



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**MONITORAMENTO DA COLONIZAÇÃO DE MUDAS DE  
GOIABEIRA PELA BACTÉRIA *ERWINIA PSIDII* POR MEIO DE  
BIO-PCR**

**DIRCEU MACAGNAN**

**Brasília, DF**  
**Dezembro de 2015**

DIRCEU MACAGNAN

**MONITORAMENTO DA COLONIZAÇÃO DE MUDAS DE  
GOIABEIRA PELA BACTÉRIA *ERWINIA PSIDII* POR MEIO DE  
BIO-PCR**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – UnB como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dra. MARISA ÁLVARES DA SILVA VELLOSO FERREIRA

**Brasília, DF  
Dezembro de 2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

MACAGNAN, Dirceu

“MONITORAMENTO DA COLONIZAÇÃO DE MUDAS DE GOIABEIRA PELA BACTÉRIA *ERWINIA PSIDII* POR MEIO DE BIO-PCR”. Orientação: Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira, Brasília, 2015. 17 páginas

Monografia de Graduação (G) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

1. *Psidium guajava* 2. Fitopatologia 3. Doença 4. Detecção 5. Seca dos ponteiros da Goiabeira  
I. Ferreira, M.A.S.V.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

**Macagnan, D.** MONITORAMENTO DA COLONIZAÇÃO DE MUDAS DE GOIABEIRA PELA BACTÉRIA *ERWINIA PSIDII* POR MEIO DE BIO-PCR. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015 17 páginas. Monografia.

## CESSÃO DE DIREITOS:

**Nome do autor: DIRCEU MACAGNAN**

**Título da monografia de conclusão de curso: MONITORAMENTO DA COLONIZAÇÃO DE MUDAS DE GOIABEIRA PELA BACTÉRIA *ERWINIA PSIDII* POR MEIO DE BIO-PCR**

Grau: 3º      Ano 2015

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia de graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte dessa monografia de graduação pode ser reproduzida sem autorização do autor.

DIRCEU MACAGNAN

CPF: 01599064901

Rua 8 chácara 332 lote 2/4 Ed. Maria Airosa Apartamento 103 – SHVP

CEP 72.007-125

(61) 8160 6297 e-mail: dirceu.macagnan@yahoo.com.br

DIRCEU MACAGNAN

**MONITORAMENTO DA COLONIZAÇÃO DE MUDAS DE  
GOIABEIRA PELA BACTÉRIA *ERWINIA PSIDII* POR MEIO DE  
BIO-PCR**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e  
Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – UnB  
como parte das exigências do curso de Graduação em  
Agronomia, para a obtenção do título de Engenheiro  
Agrônomo

Orientador: Prof. Dra. MARISA ÁLVARES DA SILVA  
VELLOSO FERREIRA

BANCA EXAMINADORA:

---

Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira  
Doutora, Universidade de Brasília – UnB  
Orientadora / email: marisavf@unb.br

---

Abi Soares dos Anjos Marques  
Doutora, Embrapa Quarentena Vegetal  
Examinadora

---

Helson Mário Martins do Vale  
Doutor, Universidade de Brasília - UnB  
Examinador

*Dedico este trabalho ao meu filho Giuseppe que tantas vezes esperou o papai chegar em casa “...ainda de dia...” ao longo dos últimos 4 anos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha esposa Zuleide pela paciência ao longo do curso afinal, foram várias noites chegando tarde e alguns finais de semana que “não tô prá ninguém”! sem falar em sua preciosíssima ajuda na coleta das amostras do ensaio;

À professora Marisa Ferreira pela pronta disponibilidade, desde nossa primeira conversa, até a conclusão do trabalho. Especialmente a sua boa vontade em colaborar com um “velho iniciante”;

Agradeço à UnB pela oportunidade de realização do curso e aos ótimos professores que conheci ao longo deste;

Ao professor Márcio Pires (FAV/UnB) pela preciosa ajuda na coleta dos frutos de goiabeira para a obtenção das sementes usadas para a produção das mudas que possibilitaram a execução dos ensaios;

Aos servidores da Estação Experimental de Biologia para pronta disponibilidade às minhas solicitações e condução do material vegetal;

Aos meus alunos, especialmente aqueles com idade para serem meus pais, por me mostrarem que é sempre tempo de recomeçar.

# MONITORAMENTO DA COLONIZAÇÃO DE MUDAS DE GOIABEIRA PELA BACTÉRIA *ERWINIA PSIDII* POR MEIO DE BIO-PCR

## SUMÁRIO

RESUMO .....	1
INTRODUÇÃO .....	2
MATERIAL E MÉTODOS .....	4
Material vegetal.....	4
Isolados de <i>E. psidii</i> , origem, cultivo, inoculação e avaliação da severidade dos sintomas..	4
Seleção dos isolados e do material vegetal .....	5
Detecção da movimentação dos isolados no interior de hastes de plantas por meio de BIO-PCR .....	5
Análise dos dados.....	6
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	6
Seleção dos isolados e do material vegetal .....	6
Colonização da haste do hospedeiro pelo patógeno a partir do ponto de inoculação.....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15

MACAGNAN, DIRCEU. **Monitoramento da colonização de mudas de goiabeira pela bactéria *Erwinia psidii* por meio de BIO-PCR.** 2015. Monografia (Bacharelado em Agronomia) Universidade de Brasília – UnB.

## RESUMO

A seca dos ponteiros da goiabeira é um dos principais problemas sanitários da cultura no DF. A doença é causada pela bactéria *Erwinia psidii* e as alternativas para o controle efetivo dessa doença são limitadas. Pouco se conhece sobre a interação patógeno/hospedeiro, especialmente nas questões relativas à movimentação da bactéria no interior da planta. Este trabalho teve por objetivo estudar a colonização de mudas de goiabeira de duas variedades pela bactéria por meio de inoculação e posterior detecção por BIO-PCR. Três isolados, IBSBF 435, IBSBF 1579 e IBSBF 493, foram inoculados em mudas das variedades Pedro Sato, Kumagai e Sassaoka. A severidade dos sintomas foi avaliada aos 23 e 27 dias após a inoculação, por meio de escala de notas. O cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença, a análise de variância e o teste de médias foram usados para selecionar isolado e variedades para o experimento de colonização posterior. Foram selecionadas as variedades Pedro Sato e Kumagai e o isolado tipo IBSBF 435. A inoculação foi feita pela deposição de suspensão bacteriana seguida de punção com agulha até a profundidade de 1/3 da haste na axila do primeiro par de folhos completamente expandido. Foram coletadas amostras após 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias depois da inoculação. Avaliou-se a severidade da doença no terço superior da planta e, em seguida, foram retirados fragmentos de 2 mm de comprimento transversais à haste, a cada 1 cm, acima e baixo do ponto de inoculação. Estes fragmentos, foram macerados em água esterilizada e o extrato semeado em meio de cultura 523 sólido. Depois de 24 h, todo o crescimento microbiano foi suspenso em água destilada esterilizada e congelado a -20 °C até a realização da análise. A presença do patógeno nos tecidos foi determinada por PCR com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos para *E. psidii* e posterior eletroforese dos produtos da reação em gel de agarose. Verificou-se que o patógeno movimentou-se acima e abaixo do ponto de inoculação na mesma magnitude. Da mesma forma, a extensão da colonização pelo patógeno nas duas variedades não diferiu significativamente. Os dados de extensão da colonização e de severidade da doença foram submetidos a análise de correlação sendo esta positiva para a variedade Pedro Sato e não havendo correlação entre movimento do patógeno e severidade na variedade Kumagai. A diferença na severidade da doença observada entre as duas variedades, não pode ser correlacionada com a distância percorrida pela bactéria na planta a partir do ponto de inoculação.

Palavras-chave: *Psidium guajava*; Fitopatologia; Detecção; Seca dos ponteiros da goiabeira.

## INTRODUÇÃO

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma planta da família Myrtaceae, e tem a região tropical da América como seu centro de origem (Pommer *et al.*, 2006). Seus frutos podem ser consumidos *in natura* ou destinados à indústria, para a produção de doces (compota, creme, geléia, goiabada de corte) e polpa para posterior consumo na forma de suco ou sorvetes (Pommer *et al.*, 2006). A concentração de vitamina C pode ser até 5,6 vezes maior que a laranja, normalmente usada como referência. As goiabas de coloração vermelha são ricas em licopeno, substância com ação antioxidante que atua na prevenção do câncer de próstata e doenças cardiovasculares (Oliveira *et al.*, 2011).

O Brasil é o terceiro colocado na produção mundial de goiaba (Pommer *et al.*, 2006). Em 2012, a área plantada foi de 15,2 mil hectares com uma produção de 345,3 mil toneladas e uma produtividade de 22,763 toneladas/hectare (IBGE, 2012). O DF contribui com 290 hectares de área plantada com uma produtividade de 33,48 toneladas/hectare (SEBRAE, 2010).

A seca dos ponteiros da goiabeira, causada por *Erwinia psidii* Rodrigues Neto, Robbs e Yamashiro foi observada pela primeira vez em 1982 nos municípios paulistas de Valinhos e Pindamonhangaba e o patógeno descrito como espécie nova em 1987 (Rodrigues Neto *et al.*, 1987). Atualmente está presente nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Espírito Santo e no Distrito Federal onde constitui-se um dos mais sérios problemas sanitários dessa cultura (Marques *et al.*, 2007). Os sintomas são observados em tecidos jovens da planta como os ramos e frutos em desenvolvimento. Nesses tecidos são inicialmente observadas regiões com aspecto encharcado que evoluem para a necrose do tecido. O desenvolvimento da planta é comprometido pela morte dos lançamentos vegetativos, assim como a produção de frutos pois esses tornam-se necrosados e mumificados (Coelho *et al.*, 2002).

*E. psidii* é um patógeno restrito às américas e até 2011 era registrado somente no Brasil, até ser assinalado no Uruguai e na Argentina causando da morte dos ponteiros e necrose de folhagens jovens em plantas de eucalipto (Coutinho *et al.*, 2011). Posteriormente, a seca dos ponteiros do eucalipto também foi assinalada no Brasil (Arriel *et al.*, 2014).

Não há medidas efetivas de controle da doença seja pela ausência de variedades resistentes assim como de produtos fitossanitários eficientes (Rezende *et al.*, 2008). As medidas de controle mais eficientes dessa doença são aquelas que evitam a introdução do patógeno a qual ocorre, geralmente, pelo plantio de mudas contaminadas (Marques *et al.*, 2007). Com o objetivo de desenvolver metodologia que permitem a avaliação do estado

sanitário das mudas Teixeira *et al.* (2008) desenvolveram um método de detecção sorológica do patógeno enquanto Silva *et al.* (2015) desenvolveram um método para detecção do patógeno baseado na amplificação, por meio de PCR, de uma região do gene da Recombinase A - RecA, com o uso de sequências de oligonucleotídeos iniciadores específicos. Estes *primers* se mostraram específicos, não se observando a amplificação de DNA de outras espécies bacterianas fitopatogênicas ou epífitas/endofíticas de goiabeira. O par de iniciadores Ep2L e Ep2R apresentaram limite de detecção de  $10^3$  UFC/ml quando usado em PCR convencional e 10 UFC/ml do patógeno alvo quando usados em BIO-PCR.

Fitopatógenos capazes de colonizar o sistema vascular apresentam a capacidade de movimentarem-se nesse tecido e atingir pontos distantes de onde foram inoculados. Como exemplo, a bactéria *Xylella fastidiosa* inoculada em plantas de videira foi detectada a 120 cm acima do ponto de inoculação depois de 6 semanas (Baccari e Lindow, 2011). Krivanek e Walker (2005) trabalhando nesse mesmo patossistema observaram o movimento do patógeno até 20 cm abaixo e 50 cm acima do ponto de inoculação. Chalupowicz *et al.* (2012) estudando o movimento da bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, em tomateiro, observaram que esta alcançava 30 cm acima do ponto de inoculação depois de 15 dias e 4 cm abaixo, depois de 3 dias. Contudo, estes trabalhos tiveram como objetivo principal quantificar a população do patógeno a diferentes distâncias do ponto de inoculação e não determinar, com precisão, a distância percorrida pelo patógeno a partir do ponto de inoculação ao longo do tempo.

No patossistema *X. fastidiosa*/videira a extensão do tecido vascular colonizado está ligada à agressividade do patógeno e o nível de resistência do hospedeiro (Fry e Milholland, 1990). A combinação de hospedeiro suscetível e um patógeno agressivo resulta em ampla colonização do tecido sendo que a combinação contrária resulta em colonização menos extensa. Quando genes importantes para o movimento da bactéria são mutados, geralmente observa-se menor colonização do tecido vascular assim como menor severidade da doença (Koczan *et al.*, 2009; Chalupowicz *et al.*, 2012).

Inexistem trabalhos que determinam a localização de *E. psidii* nos tecidos de goiabeira. Porém, em função do padrão de sintomas ser semelhante àquele desencadeado por *E. amylovora* em seus hospedeiros e esta ser uma bactéria que sabidamente coloniza o xilema de seus hospedeiros, acredita-se que *E. psidii* assumira uma localização semelhante.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de monitorar, por BIO-PCR (Schaad *et al.*, 1995), a extensão da colonização de *E. psidii* ao longo da haste de mudas de goiabeiras inoculadas artificialmente tanto no sentido acropetal quanto basipetal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

A preparação e manutenção das mudas, assim como a instalação e condução dos ensaios foi feita na casa de vegetação localizada na Estação Experimental de Biologia – IB/UnB.

Foram coletados frutos maduros de goiabeiras das variedades Pedro Sato, Sassaoka e Kumagai, em uma lavoura comercial pertencente ao Sr. Paulo Egimori localizada em Brazlândia-DF. Dos frutos foram retiradas as sementes que, depois de lavadas, foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido de 96 células contendo substrato autoclavado. Transcorridos 60 dias da semeadura as plântulas foram transplantadas para sacos plásticos contendo aproximadamente 1 litro de substrato também autoclavado.

### Isolados de *E. psidii*, origem, cultivo, inoculação e avaliação da severidade da doença

Foram usados três isolados de *E. psidii*: IBSBF 435, isolado tipo do patógeno obtido no estado de São Paulo em 1982, o isolado IBSBF 493 obtido em Itariri SP no ano de 1984 e IBSBF 1579 obtido em Brazlândia-DF no ano de 2001 (Silva *et al.*, 2015). Estes isolados foram recuperados a partir de culturas preservadas em água destilada e esterilizada (Romeiro, 2001) mantidas pelo Laboratório de Fitopatologia Molecular do Departamento de Fitopatologia/UnB. Os isolados tiveram a sua patogenicidade comprovada mediante a inoculação em folhas destacadas de goiabeira (Marques *et al.*, 2007) de onde foram reisolados e mantidos em água destilada e esterilizada. Para a realização dos ensaios os isolados do patógeno foram recuperados da cultura estoque e transferidos para placas contendo meio 523 sólido (Kado e Heskett, 1970). Depois de 48 h colônias típicas do patógeno foram transferidas para placas contendo o mesmo meio e cultivados por 48 horas. Para a inoculação do patógeno adotou-se como básica a técnica descrita por Marques *et al.* (2007) a qual foi feita mediante a deposição de suspensão bacteriana  $O.D_{540}=1$  na axila do último par de folhas completamente expandido seguido de punção com agulha até, aproximadamente, 1/3 da espessura da haste da muda inoculada. Depois da inoculação, as mudas foram mantidas por 12 h em câmara úmida que consistiu na cobertura das mesmas com saco plástico de cor azul. A severidade da doença foi avaliada com o uso da escala de Horsfall e Barratt (1945). Procedeu-se a representação cartesiana dos dados a partir da qual foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença – AACPD (Shaner e Finney, 1977).

## **Seleção dos isolados e do material vegetal**

Mudas de goiabeira das variedades Pedro Sato, Kumagai e Sassaoka com 60 dias após o transplante, foram inoculadas com os isolados do patógeno, sendo inoculados com cada isolado em três mudas de cada variedade. Como controle, mudas tiveram água depositada em suas axilas seguida de punção com agulha. A severidade da doença foi avaliada aos 23 e 27 dias após a inoculação. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado sendo os valores de AACPD transformados ( $\log x$ ) e submetidos a análise de variância em esquema fatorial 3x3 sendo os fatores três isolados e três variedades. As médias foram submetidas ao teste de Tukey 5 %.

## **Detecção da movimentação da bactéria no interior de hastes de plantas por meio de BIO-PCR**

Com o resultado do ensaio onde foram inoculadas as três variedades de goiabeira com os três isolados do patógeno, foi instalado o ensaio para detectar a movimentação do patógeno com duas variedades e um isolado do patógeno. Para tanto, mudas de goiabeira das variedades Sassaoka e Pedro Sato, 90 dias depois de transplantadas, foram inoculadas com o isolado IBSBF 435. O delineamento escolhido foi o blocos ao acaso. Cada um dos 4 blocos ficou constituído por 13 mudas de cada variedade sendo 12 inoculadas e uma muda que foi apenas puncionada. De cada bloco foi coletada uma planta depois de 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias depois da inoculação. A muda coletada foi avaliada quanto a severidade da doença e em seguida foi submetida a detecção do patógeno por BIO-PCR utilizando a técnica proposta por Silva *et al.* (2015). Para tanto, as hastes das plantas foram seccionadas transversamente a cada 1 cm acima e abaixo do ponto de inoculação, de onde foram retirados fragmentos com aproximadamente 2 mm de extensão, os quais foram macerados em 200  $\mu$ l de água destilada esterilizada. Do macerado, 100  $\mu$ l foram transferidos para placas de Petri contendo meio 523 (Kado e Heskett, 1970) e espalhados, com o auxílio de uma alça de Drigalski. Depois de 24 h de incubação à 28 °C foram adicionados 2 ml de água destilada e esterilizada sobre a placa e as colônias, visíveis ou não, foram raspadas e a suspensão transferida para microtubos e congelada a -20 °C. A reação de PCR com as amostras coletadas foi composta por tampão da enzima 1X (50 mM de KCl, 10 mM Tris HCl), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Ludwing Biotecnologia LTDA Porto Alegre – RS) e 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador (Ep 2L/2R), sintetizados pela Invitrogen Life Technologies e 3  $\mu$ l de amostra com a possível presença do patógeno. O volume final da reação foi ajustado para 25  $\mu$ l com água ultrapura esterilizada. O programa para a amplificação foi composto pelas etapas de desnaturação a 95 °C por 3 min, seguido por 32 ciclos de 94 °C por 1 min, 64

°C por 1 min, 72 °C por 2 min e ao final um ciclo de 72 °C por 5 min no termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Hercules, California U.S.A.). Ao tubo de reação do controle positivo foram adicionados 3 µl de uma suspensão (OD<sub>540</sub> = 0,3) de células do isolado IBSBF 435 de *E. psidii*. O controle negativo ficou constituído pelo mix de reagentes da reação acrescidos de 3 µl de água ultrapura esterilizada.

Após a PCR, à cada reação foram adicionados 3 µl de tampão de carregamento (Promega, Madison, Wisconsin – USA) e 12 µl da mistura foram aplicados em gel de agarose a 1 % preparado em tampão TBE 0,5 X (TRIS base 5,4 g, ácido bórico 2,75 g, EDTA sal dissódico 0,375 g e água destilada q.s.p 1 litro). O gel foi submetido à eletroforese por 50 min, a 80 volts sendo posteriormente corado em uma solução de brometo de etídeo a 0,5 µg/ml por 20 min, descorado em água destilada por 5 min, visualizado e fotodocumentado sob luz UV em sistema LPix, Loccus® (Loccus Biotecnologia, Cotia-SP). A presença do patógeno no fragmento de haste de goiabeira foi considerado positivo caso na respectiva posição da amostra no gel fosse observada uma banda de aproximadamente 200 pb.

Os dados coletados foram representados cartesianamente sendo no eixo “X” os diferentes tempos de amostragem e no eixo “Y” a distância, em centímetros, a partir do ponto de inoculação onde o patógeno foi detectado. Foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso de Colonização – AACPC, em analogia à Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença - AACPD (Shaner e Finney, 1977). Os valores de AACPC foram submetidos a análise de variância em esquema fatorial 2x2 sendo duas variedades e dois possíveis sentidos de colonização, acima e abaixo do ponto de inoculação.

Os dados de severidade da doença e da distância percorrida pelo patógeno ao longo da haste da planta, para cada uma das variedades, foram submetidos a análise de correlação.

### **Análise dos dados:**

As análises de variância e os testes de média foram executados com o uso do programa SAEG versão 8.1 observando as recomendações do manual de Ribeiro Júnior (2001). As análises de correlação foram executadas usando o programa Microsoft® Excel® for Mac 2011.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Seleção dos isolados e do material vegetal**

O objetivo do trabalho foi monitorar o movimento da bactéria *E. psidii* no interior de mudas de goiabeira artificialmente inoculadas. Para tanto, foi realizado um ensaio preliminar

onde foi selecionado um isolado do patógeno e duas variedades de goiabeira. No resultado desse ensaio é possível observar que houve diferença na suscetibilidade das diferentes variedades ao patógeno. A variedade Pedro Sato demonstrou ser a mais sensível e a variedade Sassaoka como a menos suscetível com a variedade Kumagai apresentando uma suscetibilidade intermediária. A diferença na suscetibilidade de variedades ao patógeno já havia sido mencionada em condições de campo por Coelho *et al.* (2002) e em condições experimentais por Rezende (2006).

O resultado do ensaio realizado com o intuito de selecionar o isolado e as variedades para o ensaio de colonização da bactéria pode ser observado na Figura 1.

Com base nos resultados desse ensaio, selecionou-se a variedade Pedro Sato, mais suscetível a *E. psidii*, e a variedade Kumagai, por apresentar um resultado intermediário e por ser essa uma variedade de polpa branca. Rezende (2006) já havia observado que a variedade de polpa branca, Ogawa, apresentava uma menor suscetibilidade à doença. Não sendo observada diferença significativa na agressividade entre os diferentes isolados, optou-se pelo isolado IBSBF 435 por ser este o isolado tipo da bactéria *E. psidii*.

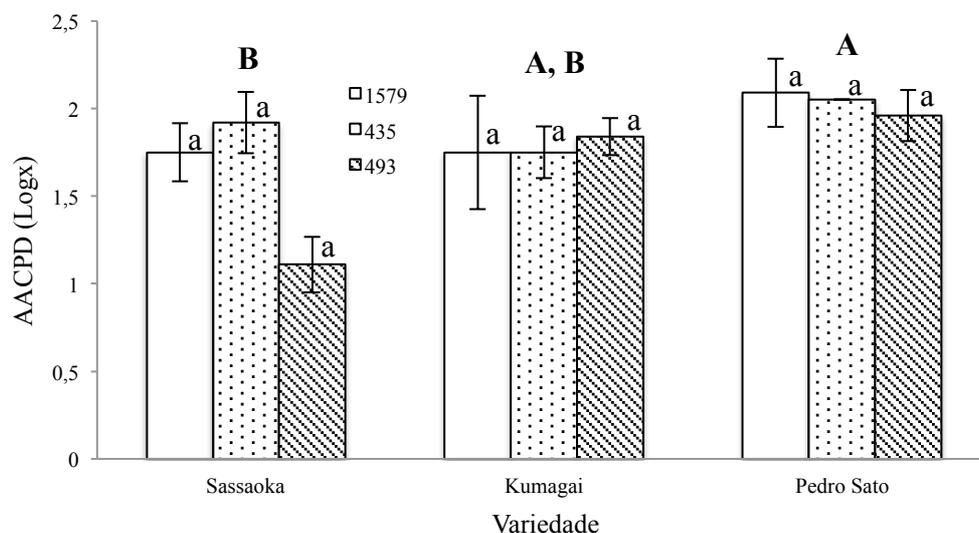


Figura 1: Área abaixo da curva de progresso da doença -AACPD avaliada em um ensaio onde foram inoculados três diferentes isolados de *Erwinia psidii* em mudas de três diferentes variedades de goiabeira. Os dados foram transformados em Logx. Colunas encimadas pelas mesmas letras não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5 %, sendo que as letras maiúsculas representam a comparação entre as variedades e as minúsculas o efeito dos três diferentes isolados em uma mesma variedade. As barras representam o erro padrão da média.

### Colonização da haste do hospedeiro pelo patógeno a partir do ponto de inoculação:

O patógeno foi detectado em todas as plantas inoculadas em todos os tempos amostrados. A presença do patógeno nas amostras foi evidenciada pela presença de uma banda de DNA com aproximadamente 200 pb (Figura 2).

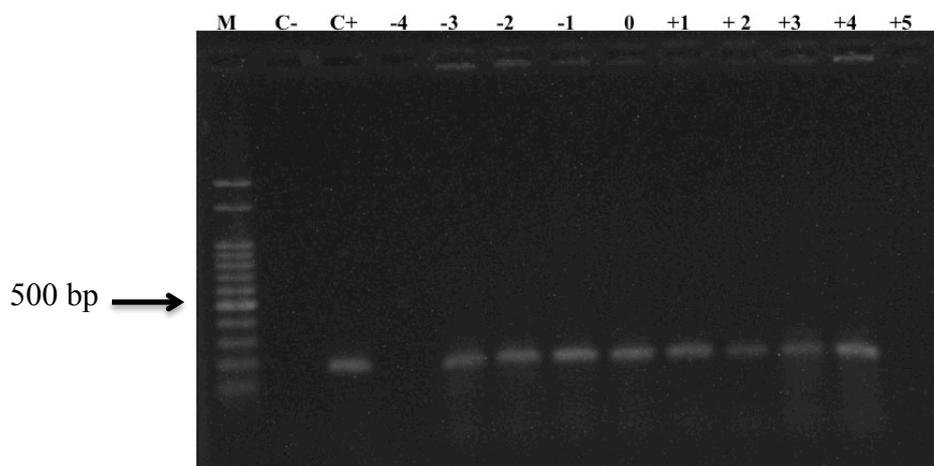


Figura 2: Perfil eletroforético dos produtos da PCR com oligonucleotídeos específicos para a bactéria *Erwinia psidii*. M= Marcador 100 bp-DNA Ladder (Promega) C+ = controle positivo, C- = controle negativo. Números precedidos por sinal (-) ou (+) representam, respectivamente, a distância, em centímetros, abaixo ou acima do ponto de inoculação na planta de onde foi retirada a amostra. O gel ilustra resultado observado 48 h depois da inoculação.

Na primeira coleta, realizada 12 h após a inoculação, o patógeno foi detectado, a 1,5 cm acima e 1,5 cm abaixo do ponto de inoculação. Até 8 dias depois da inoculação foi observada elevada mobilidade. Aos 10 dias o patógeno chegou aos pontos extremos observados no ensaio que foram 14 cm e 12 cm acima e abaixo do ponto de inoculação, respectivamente. Nos coletas finais do ensaio, o movimento do patógeno mostrou-se menos intenso (Figura 3). Depois de 12 dias da inoculação, o patógeno encontrava-se poucos milímetros abaixo do ápice da planta e neste momento encerrou-se a coleta das amostras (dados não mostrados).

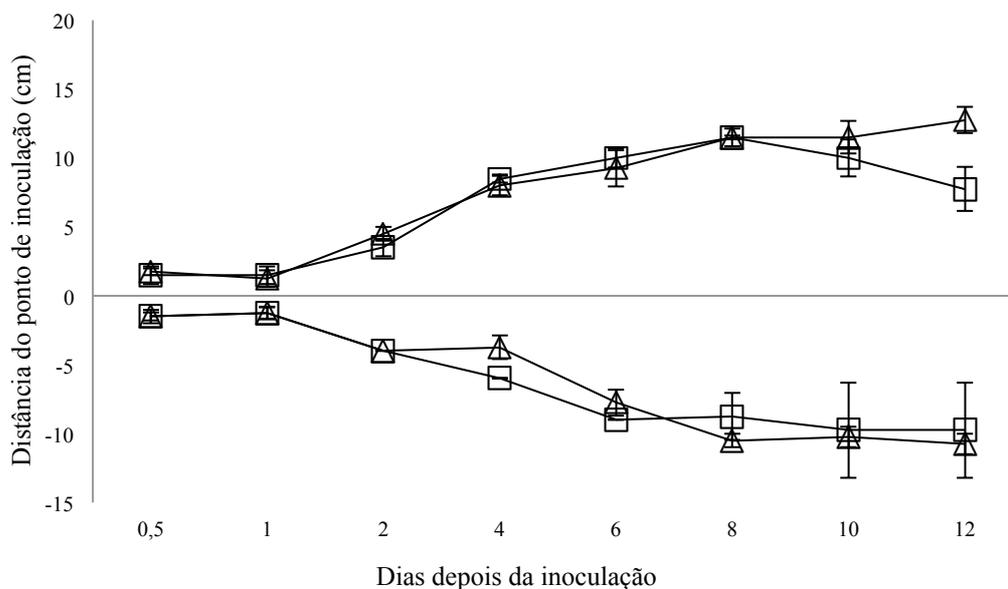


Figura 3: Colonização de hastes de mudas de goiabeira das variedades Pedro Sato e Kumagai pela bactéria *Erwinia psidii* a partir do ponto de inoculação no intervalo de 0,5 a 12 dias. As barras representam o erro padrão da média das observações.

A análise dos valores de AACPC mostrou que não houve diferença significativa nos valores entre as duas variedades, assim como não se observou diferença na colonização acima ou abaixo do ponto de inoculação, conforme pode ser visualizado na Figura 4.

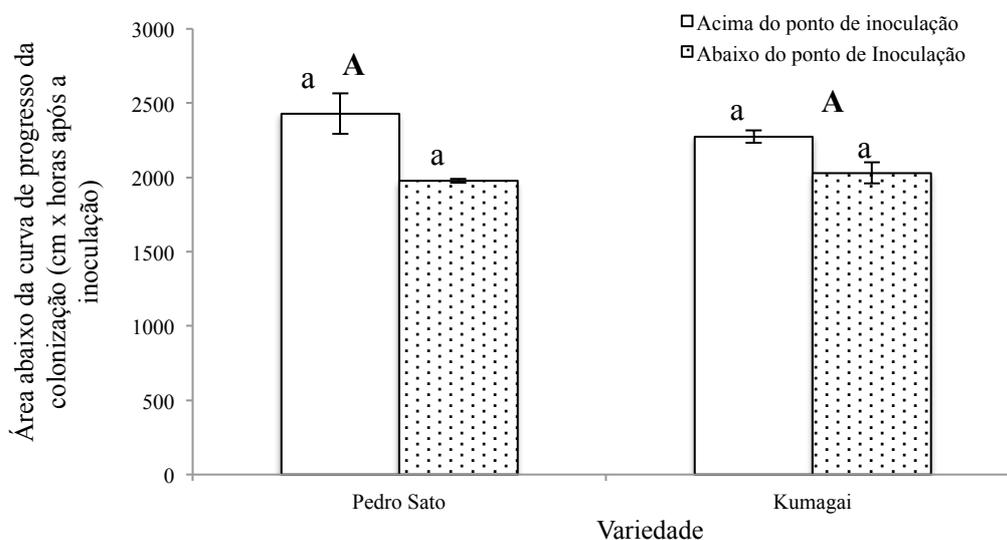


Figura 4: Valores de Área Abaixo da Curva de Progresso da Colonização – AACPC observados em hastes de mudas de goiabeira de duas variedades inoculadas com um isolado de *Erwinia psidii*. Colunas encimadas pelas mesmas letras não diferiram entre si pelo teste “F” sendo que as letras maiúsculas representam a comparação entre as variedades e as letras minúsculas entre o sentido da colonização, acima e abaixo do ponto de inoculação. As barras representam o erro padrão da média.

O movimento de patógenos sistêmicos tanto no sentido acropetal quanto basipetal é relatado por diferentes pesquisadores. Czajkowski *et al.* (2010b), inicialmente fizeram o plantio de tubérculos de batata e em seguida infestaram o substrato com uma suspensão de

células de *Dickeya* sp. Depois de 30 dias observaram a expressão de sintomas típicos da doença. Posteriormente Czajkowski *et al.* (2010a), observaram que ao inocularem o patógeno nas folhas de batateira, após 30 dias o patógeno era encontrado na lâmina foliar, pecíolos e hastes da planta. Quando a planta era inoculada na haste, no mesmo período o patógeno era encontrado nas raízes, estolões e tubérculos formados pela planta. Também Bogs *et al.* (1998) ao inocularem a haste de plântulas de macieira com 8 semanas de idade com a bactéria *Erwinia amylovora*, foram capazes de localizar o patógeno nas raízes da planta depois de três dias.

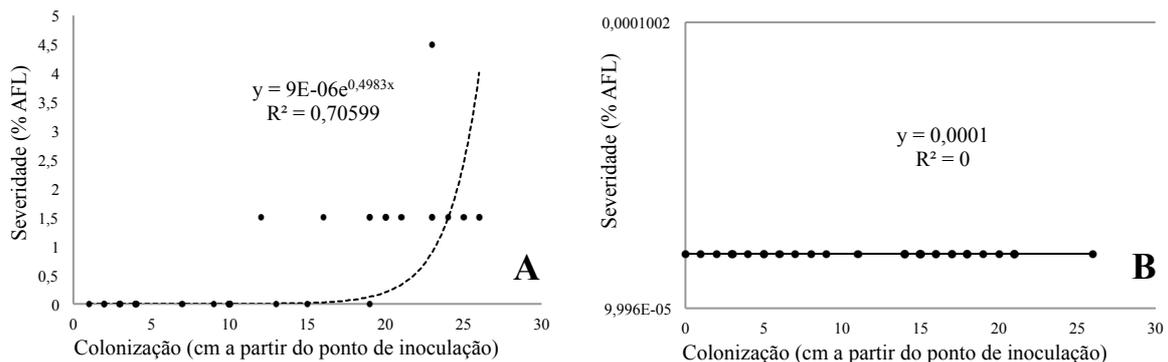
Segundo Czajkowski *et al.* (2010a) o movimento basipetal do patógeno no interior dos tecidos da planta pode ser regido por mecanismos distintos. Uma possibilidade é a degradação do tecido vascular da planta pelo patógeno que leva a sua obstrução e posterior colonização dos elementos de xilema conforme postulado por Nelson e Dickey (1970). Uma segunda possibilidade é o fluxo reverso da seiva durante o período escuro (Tatter e Tatter, 1999) que poderia conduzir ao longo do vaso substâncias contidas em seu interior. Possivelmente, os diferentes mecanismos ocorrem simultaneamente e dessa forma agem em sinergismo.

Os primeiros sintomas da doença foram observados seis dias depois da inoculação na variedade Pedro Sato (Figura 5A). Estes consistiram em lesões necróticas próximas ao ponto de inoculação com aspecto encharcado que evoluíram para um aspecto ressecado. O aspecto de anasarca foi mantido na interface entre o tecido necrosado e o tecido sadio. As lesões expandiram-se ao longo da folha a partir da nervura central em direção ao ápice. No decorrer do período, pares de folhas acima e abaixo do ponto de inoculação também tornaram-se sintomáticas. Até o final do ensaio, não foram observados sintomas na variedade Kumagai. As mudas dessa variedade apresentaram os primeiros sintomas 19 dias depois de inoculadas (Figura 5B).



Figura 5: Mudanças de goiabeira inoculadas na haste, com a bactéria *Erwinia psidii*, por punção. Sintomas iniciais da doença seis dias depois da inoculação (A). Sintomas em muda da variedade Pedro Sato, esquerda e Kumagai à direita 29 dias depois da inoculação (B). As setas indicam o ponto de inoculação do patógeno.

A análise de correlação entre a extensão da colonização pelo patógeno ao longo da haste da muda e a severidade da doença nessa mesma haste estão ilustradas na Figura 6.



Os dados sugerem que, neste patossistema, os eventos de colonização e expressão dos sintomas não necessariamente estão correlacionados e ocorrem simultaneamente. Enquanto a colonização dos tecidos não apresentou diferença significativa entre as variedades, a ocorrência e severidade dos sintomas foi evidente. Transcorridos 12 dias da inoculação, a variedade Pedro Sato apresentava uma área foliar lesionada de 2,25 % enquanto na variedade Kumagai não eram observados sintomas da doença (Figura 5, 6). É importante salientar que a detecção do patógeno nas mudas assintomáticas não pode ser considerado um falso positivo em razão da técnica usada que praticamente elimina esse erro experimental.

Em ensaio paralelo, foi realizada a inoculação em 12 mudas das variedades Pedro Sato e Kumagai. Observou-se que 91,6 % das mudas da variedade Kumagai mantiveram-se assintomáticas por 19 dias apresentando tênues sintomas somente 28 dias depois de inoculadas, enquanto 91,6 % das plantas da variedade Pedro Sato apresentavam-se sintomáticas já aos 9 dias depois da inoculação (dados não mostrados). Essa observação reforça a necessidade de análises do material propagativo visando a certificação de sua sanidade. Justifica-se essa necessidade, pois sendo adotada uma técnica de inoculação invasiva, como aquela usada nesse ensaio, as mudas permaneceram assintomáticas por aproximadamente um mês. Em condições naturais de infecção, o período em que as plantas permanecem assintomáticas, e podem ser consideradas sadias, pode ser muito maior.

O movimento do patógeno no interior dos tecidos do hospedeiro é tido como crucial para o desencadeamento de sintomas em patógenos colonizadores do sistema vascular (Chalupowicz *et al.*, 2012). A extensão da colonização, seja ela em termos de distância a partir do ponto de inoculação na qual o patógeno é localizado, ou o número de vasos colonizados ou a população do patógeno em UFC/g de tecido é dependente da espécie infectada (Fry e Milholland, 1990; Alves *et al.*, 2004) da variedade dentro da mesma espécie ou mesmo do órgão vegetal avaliado (Krivanek e Walker, 2005). A extensão da colonização dos feixes vasculares por patógenos que infectam esses tecidos é uma importante condição para que o desenvolvimento dos sintomas sejam desencadeados. Nesse sentido os patossistemas mais bem estudados envolvem os patógenos *E. amylovora* em rosáceas (Koczan *et al.*, 2009; Koczan *et al.*, 2011) e *X. fastidiosa* em videira (Chatterjee *et al.*, 2008), café e citros (Alves *et al.*, 2004).

A capacidade de colonização do xilema pelo patógeno é dependente de fatores como a síntese de enzimas que permitem ao patógeno degradar a parede celular vegetal e assim atingir vasos contíguos (Alves *et al.*, 2009), a presença, ou mesmo ausência, de mecanismos de sinalização entre células do patógeno (Chatterjee *et al.*, 2008) e a capacidade de formação de biofilme (Bogino *et al.*, 2013). Este último é dependente de receptores de adesinas

presentes no tecido do hospedeiro que permitem a adesão de células do patógeno e posterior multiplicação e formação de agregados (Kline *et al.* 2009). A composição dos vasos de xilema, é alterada no decorrer do seu desenvolvimento, especialmente em relação à deposição de lignina (Raven *et al.*, 2007). A deposição desse material torna este tecido de difícil fragilização por enzimas degradadoras dos componentes da parede celular vegetal. Esta observação poderia justificar a ausência de sintomas nas mudas da variedade Kumagai que poderiam ter atingido um nível de maturação tecidual mais rapidamente que a variedade Pedro Sato e por isso não ter apresentado sintomas. Porém, esta possibilidade é parcialmente refutada pois em ambas as variedades o patógeno foi encontrado próximo ao ápice das mudas os quais apresentavam tecido tenro e, em tese, permissivo ao desenvolvimento de sintomas como observado no ensaio de seleção de variedades e isolados (Figura 2). Portanto, um outro mecanismo deve estar atuando na supressão do desenvolvimento dos sintomas em Kumagai, possivelmente dependente da idade da planta, uma vez que no ensaio de seleção de variedades e isolados, quando as mudas estavam com aproximadamente 60 dias, houve a expressão de sintomas. Porém quando o ensaio de movimentação do patógeno foi realizado com as mudas apresentando 90 dias de idade, os sintomas foram tênues ou mesmo ausentes. A diminuição da suscetibilidade com a idade da planta é um fenômeno relatado em diferentes patossistemas. Koch e Mew (1991) observaram o aumento da resistência de folhas de arroz à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* com o aumento da idade da folha. Efeito semelhante foi observado por Kus *et al.* (2002) em plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Um fenômeno semelhante pode ocorrer nesse patossistema uma vez que os sintomas da doença somente são observados em tecidos jovens da planta.

A indução de sintomas por patógenos vasculares é dependente de diferentes fatores, entre eles a população que o patógeno atinge no interior dos tecidos da planta. Chalupowicz *et al.* (2012) trabalhando no patossistema *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* observaram que o patógeno pode sobreviver endofiticamente em tecidos de tomateiro contudo, para que haja desenvolvimento de sintomas é preciso uma população superior a  $10^8$  UFC/g de tecido do hospedeiro. No presente ensaio, é possível que a população mínima necessária para o desencadeamento de sintomas pela bactéria não tenha sido atingido em Kumagai. É importante que se mencione que embora não tenha havido o desenvolvimento de sintomas, o patógeno estava presente no interior das mudas de Kumagai, as quais, numa produção comercial poderiam ser transplantas e numa condição adequada desenvolver os sintomas da doença. Ou introduzi-la em uma região até então livre do patógeno.

Assim os dados obtidos neste ensaio demonstram que a distância que o patógeno deslocou-se a partir do ponto de inoculação não diferiu para as duas variedades porém detectou-se diferença na ocorrência e severidade dos sintomas. Além da distância do ponto de inoculação onde o patógeno é detectado, assume importância o nível populacional alcançado pelo mesmo no interior dos tecidos infectados assim como o número de vasos portadores de oclusão. Essas duas variáveis devem ser investigadas, assim como a determinação da localização do patógeno no interior dos tecidos do hospedeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. *et al.* *Citrus sinensis* leaf petiole and blade colonization by *Xylella fastidiosa*: details of xylem vessel occlusion. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 2, p. 218-224, 2009.

ALVES, E. *et al.* Leaf symptoms on plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n. 5, p. 291-297, 2004.

ARRIEL, D. A. A. *et al.* Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology**, v. 44, n. 4, p. 255-265, 2014.

BACCARI, C.; LINDOW, S. E. Assessment of the process of movement of *Xylella fastidiosa* within susceptible and resistant grape cultivars. **Phytopathology** v. 101, n. 1, p. 77-84, 2011.

BOGINO, P. *et al.* The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 15838-15859, 2013.

BOGS, J. *et al.* Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. **Phytopathology**, v. 88, n. 5, p. 416-21, 1998.

CHALUPOWICZ, L. *et al.* Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. **Phytopathology**, v. 102, n. 1, p. 23-31, 2012.

CHATTERJEE, S.; NEWMAN, K. L.; LINDOW, S. E. Cell-to-cell signaling in *Xylella fastidiosa* suppresses movement and xylem vessel colonization in grape. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 21, n. 10, p. 1309-1315, 2008.

COELHO, M. V. S.; MENDES, A. P.; MARQUES, A. S. A. **Comunicado técnico 59: Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização.** Brasília - DF: EMBRAPA, 2002. 8

COUTINHO, T. A. *et al.* A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. **Australasian Plant Pathology**, v. 40, n. 1, p. 55-60, 2011.

CZAJKOWSKI, R. *et al.* Downward vascular translocation of a green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. (biovar 3) from stem and leaf inoculation sites on potato. **Phytopathology**, v. 100, n. 11, p. 1128-1137, 2010a.

CZAJKOWSKI, R. *et al.* Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. **Phytopathology**, v. 100, n. 2, p. 134-142, 2010b.

FRY, S. M.; MILHOLLAND, R. D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant tolerant and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology** v. 80, n. 1, p. 61-65, 1990.

HORSFALL, J. G.; BARRATT, R. W. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, v. 35, p. 655, 1945.

IBGE. Pesquisa agrícola Municipal. 2012. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em: 15/11/2015.

KADO, C. E.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.

KLINE, K. A. *et al.* Bacterial adhesins in host-microbe interactions. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 6, p. 580-592, 2009.

KOCH, M. F.; MEW, T. Effect of plant age and leaf maturity on the quantitative resistance of rice cultivars to *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. **Plant disease**, v. 75, n. 9, p. 901, 1991.

KOCZAN, J. M. *et al.* Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora*. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 19, p. 7031–7039, 2011.

KOCZAN, J. M. *et al.* Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. **Phytopathology**, v. 99, n. 11, p. 1237-1244, 2009.

KRIVANEK, A. F.; WALKER, M. A. *Vitis* resistance to Pierce's disease is characterized by differential *Xylella fastidiosa* populations in stems and leaves. **Phytopathology**, v. 95, n. 1, p. 44-52, 2005.

KUS, J. V. *et al.* Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. **The Plant Cell**, v. 14, n. 2, p. 479-490, 2002.

MARQUES, A. S. A. *et al.* Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira De Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 488-493, 2007.

NELSON, P. E.; DICKEY, R. S. Histopathology of plants infected with vascular bacterial pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 8, p. 259-280, 1970.

OLIVEIRA, D. S. *et al.* Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 33, n. 1, p. 89-98, 2011.

POMMER, C. V.; MURAKAMI, K. R. N.; WATLINGTON, F. Goiaba no Mundo. **O Agrônomo**, v. 58, n. 1/2, p. 22-26, 2006.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830

REZENDE, A.; TOMITA, C. K.; UESUGI, C. H. Cupric fungicides, benzalconium chlorides and liquid bioactive compost (Bokashi): phytotoxicity and control of guava bacterial blight caused by *Erwinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 4, p. 288-294, 2008.

REZENDE, A. M. F. A. **Estudo sobre a resistência genética e produtos químicos no controle da bacteriose da goiabeira (*Psidium guajava*) causada por *Erwinia psidii***. 2006.

84 Dissertação de Mestrado (Mestrado em Fitopatologia). Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa-MG: Editora Folha de Viçosa, 2001.

RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C.; YAMASHIRO, T. A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, n. 4, p. 354-350, 1987.

ROMEIRO, R. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa-MG: Editora UFV, 2001. 279

SCHAAD, N. W. *et al.* A combined biological and enzymatic amplification (BIO- PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, v. 85, n. 2, p. 243-248, 1995.

SEBRAE. Estudo de Dados Secundários Fruticultura DF 2010. Brasília-DF, 2010. Disponível em: <[http://intranet.df.sebrae.com.br/download/uam/Pesquisa/Fruticultura/Estudo\\_de\\_Mercado\\_Fruticultura\\_Sebrae\\_DF\\_2010.pdf%3E](http://intranet.df.sebrae.com.br/download/uam/Pesquisa/Fruticultura/Estudo_de_Mercado_Fruticultura_Sebrae_DF_2010.pdf%3E)>. Acesso em: 15/11/2015.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow - mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

SILVA, C. F. *et al.* PCR-based methods for detection of *Erwinia psidii* on guava. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 4, p. 251-259, 2015.

TATTER, T. A.; TATTER, S. J. Evidence for the downward movement of materials injected into trees. **Journal of Arboriculture**, v. 25, n. 6, p. 325-332, 1999.

TEIXEIRA, A. C. O.; FERREIRA, M. A. S. V.; MARQUES, A. S. A. Detecção de *Erwinia psidii* via enriquecimento em extrato de folhas de goiabeira e imunodifusão radial dupla. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 212-218, 2008.