

DANIELE APARECIDA ALVARENGA ARRIEL

**SECA DE PONTEIROS DE *Eucalyptus* spp. CAUSADA POR
Erwinia psidii NO BRASIL**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

A775s
2012

Arriel, Daniele Aparecida Alvarenga, 1986-
Seca de ponteiros de *Eucalyptus* spp. causada por
Erwinia psidii no Brasil / Daniele Aparecida Alvarenga
Arriel. – Viçosa, MG, 2012.
vii, 31f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 24-26.

1. Eucalipto - Doenças e pragas. 2. *Erwinia psidii*.
3. Filogenia. 4. Genética molecular. I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

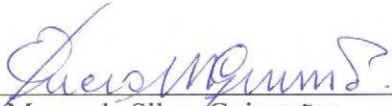
CDD 22. ed. 632.32

DANIELE APARECIDA ALVARENGA ARRIEL


**SECA DE PONTEIROS DE *Eucalyptus* spp. CAUSADA POR
Erwinia psidii NO BRASIL**

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

APROVADA: 16 de fevereiro de 2012.


Lúcio Mauro da Silva Guimarães
(Coorientador)


Luis Cláudio Vieira da Cunha


Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

"Daqui a cinco anos você estará bem próximo de ser a mesma pessoa que é hoje, exceto por duas coisas: os livros que ler e as pessoas de quem se aproximar".

(Charles Jones)

Ao meu pai Edson Antônio Arriel
À minha mãe Cleonice Alvarenga
À minha irmã Maria Clara Alvarenga Arriel

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por sempre guiar a minha vida.

À toda a minha família e especialmente aos meus pais, Edson e Nice, e à minha irmã Maria Clara, por todo amor, carinho, confiança e por serem a minha maior alegria.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade.

Ao CNPq, à Fapemig, a Celulose Rio Grandense e Stora Enso pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Acelino Couto Alfenas pela oportunidade, confiança, orientação pelos ensinamentos e por ser um orgulho para a nossa profissão.

Ao Roberto Lanna Filho pelas sugestões e pela motivação.

A Talyta pela ajuda, pelo carinho e pela paciência.

Ao meu coorientador Dr. Lúcio Mauro da Silva Guimarães pelas inúmeras ajudas prestadas, pela paciência, amizade e por acompanhar todas as etapas deste trabalho.

Ao professor Luis Cláudio Vieira da Cunha pela participação na banca de dissertação e ao professor Gleiber Quintão Furtado pela orientação.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Florestal - PATOMOL - pela amizade, pelo carinho e pela ótima convivência. Em especial agradeço à Pollyane, ao Ramon e à Natália por ajudarem no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do PATOMOL, principalmente à Márcia Brandão, Mara Souza e ao Sr. João pelo carinho e pela pronta disponibilidade em ajudar.

À Camila Moreira por ser a minha família em Viçosa e estar sempre comigo, em todos os momentos. Você foi fundamental nesses últimos dois anos.

À Natália Risso, Marcela Galo, Cinthia Silva, Isabela Fonseca e Camila Santana pela amizade. Também agradeço aos amigos distantes, mas sempre presentes Natalie Almeida, Luiz Henrique e Flaviane Nogueira.

E por fim a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DANIELE APARECIDA ALVARENGA ARRIEL, filha de Edson Antônio Arriel e Cleonice Alvarenga, nasceu em 16 de setembro de 1986 em Perdões, MG. Em dezembro de 2004 concluiu o Ensino Médio no Colégio Cenecista “Juventino Dias” em Lavras-MG. No ano de 2005, ingressou no curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Lavras sendo bolsista dos projetos Inventário Florestal de Minas Gerais e Diversidade Genética de *Eremanthus* spp. Em fevereiro de 2010, iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Professor Acelino Couto Alfenas no Laboratório de Patologia Florestal/Bioagro do Departamento de Fitopatologia da UFV.

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| 1-INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2-MATERIAL E MÉTODOS | 2 |
| 1-Characterização sintomatológica da doença, coleta de amostras e obtenção das culturas puras..... | 2 |
| 2-Identificação inicial dos patógenos pela análise da região parcial do gene 16S rDNA | 3 |
| 3-Testes de patogenicidade em mudas e folhas destacadas de eucalipto..... | 4 |
| 4-Teste de especificidade do hospedeiro..... | 5 |
| 5-Análises filogenéticas | 6 |
| 6- Testes bioquímicos | 8 |
| 3-RESULTADOS | 8 |
| 1-Characterização sintomatológica da doença, coleta de amostras e obtenção das culturas puras..... | 8 |
| 2- Identificação inicial dos patógenos pela análise da região parcial do gene 16S rDNA | 9 |
| 3-Testes de Patogenicidade em mudas e folhas destacadas de eucalipto..... | 9 |
| 4- Teste de especificidade do hospedeiro..... | 10 |
| 5-Análises filogenéticas | 14 |
| 6-Testes bioquímicos | 15 |
| 4-DISCUSSÃO | 20 |
| 5-CONCLUSÕES..... | 23 |
| 6-REFERÊNCIAS..... | 24 |
| 7-ANEXOS..... | 27 |

RESUMO

ARRIEL, Daniele Aparecida Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Seca de ponteiros de *Eucalyptus* spp. causada por *Erwinia psidii* no Brasil.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Coorientadores: Gleiber Quintão Furtado e Lúcio Mauro da Silva Guimarães.

A partir de 2009 vem sendo observada uma nova doença em eucalipto de etiologia bacteriana desconhecida, caracterizada por seca de ponteiros, murcha, lesões em ramos, pecíolo e nervura central, acompanhado de exsudação bacteriana macroscópica e microscópica. Até o presente a enfermidade já foi constatada em plantios clonais de híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. grandis* e em plantios seminais de *E. dunnii* nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. Devido à importância econômica da eucaliptocultura e ao potencial de danos causados por esta doença na cultura este trabalho objetivou identificar e caracterizar seu agente etiológico. Foram obtidos 13 isolados bacterianos a partir de materiais apresentando os sintomas no campo. Inoculações em mudas e em folhas destacadas de eucalipto comprovaram a patogenicidade dos isolados ao eucalipto. Análises moleculares usando quatro *housekeeping* genes (16S rDNA, *gapA*, *recA* e *rpoB*) assim como testes bioquímicos confirmaram a identidade dos isolados como pertencentes à espécie *Erwinia psidii*. Este é o primeiro relato de *E. psidii* causando seca de ponteiros em eucalipto no Brasil.

ABSTRACT

ARRIEL, Daniele Aparecida Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil**
Adviser: Acelino Couto Alfenas. Co-advisers: Gleiber Quintão Furtado and Lúcio Mauro da Silva Guimarães.

Since 2009, a new disease has been observed in eucalyptus stands. Of unknown bacterial etiology, it is characterized by die-back, wilting, lesions on branches, petiole and midrib, accompanied by macroscopic and microscopic bacterial ooze. To date, this disease has been observed in stands of clonal hybrids of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. grandis* and in seminal plantations of *E. dunnii* in São Paulo and Rio Grande do Sul. Considering the economic importance of the silviculture of eucalypts and the potential damage caused by the disease, this study aimed to identify and characterize its etiologic agent. Thirteen strains were obtained from materials presenting the symptoms in the field. Inoculation of cuttings and detached leaves proved the pathogenicity of the strains to eucalyptus. Phylogenetic analysis of three housekeeping genes (16S rDNA, *gapA*, *recA* and *rpoB* as well as biochemical tests confirmed the identity of strains as belonging to the species *Erwinia psidii*. This is the first report of *E. psidii* causing die-back on *Eucalyptus* spp. in Brazil.

1-INTRODUÇÃO

O eucalipto (*Eucalyptus spp.*), nativo da Austrália e ilhas próximas, é atualmente a maior fonte de madeira e seus derivados provindos de florestas plantadas no mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, características como adaptabilidade, crescimento rápido e alta produtividade levaram a expansão da cultura para todas as regiões do país, sendo que no ano de 2010 foram produzidos cerca de 158 milhões de m³ de toras provindas de uma área de aproximadamente 4,7 milhões de hectares (ABRAF, 2011). Apesar de todas as vantagens que apresenta, o emprego de genótipos de eucalipto em novas áreas sem o prévio conhecimento de sua resistência à doenças tem favorecido o surgimento de várias epidemias, cujos agentes etiológicos encontravam-se endemicamente presentes ou foram acidentalmente introduzidos nessas regiões (Alfenas et al., 2009).

Dentre os principais fitopatógenos da eucaliptocultura destacam-se fungos *Puccinia psidii*, agente etiológico da ferrugem; *Ceratocystis fimbriata*, causador da murcha-de-Ceratocystis; e *Chrysosporthe cubensis*, causador do cancro (Alfenas et al., 2009). A ocorrência de patógenos bacterianos na cultura é relativamente recente sendo relatados principalmente sintomas de murcha vascular causada por *Ralstonia solanacearum* (Sudo et al., 1983; Alfenas et al., 2006) e manchas foliares causada por *Xanthomonas axonopodis* (Gonçalves et al., 2008).

A partir de 2009, uma nova enfermidade de etiologia bacteriana desconhecida tem sido observada, com ocorrência esporádica, em plantios de *Eucalyptus spp.* em São Paulo e no Rio Grande do Sul. A doença foi primeiramente constatada em Lençóis Paulista, São Paulo e posteriormente em Guaíba e Rosário do Sul, no Rio Grande do Sul, em plantios clonais de híbridos de *E. urophylla* x *E. grandis* e em plantios seminais de *E. grandis* e *E. dunnii*. Em determinados locais e épocas do ano a doença incide em quase 100% das plantas levando à perda da dominância apical e possível redução do crescimento, gerando prejuízos para a cultura. Os principais sintomas observados são a seca de ponteiros e necrose do pecíolo e da nervura central das folhas. Nas hastes jovens das plantas, algumas vezes, podem ser observados o escurecimento da medula e exsudação macroscópica e microscópica bacteriana.

Além do Brasil, a seca de ponteiros em *Eucalyptus spp.* causada por bactérias foi relatada na África do Sul, no Uruguai e na Argentina.. Em 2002, *Pantoea*

ananatis, foi identificada causando seca de ponteiros e manchas foliares em *Eucalyptus* spp. na África do Sul (Coutinho et al., 2002). Em 2009, Alfnas et al. relataram a ocorrência de uma bacteriose associada a seca de ponteiros no Brasil e no Uruguai, todavia a identificação do patógeno não foi realizada. Recentemente, Coutinho et al. (2011) identificaram *Erwinia psidii* causando seca de ponteiros em *Eucalyptus* spp. no Uruguai e na Argentina. Segundo os autores, a doença parece estar restrita às árvores nos primeiros dois anos de idade e, em particular, em tecidos jovens e em franca expansão.

Devido à falta de conhecimento do agente causal da doença no Brasil e das potenciais perdas que o patógeno pode causar em plantios de *Eucalyptus* spp., este trabalho objetivou identificar a etiologia da seca de ponteiros do eucalipto de origem bacteriana por meio de análises moleculares e filogenéticas usando quatro genes *housekeeping* (*gapA*, *recA*, *rpoB* e 16S rDNA) conjuntamente com testes bioquímicos e de patogenicidade.

2-MATERIAL E MÉTODOS

1-**Caracterização sintomatológica da doença, coleta de amostras e obtenção das culturas puras**

A caracterização sintomatológica da doença baseou-se em observações de campo de plantas naturalmente infectadas nos estados de São Paulo e do Rio Grande do Sul. Amostras de tecidos infectados foram acondicionadas em sacos de papel e levadas ao Laboratório de Patologia Florestal (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, onde foram processadas. Lesões sem esporulação fúngica foram submetidas ao teste de exsudação em gota sob microscópio de luz comum (200 x).

Para o isolamento do patógeno amostras de folhas e ramos apresentando exsudação bacteriana, foram lavadas com água e sabão e após remoção do excesso de água em papel toalha retiraram-se das bordas das lesões fragmentos de tecidos infectados de aproximadamente 5x5 mm. Esses fragmentos foram desinfestados em etanol 50% e a seguir em hipoclorito de sódio 0,5% de cloro ativo. Após 3 min os fragmentos foram enxaguados em água destilada autoclavada para remover o excesso de desinfestante. Em seguida, o tecido foi macerado em solução salina (NaCl 0,85%)

e a suspensão semeada em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio sólido de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) e incubada a 28 °C no escuro. Após 24 a 48 h as culturas puras foram repicadas para placas de Petri contendo o mesmo meio e armazenadas em tubos de 1,5 mL por três métodos de conservação: solução salina (NaCl 0,85%), óleo mineral e por congelamento a -80 °C em glicerol (50%).

2-Identificação inicial dos patógenos pela análise da região parcial do gene 16S rDNA

Com o intuito de fazer uma identificação inicial dos isolados foi realizado o sequenciamento da região parcial do gene 16S rDNA utilizando os oligonucleotídeos universais fd2 e rP1 (Tabela 1).

Para a extração do DNA genômico, as culturas bacterianas, armazenadas em glicerol (-80 °C) foram repicadas para tubos de ensaio contendo o meio líquido 523 por 24 - 48 h a 28 °C no escuro. Posteriormente 1 mL de suspensão foi transferida para tubos (2 mL) e as células bacterianas foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 3 min. Em seguida, o DNA foi extraído usando o kit Wizard de extração e purificação de DNA genômico (Promega), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante para bactérias gram negativas. O DNA obtido de cada isolado foi quantificado e a concentração ajustada para 10 ng μL^{-1} .

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 μL , contendo 0,6 μM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Promega), 0,2 mM de cada dioxinucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (Invitrogen), 5 X de tampão de reação (Promega), 2,5 mM MgCl_2 , 20 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume de reação. Para a amplificação procedeu-se uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg, amplificação a 52 °C por 30 seg e alongação a 72 °C por 2 min, sendo finalizada com uma alongação a 72 °C por 5 min.

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research) e os produtos da PCR separados em gel de agarose 1,4 % a 100 V durante 60 min. Para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o padrão de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta pelo sistema de fotodocumentação L.PIX (Loccus Biotecnologia). Em seguida, os fragmentos de tamanho esperado foram purificados usando o Kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

O sequenciamento dos fragmentos de DNA foi realizado usando sequenciador Megabace 1000 (GE Healthcare) utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos usados para amplificação do DNA. As sequências foram analisadas e editadas usando o Sequencer 4.5 (Gene Codes) e posteriormente comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando o programa Blastn (Altschul et al., 1997).

Adicionalmente, as sequências do isolados foram comparadas com a sequência de *Escherichia coli* (acesso J01695 no GenBank) a fim de identificar as assinaturas nucleotídicas dos gêneros fitopatogênicos da família Enterobacteriaceae segundo Hauben et al. (1998).

Tabela 1. Regiões genômicas utilizadas nas análises moleculares com os respectivos oligonucleotídeos e funções.

| Gene | Primers (5'- 3') | Função | Referência |
|-------------|--|--|------------------------|
| <i>gapA</i> | gap1f (tgaatatgactcactca cgg) gap1r (tagaggacgggatgatgttctg) | Codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, componente essencial da glicólise. | Brown et al. (2000) |
| <i>recA</i> | recA1 (ggtaaagggtctatcatgcg) recA2c (ccttcaccatacataatttggga) | Está associado a RNA polimerase e recombinase A, uma proteína multifuncional envolvida na recombinação homóloga, reparo do DNA e da resposta SOS | Waleron et al. (2002) |
| <i>rpoB</i> | rpof (aaccagttccgcgttggcctg) rpor (cctgaa caacacgct cgga) | Codificador da β subunidade da enzima RNA polimerase. | Brady et al. (2008) |
| 16S | fd2 (agagtttgatcatggctcag) rp1 (acggttaccctgttacgactt) | Codifica a região 16S do RNA ribossomal | Weisburg et al. (1991) |

3-Testes de patogenicidade em mudas e folhas destacadas de eucalipto

Os isolados obtidos foram avaliados quanto à patogenicidade em mudas de eucalipto mantidas em casa de vegetação e em folhas destacadas.

Para a inoculação em mudas foram utilizadas plantas com aproximadamente 30 dias de transplante do clone 6061 (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*), escolhido por se mostrar suscetível à doença no campo. Os isolados bacterianos, armazenados em glicerol (-80 °C) foram cultivados em placas de Petri, contendo o meio sólido 523 por 24 h a 28 °C no escuro. Previamente à inoculação foram feitos ferimentos com uma agulha hipodérmica nas folhas e pecíolos. Em seguida depositou-se sobre os ferimentos uma massa bacteriana contida na ponta de um palito de dente. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 72 h, a qual foi constituída por uma armação de bambu envolta por um saco plástico transparente cujas paredes eram borrifadas com água. As mudas foram avaliadas diariamente até

30 dias após a inoculação. Mudanças que receberam água destilada autoclavada sobre os ferimentos, mantidas nas mesmas condições, serviram como testemunhas. Foram inoculadas 2 mudas por isolado em delineamento inteiramente casualizado.

A fim de determinar um método rápido de avaliação da patogenicidade, os isolados bacterianos foram também inoculados em folhas destacadas do mesmo clone. Para isso, caixas plásticas transparentes do tipo Gerbox foram forradas com papel filtro e tela de náilon de modo a formar uma câmara úmida. Foram acondicionadas três folhas por caixa as quais continham no pecíolo um algodão embebido com água destilada autoclavada (Figura 1). Apenas um isolado foi inoculado em cada caixa, sendo cada folha uma repetição, totalizando assim 3 repetições por isolado. O experimento foi realizado em delineamento de blocos ao acaso, sendo cada caixa Gerbox considerado um bloco. Em cada folha foram depositadas 50 µL de suspensão bacteriana em solução salina (NaCl 0,85%) cuja concentração era de aproximadamente 10^7 UFC mL⁻¹ (O.D._{540nm}=1,15; Anexo 1) obtida por meio de culturas cultivadas em meio sólido 523 a 28 °C no escuro por 24 h. As folhas inoculadas foram incubadas em câmara de crescimento a 28 °C e avaliou-se diariamente a presença da doença. Folhas de eucalipto tratadas com solução salina (NaCl 0,85%) e o isolado tipo IBSBF 435 de *Erwinia psidii* (Rodrigues Neto et al., 1987) foram usadas como comparadores.

4-Teste de especificidade do hospedeiro

Um dos isolados bacterianos de *Eucalyptus* (C12 – Tabela 2) foi utilizado para avaliar sua patogenicidade em goiabeira (*Psidium guajava*) nas variedades Paluma e Pedro Sato, enquanto o isolado tipo IBSBF 435 de *Erwinia psidii*, proveniente da goiabeira, foi utilizado para avaliar a patogenicidade no eucalipto. Para tal, foi utilizado o procedimento de inoculação em folhas destacadas como descrito no item 3.



Figura 1. Caixa plástica do tipo gerbox contendo as folhas do clone 6061 (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*) destacadas para o teste de patogenicidade.

5-Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando três genes *housekeeping*: *gapA*, *recA* e *rpoB* (Tabela 1). As quantidades de reagentes utilizados na PCR foram as mesmas descritas para o gene 16S rDNA. Assim como no teste de patogenicidade em folha destacada, o isolado tipo de *E. psidii* IBSBF 435 foi incluído nessas análises.

Para o gene *gapA* a reação foi conduzida sobre as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e 30 seg, finalizando com uma desnaturação a 72 °C por 5 min. Para o gene *recA*, a reação de PCR consistiu em uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 52 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Para o gene *rpoB* a reação foi realizada com uma etapa de desnaturação a 95 °C por 5 min, 3 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 60 °C por 2 min e 15 seg e alongação a 72 °C por 1min e 15 seg, seguidos por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 35 seg, anelamento a 60 °C por 1

min e 15 seg e alongação a 72 °C por 1 min e 15 seg com 7 min de alongação final a 72 °C.

As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-100 (MJ Research) e os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1,4 % a 100 V durante 60 min. Para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o padrão de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta pelo sistema de fotodocumentação L.PIX (Loccus Biotecnologia). Em seguida, os fragmentos de tamanho esperado foram purificados usando o Kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit, (GE Healthcare).

O sequenciamento dos fragmentos de DNA foi realizado usando sequenciador Megabace 1000 (GE Healthcare) e os oligonucleotídeos usados para amplificação do DNA foram os mesmos usados no sequenciamento. As sequências foram analisadas e editadas usando o Sequencer 4.5 (Gene Codes) e posteriormente alinhadas usando o Clustal W v.1.5 (Thompson et al., 1992) seguido de ajustes manuais no software MEGA 5.00 (Tamura et al., 2011), quando necessário. Como os genes *gapA*, *recA* e *rpoB* são todos codificadores de proteína, foi verificado se a inserção de *gaps* no alinhamento não alterou a codificação da proteína pelo código genético.

Para as análises filogenéticas, além dos isolados obtidos neste trabalho, foram escolhidas no GenBank sequências de DNA dos genes *gapA*, *recA* e *rpoB* pertencentes a outras espécies patogênicas da família Enterobacteriaceae (gêneros *Brenneria*, *Dickeya*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pectobacterium*). Foram utilizadas 36, 35 e 39 sequências de isolados escolhido no GenBank para os genes *gapA*, *recA* e *rpoB* respectivamente (Anexos 2, 3, 4). Após uma avaliação inicial, novas árvores foram construídas somente com as espécies que se mostraram mais próximas na análise inicial, ou pertencentes ao gênero *Erwinia*.

Os métodos da Máxima Parsimônia (MP) e Inferência Bayesiana (BA) foram utilizados para construir as árvores filogenéticas. Realizou-se também a análise concatenada dos genes *gapA*, *recA* e *rpoB*. A análise de Máxima Parsimônia foi realizada no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003) pelo método de busca heurística usando o algoritmo TBR (*Tree Bisection Reconnection*) para troca de ramos. As sequências foram adicionadas pelo método de *stepwise* de forma aleatória com 100 repetições. A estabilidade do ramos foi verificada com um *bootstrap* com 1000 repetições. A Inferência Bayesiana foi realizada utilizando o programa MrBayes 3.1.2 (*Bayesian Inference of Phylogeny*) (Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

O modelo de substituição foi escolhido com base no critério de informação de Akaike (AIC) do MrModelTest 3.2 (Nylander, 2004). A probabilidade a *posteriori* na distribuição de árvores foi criada usando algoritmo MCMC (*Metropolis-coupled Markov Chain Mont Carlo*) de duas cadeias iniciadas a partir de uma árvore ao acaso, com 10 milhões de gerações executadas, sendo descartadas as 25% das primeiras árvores. A convergência do MCMC e o tamanho efetivo da amostra foram checados usando o programa Tracer 1.4 (Rambaut & Drummond, 2007). As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas no programa FigTree 1.3.1. (<http://tree.bio.ac.uk/software>).

6- Testes bioquímicos

Os testes bioquímicos realizados foram os mínimos necessários para identificar *E. psidii* segundo Marques et al. (2007) e constituíram-se de gram, oxidação e fermentação de carboidratos (OF), catalase, urease, redução de nitrato a nitrito, degradação de pectato, motilidade, produção de ácido a partir de manitol e rafinose e reação de hipersensibilidade (HR). Os testes foram conduzidos segundo Schaad (2001). A reação de hipersensibilidade foi realizada em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), onde uma suspensão de inóculo, como a descrita nas inoculações em folha destacada, foi injetada na folhas com o auxílio de uma seringa. De 24 a 48 horas após a inoculação avaliou-se a presença de HR. Folhas injetadas com solução salina (NaCl 0,85%) serviram como testemunhas.

3-RESULTADOS

1- Caracterização sintomatológica da doença, coleta de amostras e obtenção das culturas puras

Em geral, os sintomas da doença caracterizam-se por seca de ponteiros nos ramos jovens das plantas. Inicialmente observa-se um arroxamento do pecíolo e das nervuras cujas folhas posteriormente murcham e secam. Manchas de aspecto encharcado adjacentes à nervura central das folhas também foram observadas. Nos ramos jovens de algumas plantas observou-se exsudação macroscópica de pus bacteriano e escurecimento do tecido xilemático (Figura 2A, B, C, D, E). Em laboratório, comumente pôde ser observada exsudação bacteriana em gota sob

microscópio de luz (200X) a partir de tecidos apresentando os sintomas da doença. Em condições de campo, a enfermidade foi observada em híbridos de *E. urophylla* x *E. grandis*, *E. grandis* e *E. dunnii*. Talhões com materiais suscetíveis apresentaram a maioria das plantas infectadas.

Foram obtidas 13 culturas puras a partir de tecidos de plantas infectadas. Dessas, doze são provenientes do Rio Grande do Sul e uma de São Paulo (Tabela 2).

2- Identificação inicial dos patógenos pela análise da região parcial do gene 16S rDNA

As sequências parciais do gene 16S rDNA apresentaram cerca de 1300 pb para cada isolado. A comparação dessas sequências com outras disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando o programa Blastn indicou valores de identidade superiores a 98% para os 13 isolados obtidos com a bactéria fitopatogênica *Erwinia psidii* (Tabela 2).

As sequências do gene 16S rDNA dos isolados estudados tiveram as assinaturas nucleotídicas idênticas àquelas descritas por Hauben et al., (1998) para o gênero *Erwinia* que são (A, A, C, G, G, C, G, G, G, C, G, C, C, C e G nas posições 408, 595, 599, 639, 646, 839, 847, 987, 988, 989, 1216, 1217, 1218, 1308 e 1329, de acordo com a sequência do gene 16S rDNA de *Escherichia coli* (número de acesso no GenBank: J01695). Assim como observado por Geider et al. (2006), em estudo com espécies do gênero *Erwinia*, uma mudança foi observada para as posições 594 e 598 as quais apresentaram as bases A e C.

3-Testes de Patogenicidade em mudas e folhas destacadas de eucalipto

Os sintomas iniciais foram observados seis dias após a inoculação e caracterizavam-se pelo escurecimento da nervura central, morte das brotações e lesões necróticas adjacentes a nervura central (Figura 3 A, B, C e D). As plantas testemunhas não apresentaram os sintomas descritos e as bactérias foram reisoladas das plantas infectadas cumprindo o postulado de Koch.

Em folhas destacadas os primeiros sintomas foram observados aos três dias posteriores à inoculação sendo que aos sete dias todas as folhas apresentavam sintomas da enfermidade que consistiram em escurecimento da nervura central que progressivamente expandiu para as nervuras adjacentes e resultou em lesões encharcadas do tipo anasarca (Figura 4 A e B). A partir dos tecidos infectados a

bactéria foi reisolada. Folhas tratadas apenas como solução salina não apresentaram os sintomas da doença.

4- Teste de especificidade do hospedeiro

Os isolados de *E. psidii* C12 e IBSBF 435 foram mutuamente patogênicos ao clone 6061 eucalipto e às variedades Paluma e Pedro Sato de goiabeira. (Figura 5 A e B). Estes resultados sugerem a inexistência de especificidade de hospedeiros para esta espécie.

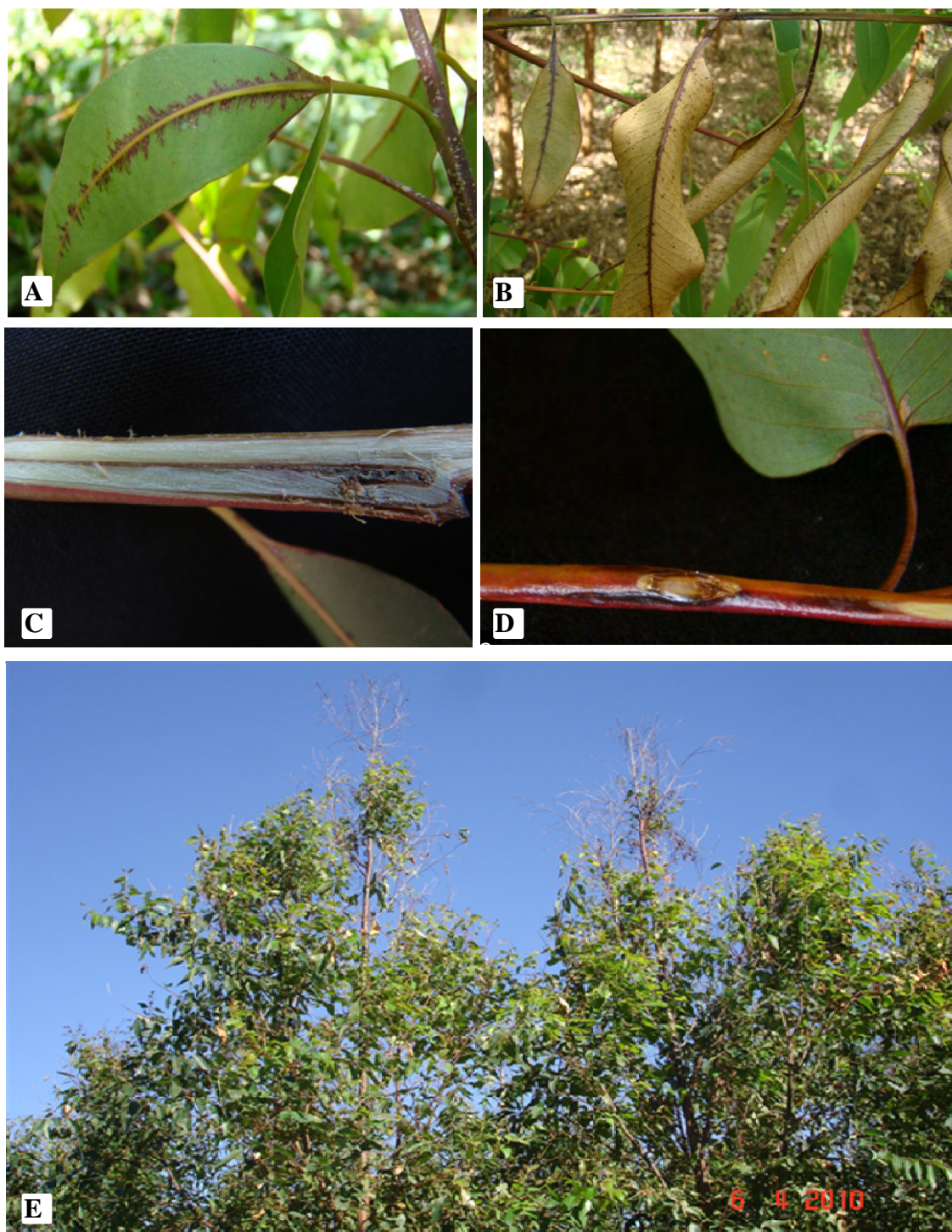


Figura 2. Sintomas da seca de ponteiros do eucalipto causada por *Erwinia psidii*. A- Mancha de aspecto encharcado, lesão do ramo e bronzeamento da nervura afetada; B- secamento de folhas e ramos; C- escurecimento da medula; D- exsudação macroscópica ; E- plantio afetado.

Tabela 2. Identificação preliminar dos isolados bacterianos estudados neste trabalho a partir da comparação da sequência do gene 16S rDNA com sequências depositadas no GenBank e informações acerca da coleta, hospedeiro, local e coletor.

| Isolado | Espécie identificada e % de identidade pela comparação do 16S rDNA usando o programa Blastn* | Espécie hospedeira | Local de coleta | Tecido | Coletor | Isolamento |
|---------|--|---|----------------------|-----------------|--------------------|--|
| A2 | <i>Erwinia psidii</i> (100%) | <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> | Rosário do Sul- RS | ramo | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |
| A6 | <i>Erwinia psidii</i> (99%) | <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> | Rosário do Sul- RS | ramo | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |
| A16 | <i>Erwinia psidii</i> (99%) | <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> | Rosário do Sul- RS | ramo | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |
| C7 | <i>Erwinia psidii</i> (99%) | <i>E. dunnii</i> | Guafba- RS | ramo | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |
| C8 | <i>Erwinia psidii</i> (99%) | <i>E. dunnii</i> | Guafba- RS | folha (nervura) | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |
| C10 | <i>Erwinia psidii</i> (99%) | <i>E. dunnii</i> | Guafba- RS | folha (nervura) | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |
| C11 | <i>Erwinia psidii</i> (99%) | <i>E. dunnii</i> | Guafba- RS | folha (nervura) | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |
| C12 | <i>Erwinia psidii</i> (99%) | <i>E. dunnii</i> | Guafba- RS | caule | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |
| G4 | <i>Erwinia psidii</i> (98%) | <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> | Guafba- RS | pecíolo | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |
| G6 | <i>Erwinia psidii</i> (99%) | <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> | Guafba- RS | folha | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |
| LW5 | <i>Erwinia psidii</i> (99%) | <i>E. grandis</i> | Lençóis Paulista- SP | folha | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |
| M24 | <i>Erwinia psidii</i> (99%) | <i>E. dunnii</i> | Rosário do Sul- RS | caule | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |
| M26 | <i>Erwinia psidii</i> (99%) | <i>E. dunnii</i> | Rosário do Sul- RS | pecíolo | Acelino C. Alfenas | Natália R. Fonseca e Ramon U. Teixeira |

*Todas as comparações realizadas usando o programa Blastn apresentaram um E-value = 0.

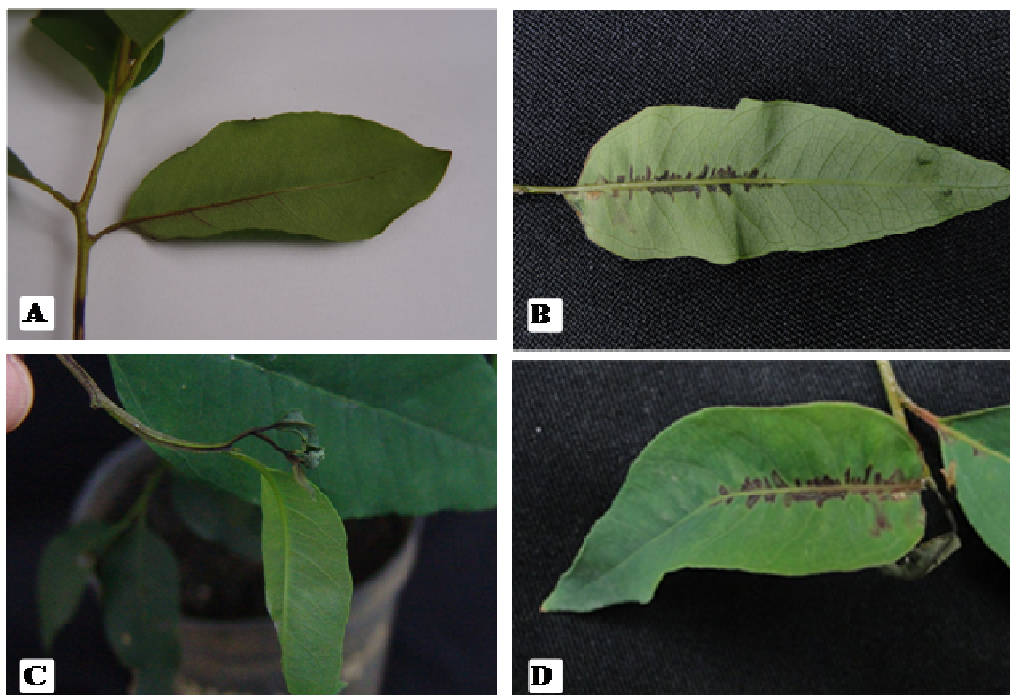


Figura 3. Sintomas em mudas suscetíveis à *Erwinia psidii* do clone 6061 (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*) com 30 dias de transplantio. A- Escurecimento da nervura central; B- necroses adjacentes a nervura central (visão abaxial), C- morte das brotações; D- necroses adjacentes a nervura central (visão adaxial).



Figura 4. Sintomas em folhas destacadas do clone 6061 (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*). A- Escurecimento inicial da nervura central; B- necrose da nervura central, secundária e lesão do tipo anasarca no tecido foliar.

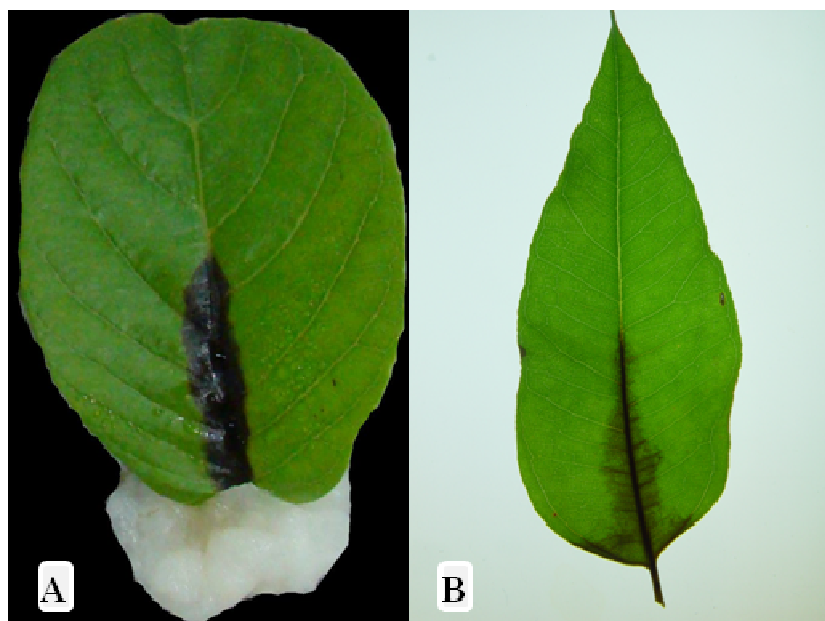


Figura 5. Teste de especificidade do hospedeiro. A- Inoculação em folhas destacadas de goiaba (*Psidium guajava*) variedade Pedro Sato usando o isolado C12 proveniente de eucalipto. B-inoculação em folhas destacadas do clone 6061 (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*) usando o isolado tipo de *Erwinia psidii* IBSBF 435 obtido de goiaba.

5-Análises filogenéticas

Foram obtidas sequências parciais de aproximadamente 490, 720 e 790 pares de base (pb) para os genes *gapA*, *recA*, *rpoB*, respectivamente para os isolados estudados, assim como para o isolado tipo de *E. psidii* (IBSBF 435). Entretanto, para os estudos de filogenia foram comparados 377, 532 e 567 pb, respectivamente, para os genes acima citados. O comprimento total do alinhamento para a árvore concatenada com os genes *gapA*, *recA* e *rpoB* foi de 1331 pb.

O número de sítios informativos para a parcimônia foi de 171 (*gapA*), 196 (*recA*), 87 (*rpoB*), e 245 (árvore concatenada). O número de sítios constantes foi de 170 (*gapA*), 300 (*recA*), 419 (*rpoB*) e 932 (árvore concatenada) e o número de sítios variáveis e informativos para a parcimônia foi de 36 (*gapA*), 36 (*recA*), 61 (*rpoB*), e 154 (árvore concatenada). O melhor modelo evolucionário selecionado pelo MrModeltest 2.3 para Análise Bayesiana pelo AIC, assim como seus parâmetros, para cada gene na análise individual e na análise concatenada está descrito na Tabela 3.

As árvores filogenéticas para os genes estudados e a árvore concatenada dos genes tanto pela Análise Bayesiana (Figuras 6, 7, 8, 9) quanto pelo método de

Máxima Parcimônia (dados não mostrados), mostraram um agrupamento dos isolados deste trabalho com o isolado tipo de *Erwinia psidii* (IBSBF 435) e com outros isolados dessa espécie depositados no GenBank. Esse agrupamento foi sustentado por ramos com altos valores de *bootstrap* e probabilidade *posteriori* (100 e maior que 0,9, respectivamente). Nos anexos 2, 3 e 4 estão apresentadas as árvores filogenéticas construídas pelo método Bayesiano contendo os isolados obtidos neste trabalho com outras espécies de gêneros próximos da família Enterobacteriaceae.

Tabela 3. Modelos selecionados pelo MrModel 2.3 para Análise Bayesiana pelo AIC.

| Análise individual de cada gene* | | |
|---|---------------|----------------|
| Gene | Modelo | I+G** |
| <i>gapA</i> | SYM+G | -; 0.4265 |
| <i>recA</i> | SYM+I+G | 0.5632; 0.7763 |
| <i>rpoB</i> | SYM+I+G | 0.5623; 0.6670 |
| Árvore concatenada | | |
| <i>gapA</i> | SYM+G | -; 0.3903 |
| <i>RecA</i> | SYM+I+G | 0.5453; 0.8486 |
| <i>rpoB</i> | SYM+I+G | 0.5454; 0.7614 |

*Algumas seqüências usadas na análise individual foram diferentes das usadas na árvore concatenada para cada gene. ** I=Proporção se Sítios Invariáveis; G= Correção Gama.

6-Testes bioquímicos

Todos isolados obtidos, assim como o isolado tipo de *E. psidii* (IBSBF 435) apresentaram KOH positiva, o que os classifica como gram negativos, reação positiva para o teste de OF (oxidação e fermentação de carboidratos), sendo então anaeróbicos facultativos e catalase positiva. Os testes de urease, reação de redução de nitrato a nitrito e o teste de degradação de pectato apresentaram resultados negativos. Os testes de motilidade e HR foram positivos, exceto o teste de HR para o isolado IBSBF 435. Ácido foi produzido a partir do carboidrato manitol, mas não a partir de rafinose (Tabela 4). De acordo com os testes empregados os isolados obtidos neste estudo são *E. psidii*.

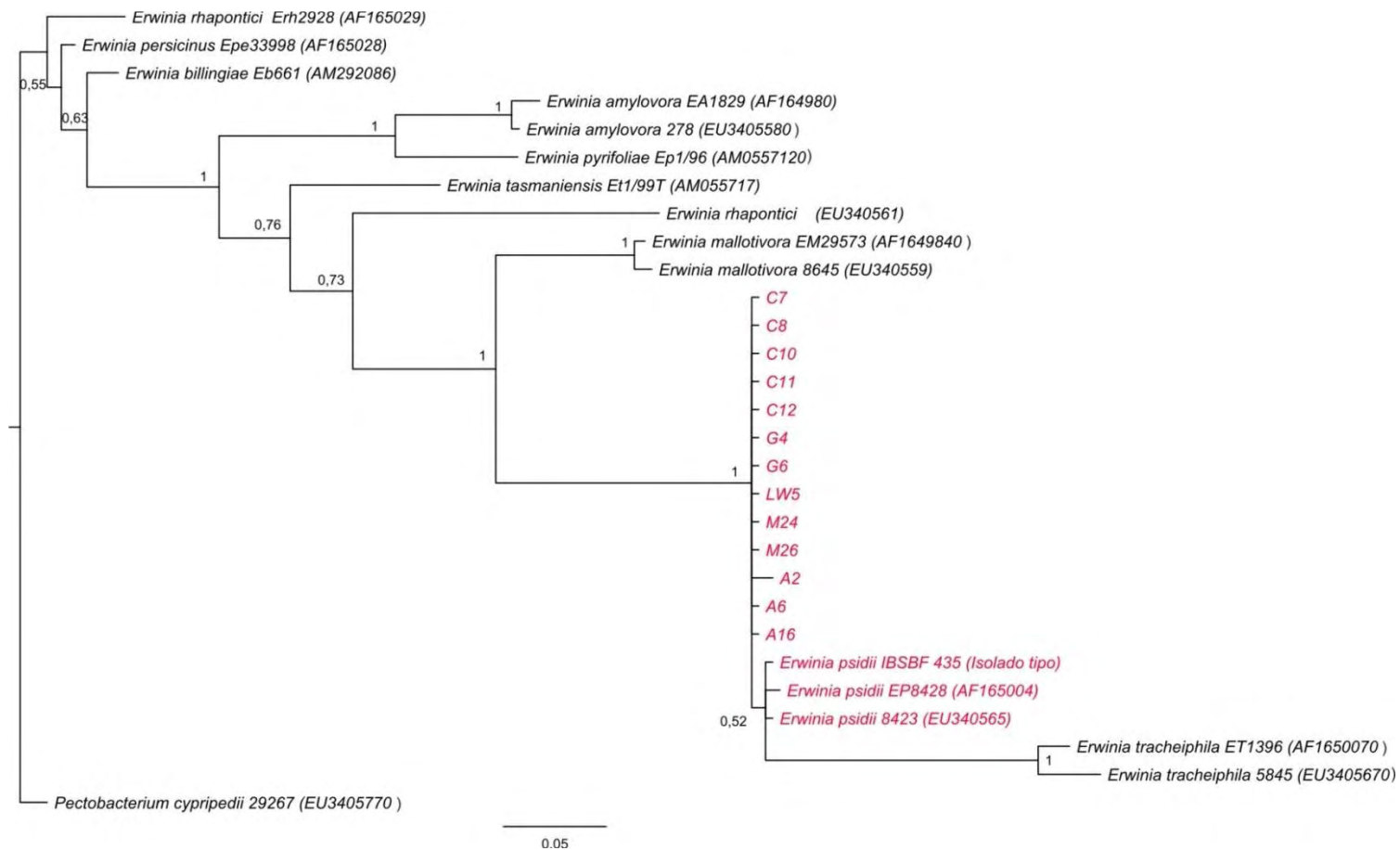


Figura 6. Árvore filogenética construída para as sequências do gene *gapA* pelo método de Inferência Bayesiana. Os valores de probabilidade *posteriori* estão indicados no ramos. *Pectobacterium cyripedi* foi usada como *outgroup*. A identificação do isolado e o número de acesso no GenBank (entre parênteses) estão indicados à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítio. Em vermelho estão destacados os isolados de *Erwinia psidii* estudados por este trabalho e os obtidos do GenBank.

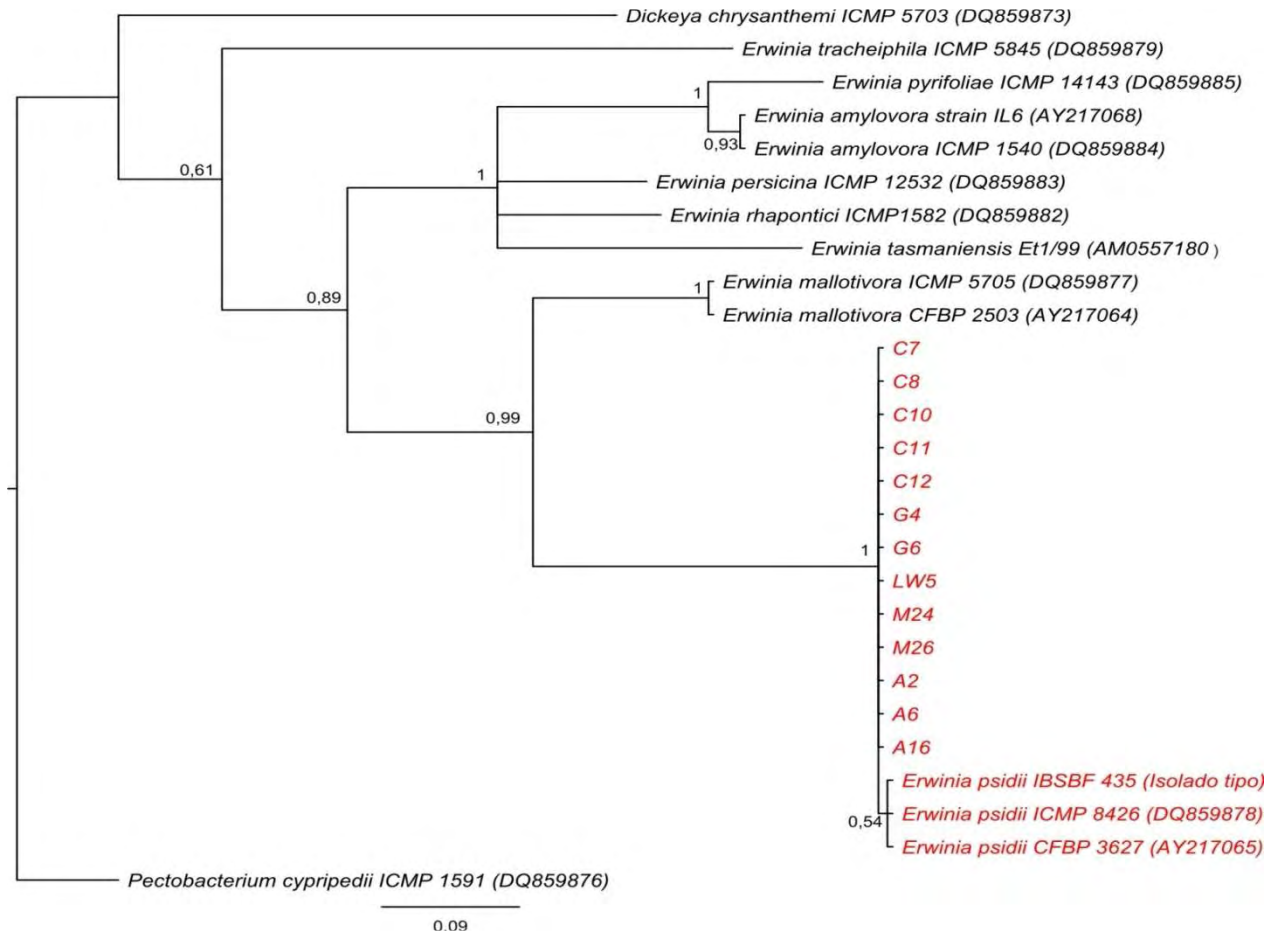


Figura 7. Árvore filogenética construída para as sequências do gene *recA* pelo método de Inferência Bayesiana. Os valores de probabilidade *posteriori* estão indicados no ramos. *Pectobacterium cyripedii* foi usada como *outgroup*. A identificação do isolado e o número de acesso no GenBank (entre parênteses) estão indicados à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítio. Em vermelho estão destacados os isolados de *Erwinia psidii* estudados por este trabalho e os obtidos do GenBank.

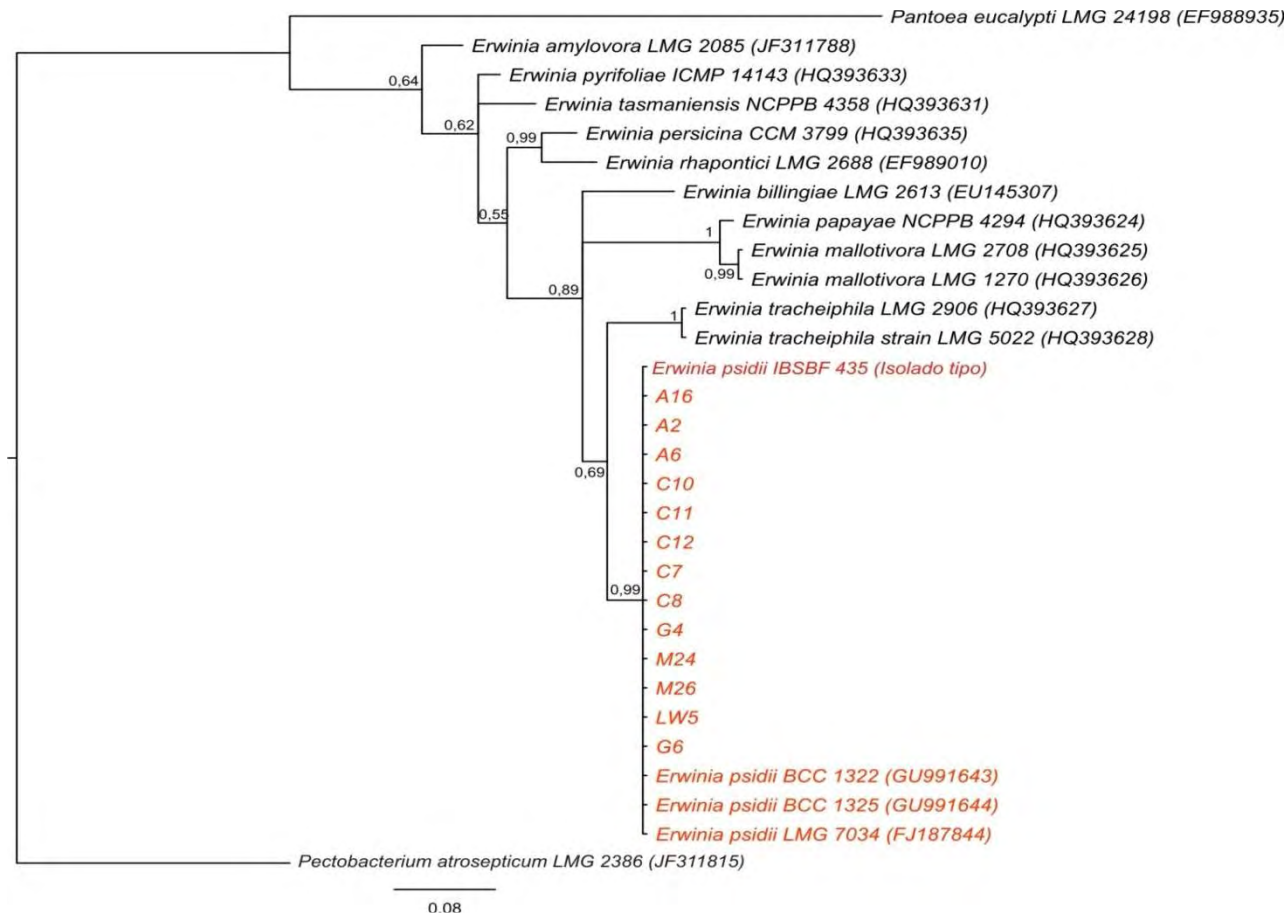


Figura 8. Árvore filogenética construída para as sequências do gene *rpoB* pelo método de Inferência Bayesiana. Os valores de probabilidade *posteriori* estão indicados no ramos. *Pectobacterium atrosepticum* foi usada como *outgroup*. A identificação do isolado e o número de acesso no GenBank (entre parênteses) estão indicados à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítio. Em vermelho estão destacados os isolados de *Erwinia psidii* estudados por este trabalho e os obtidos do GenBank.

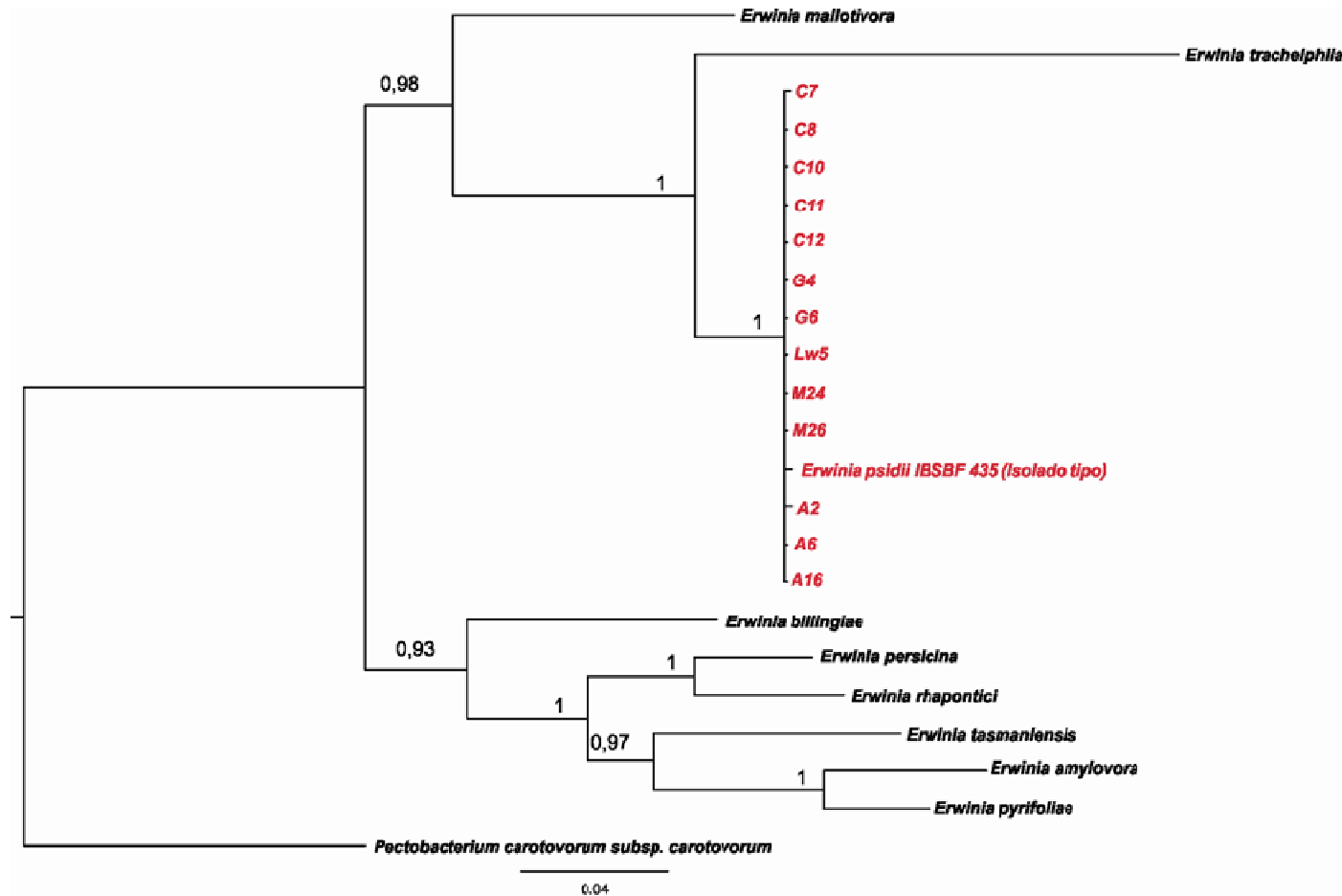


Figura 10. Árvore filogenética com os genes *gapA*, *recA* e *rpoB* concatenados construída pelo método de Inferência Bayesiana. Os valores de probabilidade *posteriori* estão indicados nos ramos. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* foi usada como *outgroup*. A identificação do isolado e o número de acesso no GenBank estão indicados no Apêndice 5. As barras indicam a fração de substituição por sítio. Em vermelho estão destacados os isolados de *Erwinia psidii* estudados por este trabalho juntamente com o isolado tipo.

Tabela 4. Testes bioquímicos para confirmação da identidade dos isolados bacterianos como sendo da espécie *Erwinia psidii*.

| Isolado | KOH | OF | Catalase | Urease | Redução de Nitrato | Degradação de Pectato | Motilidade | HR | Ácido a partir de Manitol | Ácido a partir de Rafinose |
|---------|-----|----|----------|--------|--------------------|-----------------------|------------|----|---------------------------|----------------------------|
| A2 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| A6 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| A16 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| C7 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| G4 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| G6 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| C8 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| C10 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| C11 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| C12 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| M24 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| M26 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| LW5 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| 435* | - | + | + | - | - | - | + | - | + | - |

* Espécie Tipo *Erwinia psidii* isolado IBSBF 435 (Rodrigues Neto et al., 1987).

4-DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato de *Erwinia psidii* como agente etiológico da seca de ponteiros do *Eucalyptus* spp. no Brasil. A doença foi relatada recentemente no Uruguai e na Argentina (Coutinho et al., 2011) em plantios jovens de *E. grandis*, *E. dunnii*, *E. globulus* e *E. maidenii*. A identificação do patógeno foi realizada inicialmente pela comparação da sequência parcial do gene 16S rDNA de 13 isolados, obtidos de plantas com sintomas da doença, com sequências de espécies bacterianas disponíveis no GenBank. O resultado foi corroborado pela análise filogenética, tanto pelo Método de Máxima Parcimônia quanto pelo método de Inferência Bayesiana, de sequências parciais dos genes *gapA*, *recA* e *rpoB* e, também, por testes bioquímicos. Ademais, a reprodução dos sintomas da doença em plantas jovens e em folhas destacadas de *Eucalyptus* (clone 6061) confirmou a patogenicidade de *E. psidii* ao eucalipto. O método de inoculação por folha destacada mostrou-se eficiente, rápido, prático e permitiu maior controle das condições ambientais.

Nas árvores filogenéticas, o agrupamento dos isolados obtidos por este trabalho com outros isolados de *E. psidii*, inclusive com o isolado tipo (IBSBF 435), foi suportado por altos valores de *bootstrap* e probabilidade *posteriori*, o que se repetiu na análise concatenada dos genes. Uma pequena diferença foi identificada entre os isolados de *E. psidii* de *P. guajava* e de *Eucalyptus* spp. para os genes *gapA* e *recA*. Porém, devido ao curto tamanho de ramo, e aos baixos valores de *bootstrap* e probabilidade *posteriori*, essa diferença não indicou que se tratavam de espécies diferentes. Além disso, as análises filogenéticas utilizando o gene *rpoB* e os genes concatenados não suportou essa diferença entre os isolados de *E. psidii* para os diferentes hospedeiros.

Os genes *gapA*, *recA*, *rpoB* e 16S rDNA utilizados neste estudo para identificação de *E. psidii* vem sendo utilizados em outros trabalhos envolvendo a família Enterobacteriaceae (Lawrence et al., 1991; Brown et al., 2000; Geider et al., 2006 e 2009; Waleron et al., 2002; Brady et al., 2008 e 2009; Coutinho et al.; 2011). De acordo com a análise filogenética, *E. mallotivora* foi uma das espécies filogeneticamente mais próxima aos isolados deste trabalho, porém agrupou-se separadamente e também em ramos bem sustentados. O mesmo ocorreu para a espécie *E. tracheiphila* para os genes *rpoB* e *gapA* e para análise concatenada dos genes. A proximidade filogenética de *E. tracheiphila* com *E. psidii* já havia sido relatada em estudos anteriores (Geider et al, 2006 e 2009, Naum et al. 2010). Já a bactéria *Pantoea ananatis*, igualmente patogênica ao *Eucalyptus* spp. (Coutinho et al., 2002), mostrou-se filogeneticamente distante do isolados aqui estudados.

Os testes bioquímicos apresentaram resultados compatíveis para identificação dos isolados como *E. psidii*, corroborando a identificação pelo gene 16s rDNA e pelas análises filogenéticas. O teste de HR, descrito por Marques et al. (2007) como negativo para *E. psidii* foi positivo para todos os isolados estudados neste trabalho. Apesar de apresentar resultado contraditório, esse resultado é compatível com o descrito por Coutinho et al. (2011) para *E. psidii* de *Eucalyptus* spp. Além disso, Romeiro (2001) ressalta que espécies de *Erwinia* apresentam comportamento errático, algumas vezes induzindo HR típica e algumas vezes comportando-se como saprófitas deixando de incitar qualquer sintoma visível.

A ocorrência de doenças de etiologia bacteriana em *Eucalyptus* spp. é relativamente recente, destacando-se, principalmente, a murcha vascular causada por *Ralstonia solanacearum* (Sudo et al. 1983) e a mancha foliar causada por

Xanthomonas axonopodis, *Pseudomonas cichorri* e para bactérias não identificadas da família Rhizobiaceae (Gonçalves et al. 2008). Porém, mesmo consideradas recentes a ocorrência de doenças bacterianas têm levado a grandes perdas na eucaliptocultura. (Alfenas et al., 2006 e 2009). A identificação da seca de ponteiros incitada por *E. psidii* exemplifica mais uma potencial doença, causada por bactéria, como fator limitante à eucaliptocultura, como ocorre atualmente para o cultivo da goiabeira em alguns estados brasileiros (Marques et al., 2007).

A ocorrência de *E. psidii* em *Eucalyptus* spp foi provavelmente favorecida tanto pela expansão da doença em goiabeira para outras regiões do país, quanto pela expansão da eucaliptocultura e introdução de novas espécies. *Erwinia psidii* foi descrita pela primeira vez causando seca de ponteiros em goiaba (Rodrigues Neto et al., 1987) no estado de São Paulo e nos anos posteriores foi identificada ocasionando a mesma doença em diversas outras regiões do país como em Minas Gerais (Romeiro et al, 1993), Espírito Santo (Oliveira et al., 2000), Paraná (Coelho et al., 2002) e Distrito Federal (Uesugi et al., 2001). Por sua vez, o eucalipto hoje é cultivado na maioria dos estados do Brasil, onde a cada ano novos materiais genéticos são desenvolvidos e introduzidos nessas regiões.

Estudos sobre a diversidade de isolados de *E. psidii* coletados de diferentes regiões do Brasil, baseados em análises de REP, ERIC e BOX-PCR indicam que este patógeno apresenta baixa variabilidade genética (Teixeira et al., 2009). Entretanto, com a descoberta da doença em *Eucalyptus* spp., estudos adicionais são necessários para avaliar a diversidade genética do patógeno, envolvendo isolados de ambos os hospedeiros.

Rodrigues Neto et al. (1987) ao descreverem *E. psidii* em goiabeira realizaram testes de patogenicidade em outras espécies de Myrtaceas, dentre elas *Corymbia citriodora* e *E. saligna*. Nesses testes, *E. psidii* foi capaz de infectar, além de goiaba, araçá (*Psidium cattleianum*), jambo-vermelho (*Eugenia jambolana*) e melaleuca (*Melaleuca viridiflora*). Entretanto, não foi patogênica à *C. citriodora* e *E. saligna*. Aparentemente, a patogenicidade de *E. psidii* a *Eucalyptus* spp. está mais relacionada à introdução de novas espécies e híbridos, do que a uma especiação do patógeno, uma vez que ambos os isolado tipo de *E. psidii* IBSBF 435 de goiabeira e C12 de eucalipto foram mutuamente patogênicos às duas espécies hospedeiras. Neste trabalho, além do clone 6061 (híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*), a doença foi observada em plantios clonais de *E. grandis* e seminais de *E. dunnii*. Já Coutinho et

al. (2011) observaram a doença em plantios de *E. grandis*, *E. dunnii*, *E. globulus* e *E. maidenii*. Assim, como as espécies inoculadas por Rodrigues Neto et al. (1987) tratavam-se de espécies diferentes das que foram observadas com os sintomas de seca de ponteiros, essas podem ser fontes de resistência a *E. psidii*.

Em goiaba as principais medidas de controle recomendadas para a *E. psidii* são o corte e a destruição dos ramos atacados e não há relatos de resistência genética à doença (Marques et al., 2007). Entretanto, em eucalipto medidas de controle semelhantes tornam-se inviáveis em virtude das extensas áreas cultivadas e principalmente em virtude do porte da planta. Como a ocorrência de *E. psidii* em eucalipto é recente, não há dados disponíveis sobre danos econômicos ou do real potencial do patógeno para a cultura. Dessa forma, deve-se realizar um acompanhamento de novos focos da doença e, no caso de grandes perdas, estabelecer técnicas moleculares visando a identificação rápida do patógeno e programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de clones resistentes, uma vez que no campo, essa é a melhor forma de controle de doenças florestais.

5-CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- 1 - A seca de ponteiros estudada neste trabalho é causada por *E. psidii* e constitui o primeiro relato da doença no Brasil;
- 2 - Isolados do patógeno de eucaliptos e goiabeira foram mutuamente patogênicos a ambos os hospedeiros;
- 3 - As inoculações em mudas e em folhas destacadas apresentaram resultados semelhantes, sendo que o segundo foi mais rápido e eficiente.

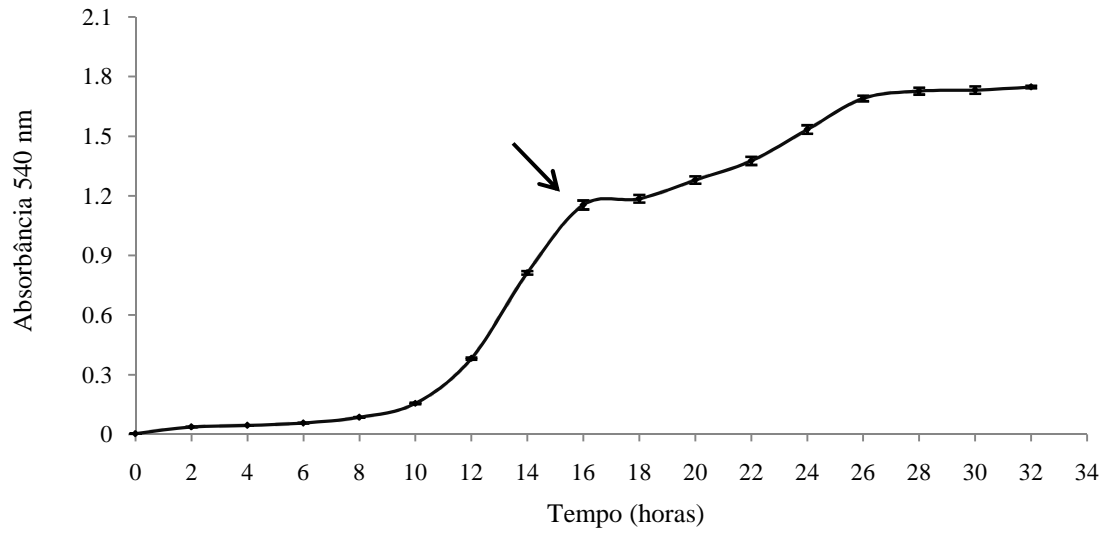
6-REFERÊNCIAS

- ABRAF. Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. Anuário estatístico da ABRAF 2011. Ano base 2010/ ABRAF. – Brasília, 2010.130 p. Acessado em 19/11/2011
- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e Doenças do Eucalipto. 2ª ed. UFV, Viçosa, MG
- Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA (2006) *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. Fitopatol Bras 31:357-366
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zheng Z, Miller W, Lipman DJ (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". Nucleic Acids Res 25:3389-3402
- Brady CL, Cleenwerck I, Venter SN, Vancanneyt M, Swings J, Coutinho TA (2008) Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). Syst Appl Microbiol 31:447–460
- Brady CL, Venter SN, Cleenwerck I, Engelbeen K, Vos de P, Wingfield MJ, Telechea N, Coutinho TA (2009) Isolation of *Enterobacter cowanii* from Eucalyptus showing symptoms of bacterial blight and dieback in Uruguay. Lett Appl Microbiol 49:461-465
- Brown EW, Davis RM, Gouk C, Van der Zwet T (2000). Phylogenetic relationships of necrogenic *Erwinia* and *Brenneria* species as revealed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol 50:2057–2068
- Coelho MVS, Mendes AP, Marques ASA (2002) Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização. Brasília: Embrapa – SPI, 8p. (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 Pathol 40: 55–60

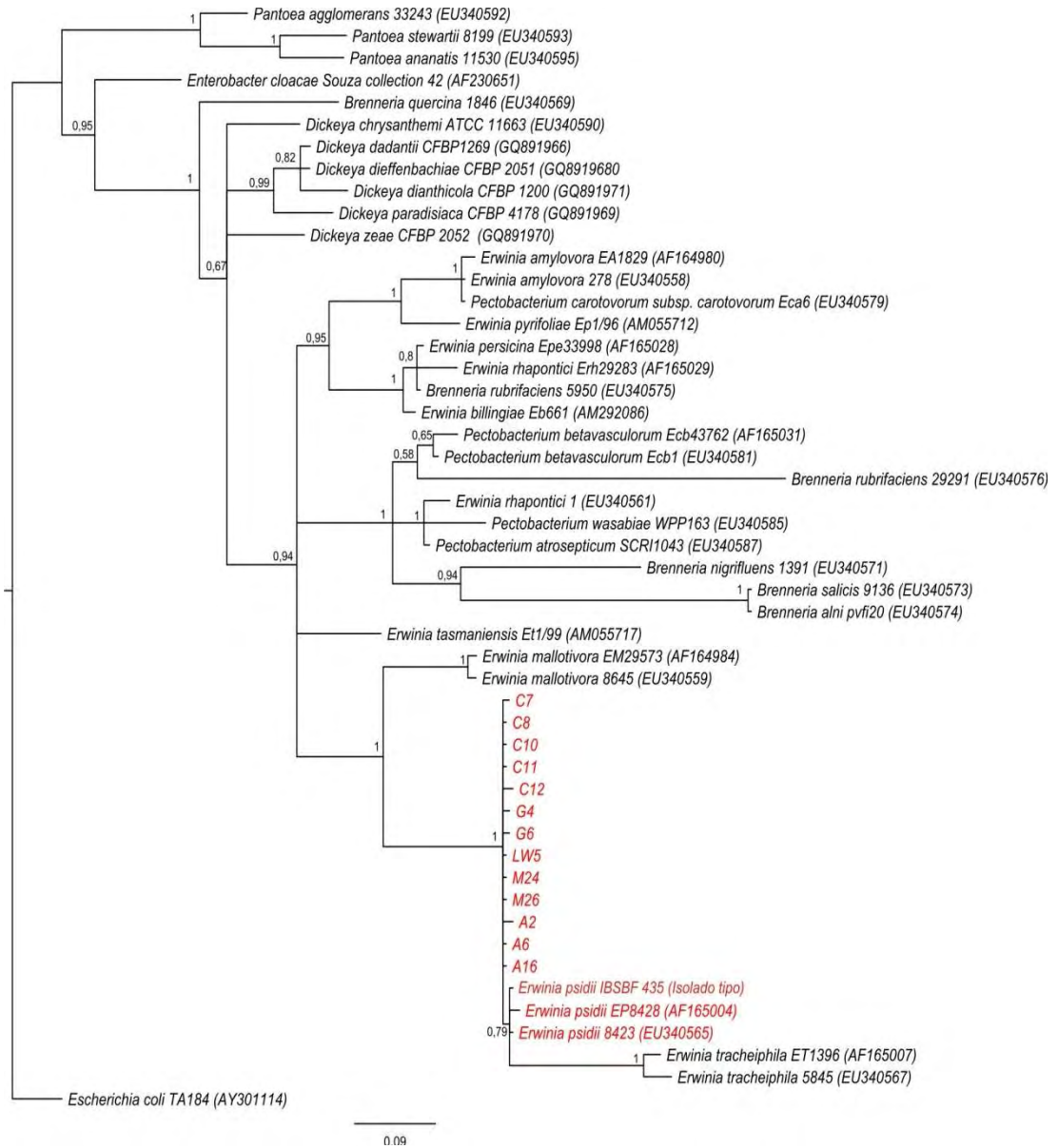
- Coutinho TA, Preisig O, Mergaert J, Cnockaert MC, Riedel K-H, Swings J, Wingfield MJ (2002) Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. *Plant Dis* 86:20–25
- Geider K, Auling G, DU Z, Jakovljevic V, Jock S, Völksch B (2006) *Erwinia tasmaniensis* sp nov, a non-phytopathogenic bacterium from apple and pear trees. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 2937-2943
- Geider K, Auling G, Jakovljevic V, Völksch B (2009) A polyphasic approach assigns the pathogenic *Erwinia* strains from diseased pear trees in Japan to *Erwinia pyrifoliae*. *Lett Appl Microbiol* 48:324-330
- Gonçalves RC, Lau D, Oliveira JR, Maffia LA, Cascardo JCM, Alfenas AC (2008) Etiology of bacterial leaf blight of eucalyptus in Brazil. *Trop Plant Pathol* 33:180–188
- Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L, Swings J (1998) Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae *Syst Appl Microbiol* 21:384–397
- Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976
- Lawrence JG, Ochman H, Hartl DL (1991) Molecular and evolutionary relationships among enteric bacteria. *J Gen Microbiol* 137: 1911–1921
- 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. *Rev Bras Frutic* 29:488-493
- Nylander JAA (2004) MrModeltest Version 2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University
- Oliveira JR, Ventura JA, Silva IT, Costa H (2000) Ocorrência da bacteriose da goiabeira, causada por *Erwinia psidii*, no estado do Espírito Santo. *Fitopatol. Bras.* 25: 328
- Rambaut A, Drummond A J (2007) Tracer v1.4., <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rodrigues Neto J, Robbs CF, Yamashiro T (1987) A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. *Fitopatol Bras* 12:345–350
- Romeiro RS (2001) Métodos em bacteriologia de plantas. UFV, Viçosa, Brasil

- Romeiro RS, Moraes RMA, Oliveira JR, Couto FAA, Resende ST (1993) Uma enfermidade da goiabeira de etiologia bacteriana no estado de Minas Gerais, Brasil. *Fitopatol Bras* 18: 283
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes Version 3.1.2: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574
- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition. APS Press, St. Paul, MN, USA
- Sudo S, Oliveira GHN, Pereira AC (1983) Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) e bracinga (*Mimosa scabrella Penth*), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E. F. SMITH. *Fitopatol Bras* 8:631
- Swofford DL (2003) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739
- Teixeira ACO, Marques ASA, Ferreira MASV (2009) Low genetic diversity among pathogenic strains of *Erwinia psidii* from Brazil. *Braz J Microbiol* 40:678–684
- Thompson JD, Higgins D, Gibson TJ (1992) CLUSTAL version W: a novel multiple sequence alignment program. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680
- Uesugi CH, Melo Filho PA, Paz-Lima ML, Moraes CA, Tomita CK, Café Filho AC, Ueno B (2001) Ocorrência de *Erwinia psidii* em goiabeira no Distrito Federal. *Summa Phytopathol* 27: 118
- Waleron M, Waleron K, Podhajaska AJ, Łojkowska E (2002) Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology* 148: 583–595
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697–703

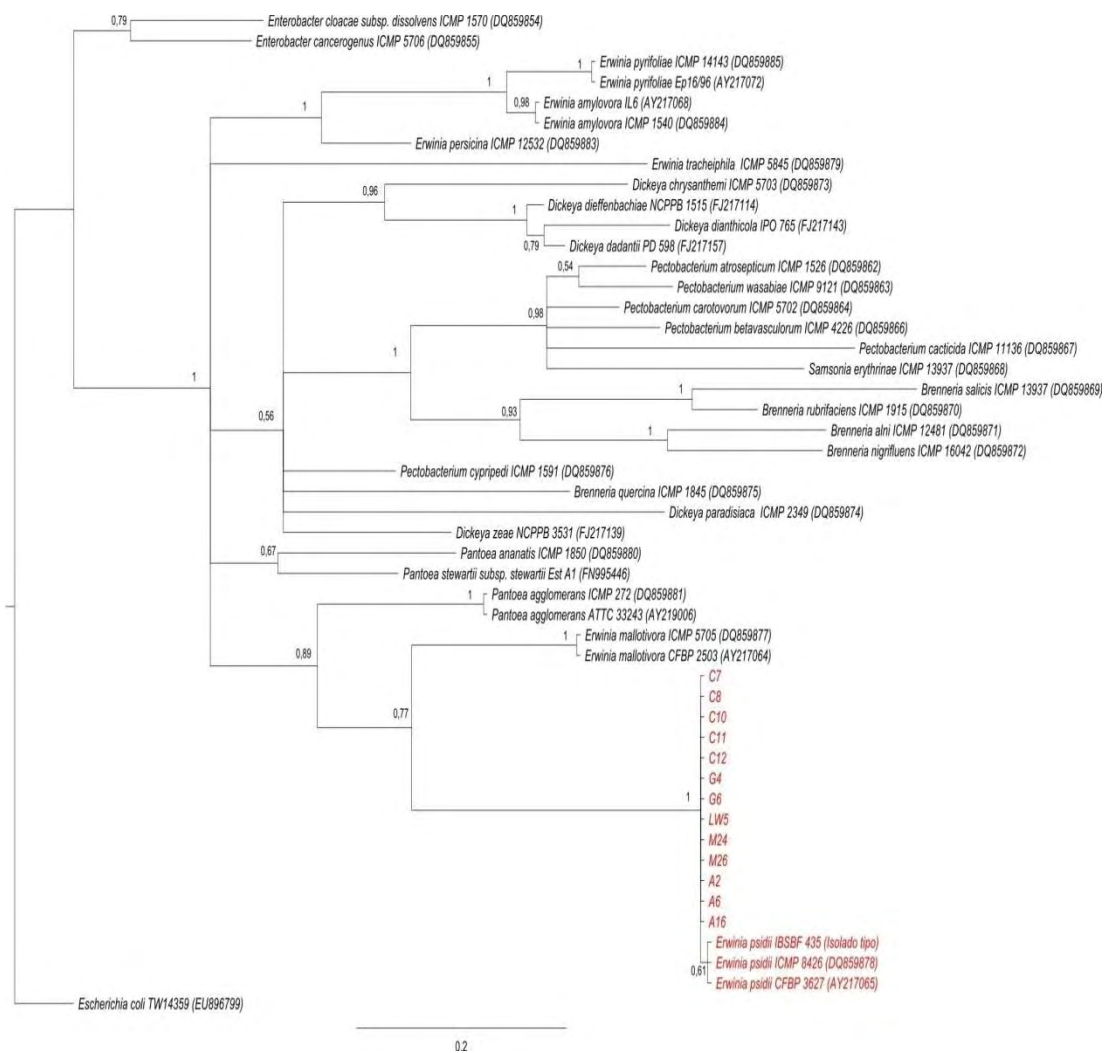
7-ANEXOS



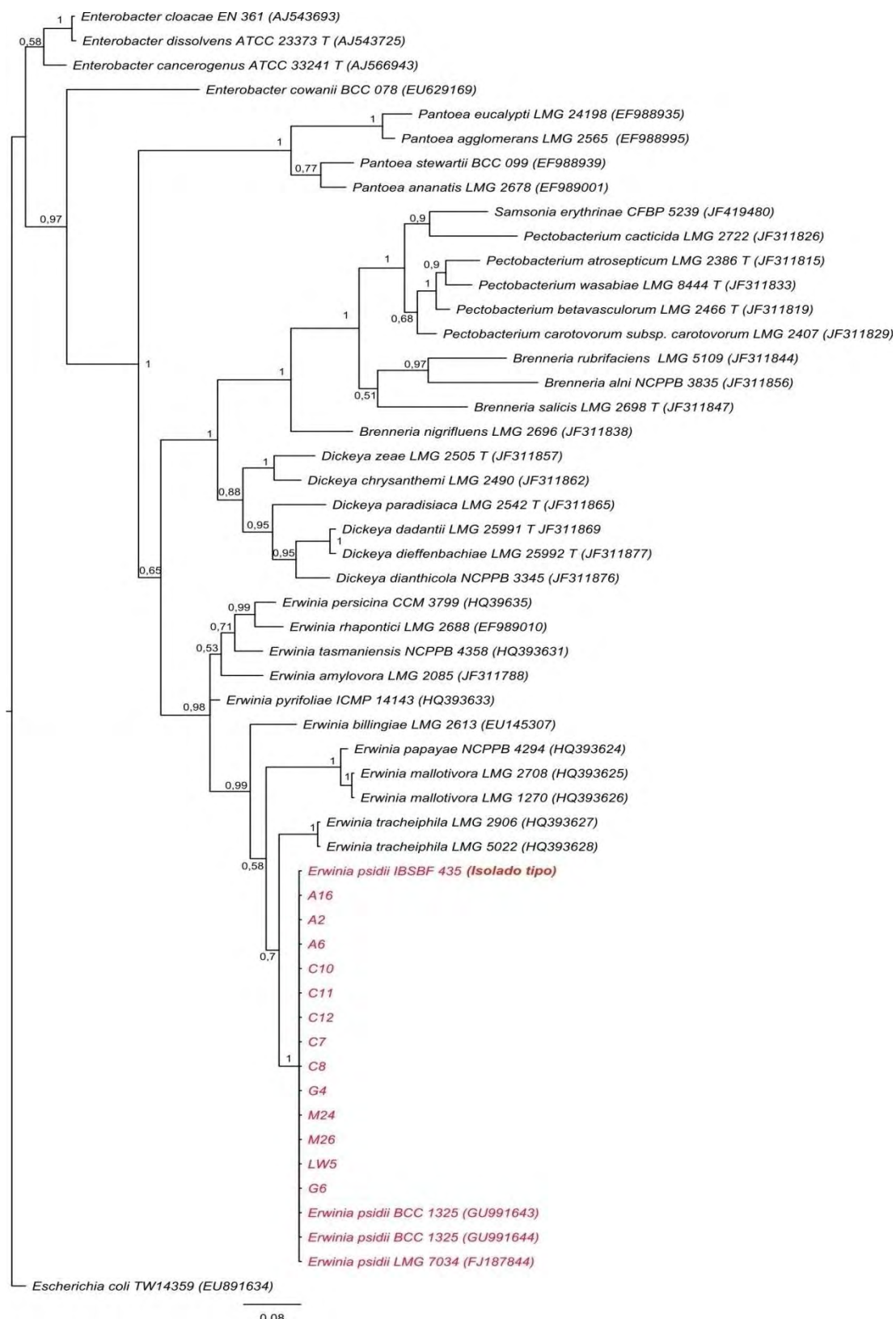
Anexo 1: Curva de crescimento em meio 523 líquido a 28 °C. O ponto de inflexão na fase de crescimento exponencial foi alcançada com 1,15 de absorbância e 16 horas (seta). As barras verticais indicam o erro padrão da média.



Anexo 2: Árvore filogenética para as sequências do gene *gapA* pelo método de Inferência Bayesiana para os isolados obtidos por este trabalho. Os valores de probabilidade *posteriori* estão indicados nos ramos. *Escherichia coli* foi usada como outgroup. A identificação do isolado e o número de acesso no GenBank (entre parênteses) estão indicados à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítio.



Anexo 3: Árvore filogenética para as sequências do gene *recA* pelo método de Inferência Bayesiana para os isolados obtidos por este trabalho. Os valores de probabilidade *posteriori* estão indicados nos ramos. *Escherichia coli* foi usada como *outgroup*. A identificação do isolado e o número de acesso no GenBank (entre parênteses) estão indicados à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítio.



Anexo 4: Árvore filogenética para as sequências do gene *rpoB* pelo método de Inferência Bayesiana para os isolados obtidos por este trabalho. Os valores de probabilidade *posteriori* estão indicados nos ramos. *Escherichia coli* foi usada como outgroup. A identificação do isolado e o número de acesso no GenBank (entre parênteses) estão indicados à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítio.

Anexo 5: Número do isolado e do acesso no GenBank (entre parênteses) para as espécies utilizadas para construir a árvore concatenada para os genes *gapA*, *recA* e *rpoB*. Números de isolados diferentes para cada gene são sinônimos segundo o site <http://www.straininfo.net>.

| Espécie | Gene | | |
|---|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | <i>gapA</i> | <i>recA</i> | <i>rpoB</i> |
| <i>Erwinia amylovora</i> | ATCC15580 (AF164975) | ICMP 1540 (DQ859884) | LMG 2024 (HQ393632) |
| <i>Erwinia billingiae</i> | Eb/ 661 (FP236843) | Eb/ 661 (FP236843) | Eb /661 (FP236843) |
| <i>Erwinia mallotivora</i> | ATCC 29573 (AF164984) | CFBP 2503 (AY217064) | LMG 2708 (HQ393625) |
| <i>Erwinia persicina</i> | ATCC 35998 (AF165028) | ICMP 12532 (DQ859883) | LMG 11254 (HQ393634) |
| <i>Erwinia pirifoliae</i> | Ep1/96 (FP236842) | Ep1/96 (FP236842) | Ep1/96 (FP236842) |
| <i>Erwinia psidii</i> | IBSBF 435* | IBSBF 435* | IBSBF 435* |
| <i>Erwinia rhapontici</i> | ATCC 29283 (AF165029) | ICMP 1582 (DQ859882) | LMG 2688 (EF989010) |
| <i>Erwinia tasmaniensis</i> | Et1/99 (CU468135) | Et1/99 (CU468135) | Et1/99 (CU468135) |
| <i>Erwinia tracheiphila</i> | ATCC 33245 (AF165009) | ICMP 5845 (DQ859879) | LMG 2906 (HQ393627) |
| <i>Pectobacterium carotovorum</i> subs. <i>carotovorum</i> | ATCC15713 (EU340580) | ATCC 15713 (AY264799) | LMG 2404 (HM359006) |

*Sequência gerada por este trabalho