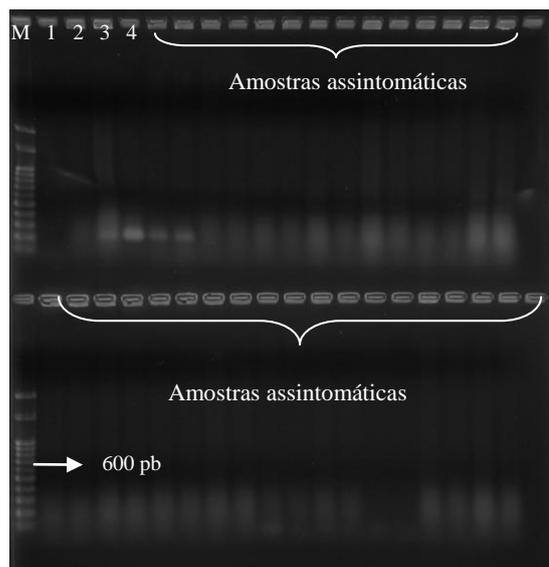
**Tabela 3** – Detecção de *Erwinia psidii* por BIO-PCR em pomares de goiabeira no Distrito Federal, 2011

	BIO-PCR	
	Com Sintomas	Sem Sintomas
Pomar 1	18 <sup>a</sup> /20 <sup>b</sup>	3/20
Pomar 2	20/20	1/20
Pomar 3	20/20	0/20
Total	58/60	4/60

Com sintomas – Amostras com sintomas de murcha e enegrecimento. Sem sintomas – Amostras sem sintomas visíveis. <sup>a</sup>- Número de amostras positivas para BIO-PCR. <sup>b</sup>- Número total de amostras coletadas e analisadas.



**Figura 3** – A, B e C - BIO-PCR para detecção de *Erwinia psidii* em pomares de goiabeiras no município de Brazlândia, DF, referente ao pomar 3. A) 1- controle negativo da PCR; 2- controle negativo com folhas saudias, 3- controle positivo de suspensão bacteriana do isolado IBSBF1576, 4- controle positivo de DNA desse isolado; 5 a 19: na parte superior e inferior, amostras dos brotos sem sintomas; B) e 1 a 7 em B: amostras de brotações sem sintomas 8 a 17 na parte superior e inferior, amostras de brotações coletadas com sintomas; C) 1-12: amostras de brotações coletadas com sintomas; D) Ramo com sintomas de necrose e mumificação nas brotações.



**Figura 4** - BIO-PCR para detecção de *Erwinia psidii* em pomares de goiabeiras no município de Brazlândia, DF, referente ao pomar 1. 1- controle negativo da PCR; 2- controle negativo com folhas de goiabeira saudáveis, 3- controle positivo de suspensão bacteriana do isolado IBSBF1576, 4- controle positivo de DNA desse isolado; na parte superior e inferior, amostras dos brotos sem sintomas.

## DISCUSSÃO

Frente à necessidade de métodos para detecção de patógenos que afetam a produtividade de fruteiras, em especial da cultura da goiaba, foi desenvolvido o método de BIO-PCR empregando-se iniciadores específicos para *E. psidii*.

Os ensaios realizados em casa de vegetação com mudas inoculadas mostraram o potencial de detecção de *E. psidii* nos primeiros estágios após infecção pelos dois métodos testados. A primeira coleta foi feita de 4-6 horas após a inoculação (tempo zero), já resultando em detecção positiva por PCR e BIO-PCR. Após 72 horas da inoculação, já se observava sintomas de encharcamento próximos ao sítio de inoculação. A detecção positiva em tecidos assintomáticos inoculados com suspensão a  $10^7$  ufc/mL era esperada, considerando-se a sensibilidade dos métodos já determinada anteriormente.

Após coletas realizadas em três pomares com histórico de ocorrência da seca dos ponteiros, pode-se comprovar a eficácia da BIO-PCR, na detecção de 96,7 % das amostras com sintomas e de 6,7 % das amostras sem sintomas. Do total de 60 amostras

com sintomas de seca, escurecimento e murcha nas brotações novas, duas foram negativas. Isto pode ser explicado pelo fato de que descolorações naturais da planta ou deformações de causas diversas podem ser confundidas com sintomas da bacteriose (Coelho et al., 2002). Marques et al. (2007) observaram uma correlação de 81,9% entre a presença de sintomas (detecção visual) e o diagnóstico laboratorial (isolamento da bactéria em meio de cultura). A correlação entre detecção visual e BIO-PCR foi, portanto, superior àquela observada por esses autores. Deve-se considerar também a possibilidade de escape em função da distribuição da bactéria no tecido ou por falhas no procedimento.

Do total das 60 amostras sem sintomas aparentes, apenas quatro resultaram em detecção positiva por BIO-PCR. Nesse caso, árvores amostradas estariam realmente livres da bactéria nos tecidos coletados, embora a bactéria pudesse estar presente na planta. Outra situação possível seria a população bacteriana presente estar abaixo do limite de detecção do método. Métodos mais sensíveis como PCR em tempo real (Weller et al., 2006) poderiam ser usadas para melhorar os níveis de detecção em plantas assintomáticas. Outra possibilidade é o uso de Nested-PCR (López et al., 2009) embora o tamanho da sequência alvo, de cerca de 200 pb, limite o desenho de iniciadores internos para sua aplicação. Uma outra possibilidade seria a da presença de inibidores não removidos na etapa de enriquecimento em meio de cultura, que impediriam a amplificação. Considerando os altos índices de detecção nas amostras com sintomas, isto seria pouco provável. Uma forma de assegurar que a reação tenha ocorrido na ausência de inibidores seria o uso de um controle interno tal como relatado por Midorikawa et al. (2008).

O método aqui descrito e validado em pomares do DF constitui-se uma ferramenta que poderá ser usada também para estudos epidemiológicos da doença, para determinar a longevidade de *E. psidii* em restos de cultura infectados e sua possível sobrevivência no solo ou mesmo associada a plantas hospedeiras alternativas ainda não conhecidas e sua translocação em plantas de goiabeira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Coelho MVS, Mendes AP, Marques ASA (2002) Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico 59.

Kado CE, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.

Lopes CA, Quezado-Duval AM (2005) Doenças bacterianas. In: Lopes CA, Ávila AC (2005) Doenças do Tomateiro. Brasília: Embrapa Hortaliças pp.55.

López MM, Llop P, Olmos A, Marco-Noales E, Cambra M, Bertolini E (2009) Are Molecular Tools Solving the Challenges Posed by Detection of Plant Pathogenic Bacteria and Viruses? *Current Issues Molecular Biology* 11: 13-46.

Marques ASA, Coelho MVS, Ferreira MASV, Damasceno JPS, Mendes AP, Vieira TM (2007) Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29: 488-493.

Midorikawa GEO, Pinheiro MRR, Vidigal BS, Arruda MC, Costa FF, Pappas Jr GJ, Ribeiro SG, Freire F, Miller RNG (2008) Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. *Letters in Applied Microbiology* 47: 12 – 18.

Mumford R, Boonham N, Tomlinson J, Barker I (2006) Advances in molecular phytodiagnostics – new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology* 116: 1 – 19.

Rodrigues Neto J, Robbs CF, Yamashiro TA (1987) A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. *Fitopatologia Brasileira* 12: 345-350.

Rosato YB, Gonçalves ER, Tahara ST, Metha A (2002) Diagnóstico molecular de doenças em plantas: detecção de fitopatógenos bacterianos. In: Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL (2002) *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Editora EDUCS.

Weller AS, Elphinstone JG, Parkinson N, Thwaites R (2006) Molecular diagnosis of plant pathogenic bacteria. *Arab Journal of plant protection* 24: 143 – 146.

## ANEXOS

### **Meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970)**

Sacarose 10 g  
Extrato de levedura 4 g  
Caseína ácida hidrolisada 8 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anidro) 2g  
MgSO<sub>4</sub> 0.3 g  
Agar 17, 0 g  
Completar com água destilada para 1000 mL

### **Tampão de cobertura para ELISA**

Carbonato de sódio 0,05 mol dm<sup>-3</sup>, ph 9,6

### **Tampão PBST (1X)**

Dissolver em 1000 mL de água destilada:  
Cloreto de Sódio 8.0 g  
Fosfato de Sódio dibásico (anidro) 1.15 g  
Fosfato potássio monobásico (anidro) 0.2 g  
Cloreto de potássio 0.2 g  
Tween-20 0.5 g  
Ajustar o pH para 7.4

### **Tampão geral de extração (GEB 1X)**

Dissolver em 1000 mL de 1X PBST:  
Sulfito de sódio (anidro) 1.3 g  
Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000 20.0 g  
Azida sódica 0.2 g  
Powdered egg (chicken) albumin, Grade II 2.0 g  
Tween-20 20.0 g  
Ajustar o pH para 7.4.  
Armazenar a 4°C.

## PROTOCOLO PARA DETECÇÃO DE *ERWINIA PSIDII* EM GOIABEIRA POR BIO-PCR

1. Coletar folhas/brotos com ou sem sintomas e pesar aproximadamente 1 g do tecido vegetal.
2. Macerar o tecido em água destilada (2 mL para 1 g de tecido).
3. Plaquear 100 µL do macerado em meio 523 e incubar a 29 °C por 24 horas.
4. Lavar a placa adicionando 2 mL de água destilada estéril e juntar o conteúdo em um canto da placa com auxílio de alça de Drigalsky.
5. Retirar 1 mL desse lavado e colocar em microtubos Eppendorf.
6. Fazer uma diluição de 1:10 em água destilada estéril. Dessa diluição, retirar 3 µL para a PCR.
7. Realizar a PCR com os iniciadores Ep 2L (3' CCAAAAAGCTTGGTGTGGATA 5') e Ep 2R (3' AAATTGGTGA CTGCACATG 5') e com os seguintes componentes: tampão 1X (50 mM de KCl, 10 mM Tris HCl), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase e 3 µL do lavado da placa. O volume de água destilada estéril deve ser ajustado para 25 µL de reação.
8. Incluir como controles positivos: suspensão bacteriana de cultura pura de *Erwinia psidii* e DNA purificado de um isolado de *E. psidii*.
9. Incluir como controles negativos: reação livre de DNA e macerado de folha sadia de goiabeira.
10. Utilizar programa composto pelas etapas de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguido por 32 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 64 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e 72 °C por 5 minutos.
11. Preparar gel de agarose a 1% em cuba para eletroforese e proceder a corrida a 90 V em TBE 0,5 X por 1 hora.
12. Analisar 10-12 µL da reação misturada ao tampão de carregamento (3 µL) e aplicar um marcador adequado (p. ex. 100 bp DNA ladder).
13. Após corrida, corar o gel com brometo de etídeo (1 µg/mL), visualizar em transluminador e fotodocumentar.
14. Considerar positiva a amostra que gerar um fragmento de aproximadamente 200 pb.