

POLLYANE DA SILVA HERMENEGILDO

**SECA DE PONTEIROS CAUSADA POR *Erwinia psidii*: DIVERSIDADE
GENÉTICA DO PATÓGENO E RESISTÊNCIA EM *Eucalyptus* spp.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

H553s
2015 Hermenegildo, Pollyane da Silva, 1990-
Seca de ponteiros, causada por *Erwinia psidii* : diversidade
genética do patógeno e resistência em *Eucalyptus* spp. / Pollyane
da Silva Hermenegildo. – Viçosa, MG, 2015.
vii, 38f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Resistência a doenças e pragas. 2. *Erwinia
psidii*. 3. Diversidade genética. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 634.973766

POLLYANE DA SILVA HERMENEGILDO

**SECA DE PONTEIROS CAUSADA POR *Erwinia psidii*: DIVERSIDADE
GENÉTICA DO PATÓGENO E RESISTÊNCIA EM *Eucalyptus* spp.**

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

APROVADA: 24 de julho 2015

Lúcio Mauro da Silva Guimarães

Hélvio Gledson Maciel Ferraz

Gleiber Quintão Furtado

Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Aos meus pais, Maria Aparecida e Marcílio.

Aos meus irmãos, Mário Antônio e Carlos Eduardo.

Dedico.

AGRADECIMENTO

A Deus pela proteção em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Maria Aparecida e Marcílio pelo incentivo e por não terem medido esforços para que eu chegasse até aqui.

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

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Fapemig, ao CNPq e às empresas florestais/SIF pelo apoio financeiro e à Clonar Resistência a Doenças Florestais pelo cultivo das plantas, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho

Ao professor Acelino Couto Alfenas pela orientação, pelos ensinamentos e pela confiança durante estes anos.

A Professora Marisa Ferreira que cedeu os isolados de goiabeira

Ao Dr Lúcio M. S. Guimarães e Dr Hélvio G. M. Ferraz pelas sugestões, constante atenção e acompanhamento do trabalho.

À Dr^a Thaís Ribeiro, pela paciência, motivação, por suas contribuições e sugestões para melhorar este trabalho.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Patologia Florestal - PATOMOL pelo companheirismo e por fazer os dias de trabalho agradáveis e produtivos. Em especial agradeço ao Raul e ao Gustavo pela ajuda no desenvolvimento deste.

Ao meu irmão Mário Antônio pelos conselhos e pelo incentivo.

Ao meu namorado Evandro pela imensa paciência e pelo carinho.

À Thatianne Ferreira, Laís Barbosa, Thays Bueno, Suelen Esperidião, Thaís Ribeiro e ao Luciano Nunes pela amizade e pelos conselhos nos momentos de ansiedade e incertezas.

Aos amigos da graduação e da pós-graduação, pelas conversas e pelo apoio.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho. Obrigada!

BIOGRAFIA

POLLYANE DA SILVA HERMENEGILDO, filha de Marcílio Eustáquio Hermenegildo e Maria Aparecida da Silva Hermenegildo, nasceu na cidade de Ponte Nova, no estado de Minas Gerais, no dia 18 de fevereiro de 1990.

Em 2007 concluiu o ensino médio na Escola Estadual Dr. Mariano da Rocha localizada na cidade de Teixeiras – MG. No ano de 2008 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa, Minas Gerais, sendo o mesmo concluído no mês de julho do ano de 2013.

Em janeiro de 2010, ingressou no Laboratório de Patologia Florestal, onde foi bolsista de Iniciação Científica no projeto Etiologia e controle da murcha e morte de eucalipto de origem bacteriana, sob a orientação do Professor Acelino Couto Alfenas.

Em agosto de 2013, iniciou o curso de mestrado em Fitopatologia sob a orientação do Professor Acelino Couto Alfenas no Laboratório de Patologia Florestal/ Bioagro do Departamento de Fitopatologia da UFV.

Sumário

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	3
CAPÍTULO 1	4
Variabilidade genética de isolados de <i>Erwinia psidii</i> de eucalipto e goiabeira.....	4
RESUMO	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAL E MÉTODOS	6
Isolados	6
Manutenção das culturas bacterianas	8
Extração e quantificação de DNA	8
Rep – PCR.....	8
Análise dos Dados.....	9
RESULTADOS	10
DISCUSSÃO.....	18
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2	24
Resistência de <i>Eucalyptus</i> spp. à <i>Erwinia psidii</i>	24
RESUMO	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
Isolado	26
Material Vegetal.....	26
Inoculação e avaliações.....	27
Delineamento Experimental	29
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	36
CONCLUSÕES GERAIS	38

RESUMO

HERMENEGILDO, Pollyane da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Seca de ponteiros causada por *Erwinia psidii*: diversidade genética do patógeno e resistência em *Eucalyptus* spp.** Orientador: Acelino Couto Alfenas.

A seca dos ponteiros causada por *Erwinia psidii* é um dos fatores limitantes para a produção de goiaba no Brasil. Recentemente, essa bactéria foi relatada como o agente causal da seca de ponteiros e murcha de *Eucalyptus* spp. no Brasil, Uruguai e Argentina. Como se trata de uma enfermidade recentemente descoberta, há ainda poucos estudos sobre o patossistema *E. psidii* - eucalipto, especialmente quanto à variabilidade genética do patógeno e resistência de *Eucalyptus* à doença. Assim, neste trabalho, compararam-se, por meio de marcadores de DNA, Rep - PCR, a variabilidade genética entre 21 isolados oriundos de eucalipto e cinco de goiabeira e avaliou-se a resistência de *Eucalyptus* spp. à doença. Baseado em 33 loci amplificados com os três marcadores (REP, ERIC e BOX), observou-se variabilidade genética relativamente baixa, apesar de terem se agrupado de acordo com o hospedeiro de origem (eucalipto e goiaba) e a região geográfica. Dentre as espécies avaliadas quanto à resistência (*E. pellita*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. saligna* e *E. grandis*), *E. pellita* e um acesso de *E. urophylla* apresentaram maior frequência de genótipos resistentes e constituem boas fontes de resistência à doença.

ABSTRACT

HERMENEGILDO, Pollyane da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015.
Dieback caused by *Erwinia psidii*: Genetic diversity of the pathogen and resistance on *Eucalyptus* spp. Adviser: Acelino Couto Alfenas.

Dieback caused by *Erwinia psidii* is a limiting factor for the production of guava in Brazil. Recently, this bacterium was reported as the causal agent of dieback and wilt in *Eucalyptus* spp. in Argentina, Brazil and Uruguay. As this is a new disease there are few studies regarding the *E. psidii*-*eucalyptus* pathosystem, especially about the genetic variability of the pathogen and resistance of *Eucalyptus* to this disease. In this work, the genetic variability among 21 isolates from *eucalyptus* and five from guava was compared using DNA markers Rep-PCR and the resistance of *Eucalyptus* spp. to the disease evaluated. Based on 33 loci amplified by three markers (REP, ERIC and BOX), we observed a relatively low variability for the isolates, however, in the cluster analysis, we observed a split of the isolates according to the source host (*eucalyptus* and guava) and geographic region. Among species of *E. pellita*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. saligna* and *E. grandis* tested, the first two had a higher frequency of resistant genotypes and are good disease resistance sources, although all presented intra variability specific.

INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as bacterioses que incidem na cultura do eucalipto, a murcha e a seca de ponteiros (“dieback”), causadas por *Erwinia psidii* tem despontando como uma das principais doenças em plantios comerciais de eucalipto, principalmente no Sul e Sudeste do Brasil (Arriel et al. 2014). A doença foi observada pela primeira vez em plantios de sementes de *E. grandis*, em Lençóis Paulista - SP, em 2009 e subsequentemente em Rosário do Sul - RS, Guaíba - RS e Três Lagoas - MS em plantios clonais de *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla* x *E. grandis* (“urograndis”) e em plantios seminais de *E. dunnii* (Arriel et al. 2014). *Erwinia psidii*, no entanto é comumente conhecida por causar seca dos ponteiros em goiabeira (*Psidium guajava*), que assim como o eucalipto pertence à família das Mirtáceas, indicando uma possível mudança de hospedeiro para se tornar um importante patógeno de *Eucalyptus* spp. (Coutinho et al. 2011).

A doença é reconhecida pelo arroxamento do pecíolo e entre as nervuras do limbo foliar ao longo da nervura principal, cujas folhas posteriormente murcham e secam. Manchas de aspecto encharcado (anasarca) adjacentes à nervura central das folhas também são observadas. Nos ramos jovens de algumas plantas observa-se discreta exsudação macroscópica de pus bacteriano e escurecimento da medula. Outro sintoma observado é a murcha, que culmina com a morte da planta e abundante exsudação de pus, muitas vezes confundidos com a murcha-de-Ralstonia, causada por *Ralstonia solanacearum*. Os sintomas de seca de ponteiros, causados por *E. psidii* parecem estar restritos a plantas nos primeiros dois anos de idade, particularmente em tecidos jovens e em expansão (Arriel et al. 2014; Coutinho et al. 2011). Em determinados locais e épocas do ano, a doença pode incidir em quase 100% das plantas levando à perda de dominância apical e redução do crescimento, o que gera prejuízos econômicos para a cultura (Arriel et al. 2014) e limita o plantio de materiais suscetíveis de interesse comercial.

Em goiabeira, a poda e queima de ramos doentes são as principais medidas de controle da doença, considerando que não existem variedades comerciais resistentes e o controle químico não é eficaz (Marques et al. 2007 e Rezende et al. 2008). No entanto, para a eucaliptocultura essas medidas são inviáveis, devido ao grande porte das árvores e às

extensas áreas de cultivo (Arriel et al. 2014). É possível que o plantio de materiais resistentes possa ser adotado, uma vez que tem sido observada variação na intensidade de doença no campo entre diferentes clones e espécies de eucalipto.

Além da disponibilidade de materiais resistentes o estudo da diversidade genética nas populações do patógeno consiste em estratégias de manejo duráveis contra bacterioses (Louws et al. 1999). Marcadores moleculares, como rep – PCR (“repetitive element sequence-based PCR”) tem permitido o estudo da diversidade genética intraespecíficas de bactérias. A técnica, baseada em iniciadores complementares para sequências repetitivas de consenso, permite amplificar fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Múltiplos fragmentos amplificados são separados por eletroforese e os resultados específicos para clones bacterianos individuais, podem ser comparados. Numerosos estudos demonstraram que a técnica rep - PCR, que utiliza os iniciadores oligonucleotídicos com base nos “repetitive extragenic palindromic” (REP), “enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) e BOX tem sido úteis na tipagem e análise genética de várias espécies de bactérias. Por exemplo, a análise molecular e fenotípica de estirpes patogênicas de populações de *E. psidii* provenientes de goiabeira de diferentes regiões do Brasil, apresentaram baixo nível de diversidade genética, indicando que a principal fonte de disseminação do patógeno é o material propagativo infectado (Teixeira et al. 2009).

Como se trata de uma doença recém-descoberta na eucaliptocultura são escassos os estudos acerca deste patossistema. Assim, neste trabalho, estudou-se a variabilidade genética do patógeno por meio de marcadores rep - PCR e, por inoculações artificiais, avaliou-se a resistência de cinco espécies de *Eucalyptus* spp. à infecção de *E. psidii*.

REFERÊNCIAS

- Arriel DAA, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior N, Souza HP, Alfenas AC (2014) Wilt and die-back of Eucalyptus spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. *Forest Pathology* 44:225-265.
- Coutinho TA, Brady CL, Vaart M, Van der Wart M, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Perez C, Wingfiel MJA (2011) New shoot and stem disease of Eucalyptus species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 40: 55–60.
- Louws FJ, Rademaker JLW, De Bruijn FJ (1999) The three Ds of PCR- based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 37: 81-125
- Marques ASA, Coelho MVS, Ferreira MASV, Damasceno JPS, Mendes AP, Vieira TM (2007) Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, SP.* 29: 488-493.
- Rezende AMFA, Tomita CK, Uesugi CH (2008) Fungicidas cúpricos, cloretos de benzalcônio e composto bioativo líquido (Bokashi): fitotoxicidade e controle da seca dos ponteiros causada por *Erwinia psidii* em goiabeiras. *Tropical Plant Pathology* 33:288–294
- Teixeira ACO, Marques ASA, Ferreira, MASV (2009) Low genetic diversity among pathogenic strains of *Erwinia psidii* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 678-684.

CAPÍTULO 1

Variabilidade genética de isolados de *Erwinia psidii* de eucalipto e goiabeira

RESUMO

Erwinia psidii, agente causal da seca de ponteiros da goiabeira (*Psidium guajava*), era um patógeno restrito ao Brasil e foi relatado pela primeira vez no estado de São Paulo, no ano de 1987. Recentemente, a bactéria foi identificada como sendo o agente causal da seca de ponteiros e murcha em *Eucalyptus* spp. no Uruguai, Argentina e Brasil. A determinação da variabilidade genética e da estrutura das populações de *E. psidii*, objeto deste estudo, é fundamental para embasar a seleção de materiais com resistência durável à doença. Foram analisadas 26 culturas bacterianas de *E. psidii* de diferentes regiões brasileiras, sendo 21 obtidas de eucalipto e cinco de goiabeira. Pela análise de rep – PCR foram obtidos 33 fragmentos, sendo 13 obtidos com o primer BOX, 12 com o primer REP e oito com o primer ERIC. A análise de agrupamento revelou a formação de grupos entre os isolados da mesma região geográfica e de hospedeiro. Entretanto, apesar dessa separação a baixa diversidade genética encontrada entre isolados de *E. psidii* de eucalipto permitem concluir que são populações recentemente introduzidas nessa cultura.

INTRODUÇÃO

A seca de ponteiros da goiabeira (*Psidium guajava*), causada por *Erwinia psidii*, foi reportada no Brasil pela primeira vez em 1987, no município de Valinhos São Paulo (SP) (Rodrigues Neto et al. 1987). Posteriormente a doença foi relatada em Minas Gerais (Romeiro et al. 1994), Espírito Santo (Oliveira et al. 2000) e Distrito Federal (Junqueira et al. 2001; Uesugi et al. 2001). Essa doença é um dos problemas fitossanitários mais importantes da goiabeira no Brasil, podendo reduzir significativamente a produtividade da cultura (Marques et al. 2007). Recentemente esse patógeno foi identificado como sendo o agente causal da seca de ponteiros em *Eucalyptus* spp. no Uruguai, Argentina (Coutinho et al. 2011) e no Brasil (Ariel et al. 2014). É possível que *E. psidii* infecte eucalipto, a partir de inóculo originário de alguma espécie, nativa da família Myrtaceae (“host jump”). Rodrigues Neto et al (1983, 1987) demonstraram por inoculação artificial que outras espécies de mirtáceas como *Eugenia jambolana*, *Melaleuca viridiflora* e *Psidium cattleianum* também eram suscetíveis a *E. psidii*, mas até o presente a doença em campo ainda não foi detectada em outras espécies nativas além de goiabeira.

Para acompanhar a evolução da população do patógeno e desenvolver estratégias de manejo duráveis para bactérias fitopatogênicas, a avaliação da diversidade genética de populações é necessária (Louws et al. 1999). Esta diversidade pode ser acessada utilizando diversas técnicas de “fingerprinting” baseadas em marcadores moleculares, como: “randomly amplified polymorphic DNA” (RAPD), “repetitive element sequence-based PCR” (rep-PCR), “restriction fragment length polymorphism” (RFLP) e “amplified fragment length polymorphism” (AFLP) (Lows et al. 1999). A técnica de rep-PCR foi desenvolvida com base em sequências-consenso repetitivas específicas dispersas no genoma de diversas bactérias. Três marcadores são comumente utilizados para análise de rep-PCR: “repetitive extragenic palindromic” (REP), “enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) e BOX. Esses marcadores levam a uma amplificação seletiva das regiões genômicas distintas, que estão localizadas entre as regiões repetitivas. O método referido é tido como uma técnica confiável, reprodutível, simples, rápida e altamente discriminatória,

mesmo entre populações de uma mesma espécie (Versalovic et al. 1994, Louws et al. 1999, Rademaker e De Bruijn, 1997).

Utilizando marcadores rep - PCR Teixeira et al. (2009) estudaram a diversidade genética de 42 estirpes patogênicas de *E. psidii* de diferentes regiões e mostrou que as populações dessa bactéria no Brasil possuíam baixo nível de diversidade genética. Entretanto, os autores utilizaram apenas estirpes de goiabeira. Assim, devido às escassas informações sobre a variabilidade genética das populações de *E. psidii* que infectam eucalipto, este trabalho objetivou investigar a diversidade genética e a estrutura de populações do patógeno, oriundas de eucalipto e goiabeira a fim de embasar a seleção de materiais de eucalipto resistente à doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados

Para as análises de diversidade genética foram utilizados 26 isolados de *Erwinia psidii* obtidos de plantas de eucalipto e goiabeira, provenientes das regiões onde a doença ocorre no Brasil (Tabela 1). Dos 26 isolados estudados, 21 foram provenientes de eucalipto e pertencem à Coleção de Culturas do Laboratório de Patologia Florestal (UFV), caracterizados por Arriel et al. (2014). Os demais são provenientes de goiabeira, sendo dois cedidos pela Prof^a. Marisa Alvares da S. V. Ferreira (DFP/UnB) e três adquiridos no Instituto Biológico de Campinas (IBSBF).

Tabela 1: Origem dos isolados e sintoma típico incitado por *Erwinia psidii*.

Isolado	Hospedeiro	Material coletado	Local de Coleta	Sintoma
LPF 526	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Ramo	Rosário do Sul- RS	Seca de ponteiro
LPF 528	<i>E. dunnii</i>	Ramo	Rosário do Sul- RS	Seca de ponteiro
LPF 529	<i>E. dunnii</i>	Pecíolo	Rosário do Sul- RS	Seca de ponteiro
LPF 530	<i>E. dunnii</i>	Ramo	Guaíba- RS	Seca de ponteiro
LPF 531	<i>E. dunnii</i>	Folha	Guaíba- RS	Seca de ponteiro
LPF 533	<i>E. dunnii</i>	Folha	Guaíba- RS	Seca de ponteiro
LPF 534	<i>E. dunnii</i>	Ramo	Guaíba- RS	Seca de ponteiro
LPF 535	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Pecíolo	Guaíba- RS	Seca de ponteiro
LPF 544	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Tronco	Três Lagoas-MS	Murcha
LPF 545	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Tronco	Três Lagoas-MS	Murcha
LPF 546	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Tronco	Três Lagoas-MS	Murcha
LPF 547	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Tronco	Três Lagoas-MS	Murcha
LPF 548	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Tronco	Três Lagoas-MS	Murcha
LPF 549	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Tronco	Três Lagoas-MS	Murcha
LPF 550	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Tronco	Três Lagoas-MS	Murcha
LPF 551	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Tronco	Três Lagoas-MS	Seca de ponteiro
LPF 552	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Ramo	Três Lagoas-MS	Seca de ponteiro
LPF 553	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Ramo	Três Lagoas-MS	Seca de ponteiro
LPF 554	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Ramo	Três Lagoas-MS	Seca de ponteiro
LPF 556	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Tronco	Três Lagoas-MS	Murcha
LPF 557	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Tronco	Três Lagoas-MS	Murcha
IBSBF 1579	<i>Psidium guajava</i>	-	Brazlândia – DF	Seca de ponteiro
IBSBF 1480	<i>Psidium guajava</i>	-	Santa Tereza – ES	Seca de ponteiro
IBSBF 454	<i>Psidium guajava</i>	-	Valinhos – SP	Seca de ponteiro
IBSBF 493	<i>Psidium guajava</i>	-	Itariri – SP	Seca de ponteiro
IBSBF 435 (Isolado Tipo)	<i>Psidium guajava</i>	-	Valinhos – SP	Seca de ponteiro

Manutenção das culturas bacterianas

Os isolados bacterianos foram cultivados em placas de Petri, contendo o meio sólido 523 (Kado & Heskett, 1970) por 24 h a 28 °C. Após crescimento, os isolados foram repicados para microtubos estéreis contendo 0,7 mL do meio 523 líquido e mantidos nas mesmas condições de incubação. A partir da cultura bacteriana crescida nos microtubos era realizada a extração do DNA ou os isolados eram armazenados a -80 °C, após a adição de 0,3 mL de glicerol 80% (v/v) (Schaad et al. 2001).

Extração e quantificação de DNA

O DNA bacteriano foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit[®] (Promega) a partir de culturas bacterianas cultivadas em meio 523 líquido por 24 h, a 28°C sem agitação. Empregou-se o método de extração recomendado pelo fabricante para bactérias Gram-negativas. Após a extração, a concentração de DNA de cada amostra foi quantificada utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop[®] (Thermo Scientific), e a concentração final foi ajustada para 20 ng.µL⁻¹.

Rep – PCR

Para determinação da diversidade genética foram comparados os perfis genômicos gerados por rep - PCR. Empregam-se os primers REP 1R-I (5'-IIIICGICGICATCIGGC-3') e REP 2 - I (5'-ICGITTATCIGGCCTAC-3'), ERIC 1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA-3') e ERIC 2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') e BOXA1R (5'-CTCCGGCAAGGCGACGCTGAC-3') (Louws et al. 1994). As reações de PCR foram conduzidas em volume total de 25 µL, com 1 µL de cada primer, 12,2 µL do GoTaq Green PCR Master Mix (Promega), 8 µL de água ultrapura e 2 µL de DNA molde

As PCRs foram realizadas em termociclador Veriti 96[®] (Life Technologies) com um programa específico para cada primer e repetidas quatro vezes, de maneira independente. Para o BOX, a reação constituiu de uma desnaturação inicial de 95 °C por 7 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 40 °C por 1 min e 65 °C por 8 min e uma extensão final de 65 °C por 16 min. Para o ERIC o programa constituiu de uma desnaturação inicial de 95 °C por 7 min,

35 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min e 65 °C por 8 min e uma extensão final de 65 °C por 16 min. Para o REP, as amostras foram aquecidas por 95 °C por 7 min e posteriormente submetidas a 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 44 °C por 8 min e 65 ° por 8 min para anelamento dos primers e uma extensão final de 65 °C por 8 min. Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose a 1,5% (p/v) com tempo de corrida de aproximadamente 2 h, corados com brometo de etídeo e fotodocumentado em L.PIX (Loccus Biotecnologia).

Análise dos Dados

A partir dos perfis de fragmentos amplificados com os primers BOX, ERIC e REP, foram construídas matrizes binárias, atribuindo-se o valor (1) para a presença de fragmento e (0) para a ausência. Os resultados obtidos com cada primer foram analisados separadamente (REP, ERIC e BOX) e em conjunto (rep - PCR) com o programa PAST 3.06 (Hammer et al. 2001). O coeficiente de similaridade aplicado foi o Jaccard (Sneath & Sokal, 1999) e a análise de agrupamento foi determinada pelo método UPGMA (Unweighted pair - group method using arithmetic averages).

A riqueza genotípica E (gn), foi estimada utilizando curva de rarefação (Grunwald et al. 2003), para diminuir o erro devido aos diferentes tamanhos das populações. Para medir a diversidade genotípica foram calculados os índices G (Stoddart & Taylor, 1988) e H (Shannon – Wiener, 1949), assim como os respectivos intervalos de confiança, utilizando o pacote poppr do programa estatístico R (R Development core team, 2011). A diferenciação genética entre as populações foi calculada utilizando o programa Multilocus 1.3 (Agapow & Burt 2001) com bootstrap de 1000 re-amostragem; o valor encontrado em cada par de subpopulação indica se há diferenciação genética entre elas. A evidência de recombinação na população foi avaliada pelo índice de associação (I_A) e pela estatística r_d (Maynard Smith et al. 1993), para testar a hipótese de ocorrência de recombinação comparando os valores observados e esperados utilizando o pacote poppr do programa estatístico R.

RESULTADOS

As análises de agrupamento com cada primer separadamente (REP, ERIC e BOX) e em conjunto (rep - PCR) revelaram a formação de grupos entre os isolados, de acordo com o hospedeiro e a origem geográfica.

Os padrões de fragmentos gerados pelo primer BOX apresentaram até 13 bandas, que variaram de 400 a 5000 pb (Figura 1A). Dentre as 13 bandas analisáveis, seis foram polimórficas. Ao nível de 70% de similaridade, foi possível identificar dois grupos, o grupo 1 composto por isolados provenientes de goiabeira, apresentando mais de 80% de similaridade entre eles e o grupo 2 composto por isolados de eucalipto. O grupo 2 foi dividido em dois subgrupos também com 80% de similaridade. O primeiro subgrupo, formado pelos isolados do Mato Grosso do Sul (MS), apresentou 100% de similaridade e o segundo subgrupo, formado pelos isolados do Rio Grande do Sul (RS), com 90% de similaridade (Figura 2).

Os padrões de fragmentos gerados pelo primer REP apresentaram 12 fragmentos que variaram de 150 a 5000 pb (Figura 1B), sendo seis polimórficos. Novamente, os isolados de eucalipto dividiram-se em dois grupos com 89% de similaridade, sendo o grupo 1 formado pelos isolados do RS e o grupo 2 pelos isolados do MS e com os isolados IBSBF 493, IBSBF 1579 e IBSBF 1480. Os isolados de goiabeira IBSBF 454 e IBSBF 435 (isolado tipo) formaram um grupo com 77% de similaridade (grupo 3). O isolado LPF0526 não se agrupou aos demais isolados (Figura 3).

A amplificação com os primers ERIC 1R e ERIC 2 permitiu a geração de oito fragmentos distintos que variaram de 100 a 4500 pb (Figura 1C), dos quais apenas quatro foram polimórficos. A análise dos perfis eletroforéticos separou os isolados analisados em três grupos, com similaridade aproximada de 64% (Figura 4). O grupo 1 apresentou 88% de similaridade, contendo todos os isolados provenientes de eucalipto obtidos no estado do MS, acrescido do isolado IBSBF 1579. O grupo 2, com similaridade de 88%, foi possível separar o isolado tipo (IBSBF 435) dos isolados de *E. psidii* de eucalipto obtidos no RS e os isolados provenientes de goiabeira (IBSBF 454 e IBSBF 493). E o grupo 3 formado pelos isolados LPF 0535 e LPF 0526, apresentando 100% de similaridade entre eles.

Considerando os três primers foi possível detectar 33 loci, sendo 17 (51,5%) polimórficos, com fragmentos variando de 100 a 5000 pb (Tabela 2). Ao nível de 77% e 79% de similaridade foi possível separar os isolados por hospedeiro e região geográfica respectivamente, formando três grupos principais. O grupo 1, com aproximadamente 87% de similaridade, é composto por todos isolados provenientes de goiabeira (IBSBF 454, IBSBF 435, IBSBF 493 e IBSBF 1480), exceto o isolado IBSBF 1579. O grupo 2 contém os isolados provenientes de eucalipto do MS e o isolado IBSBF 1579, com similaridade de 95%. O grupo 3 é composto pelos isolados de eucalipto oriundos do RS, apresentando 83% de similaridade entre eles. O dendograma gerado pela análise conjunta (rep -PCR) (Figura 5) apresentou resultado semelhante aos dendogramas de BOX, REP e ERIC - PCR quando analisados isoladamente.

Não foi detectada diferença de diversidade genotípica entre as populações baseadas nos índices G (Stoddart & Taylor) e H (Shannon – Wiener). No entanto, foi detectada maior riqueza e equitabilidade nas subpopulações de goiabeira e do RS (Tabela 3). A diversidade gênica foi maior nas subpopulações de *E. psidii* provenientes de goiabeira e do RS. A hipótese de equilíbrio gamético na população total (n=26) foi rejeitada, indicando a evidência de recombinação na população de *E. psidii* (Tabela 2). A população do MS difere das demais populações. Os valores de F_{ST} variaram de 0,54 a 0,82 (Tabela 4).

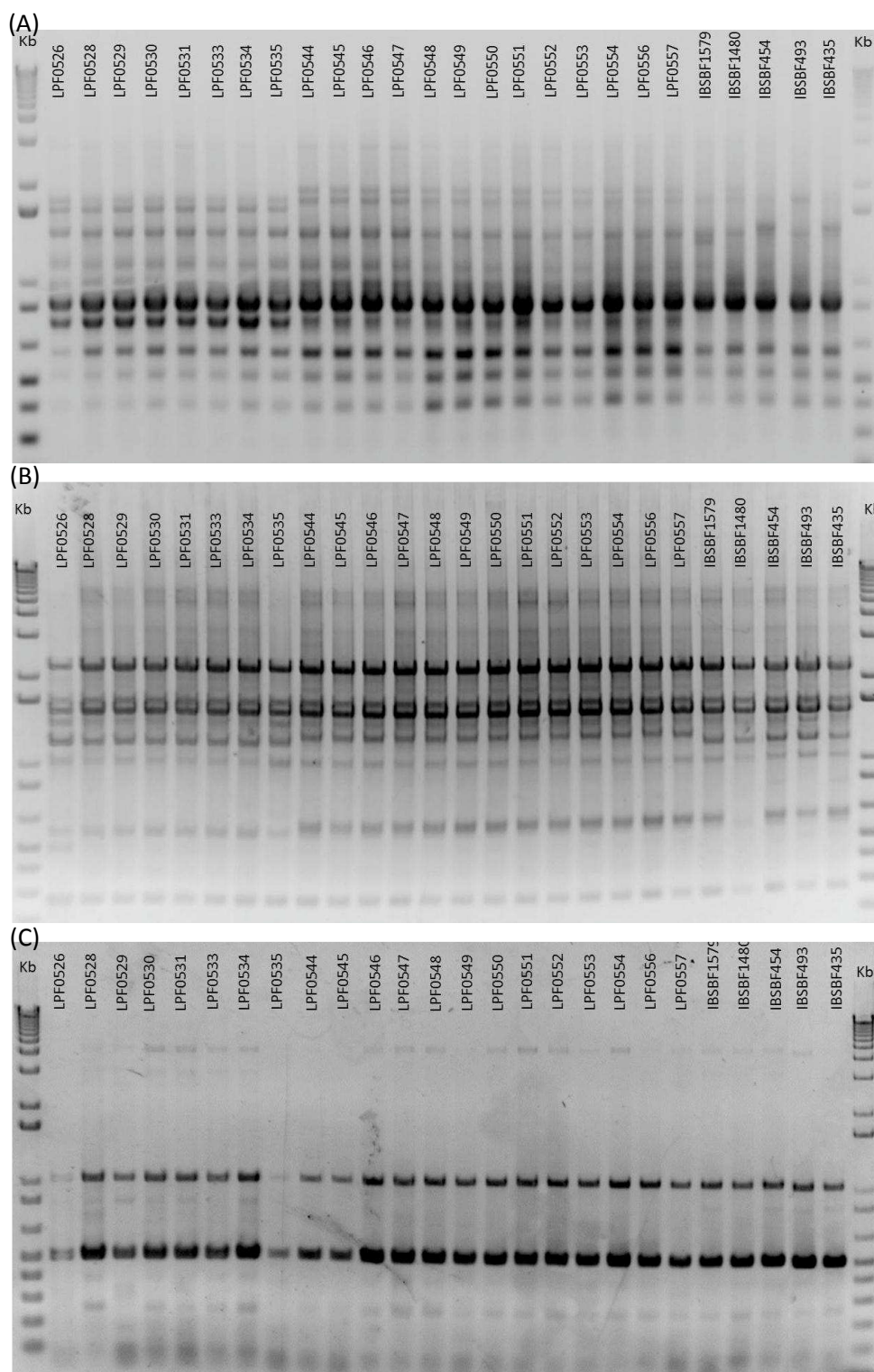


Figura 1: Perfil de isolados de *Erwinia psidii* em gel de agarose, após amplificação utilizando os primers BOX (A), REP (B), ERIC (C). Kb = marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (GeneRulerTM); LPF0526 a LPF0557= isolados de *E. psidii* oriundos de eucalipto; e IBSBF1579 a IBSBF435 = Isolados de *E. psidii* oriundos de goiabeira.

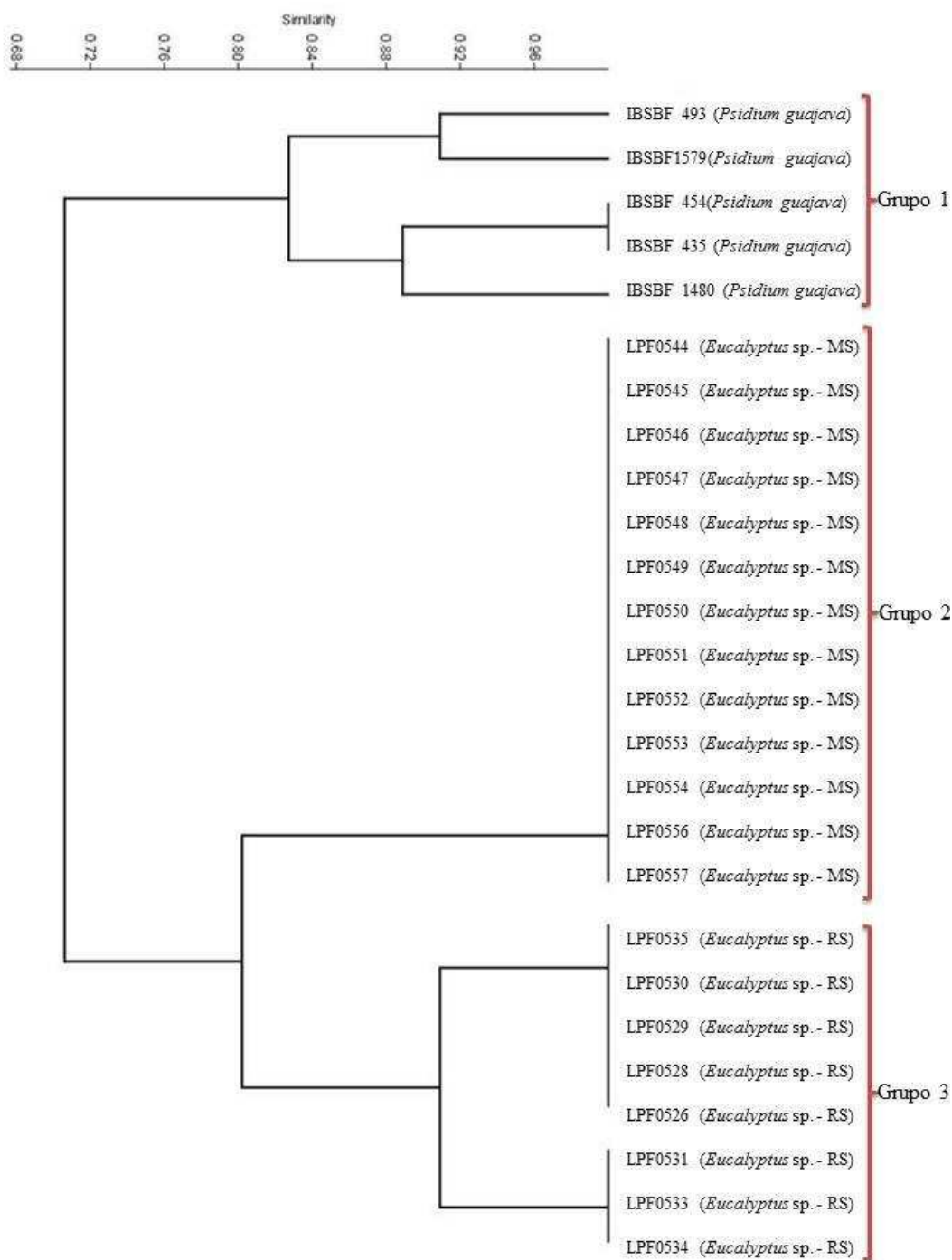


Figura 2: Dendrograma construído com os perfis de fragmentos amplificados por BOX - PCR dos isolados de *Erwinia psidii* obtidos de eucalipto (LPF0526 a LPF0557) e goiabeira (IBSBF1579 a IBSBF435). As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade. O dendrograma foi baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard e a análise de agrupamento foi determinada pelo método UPGMA.

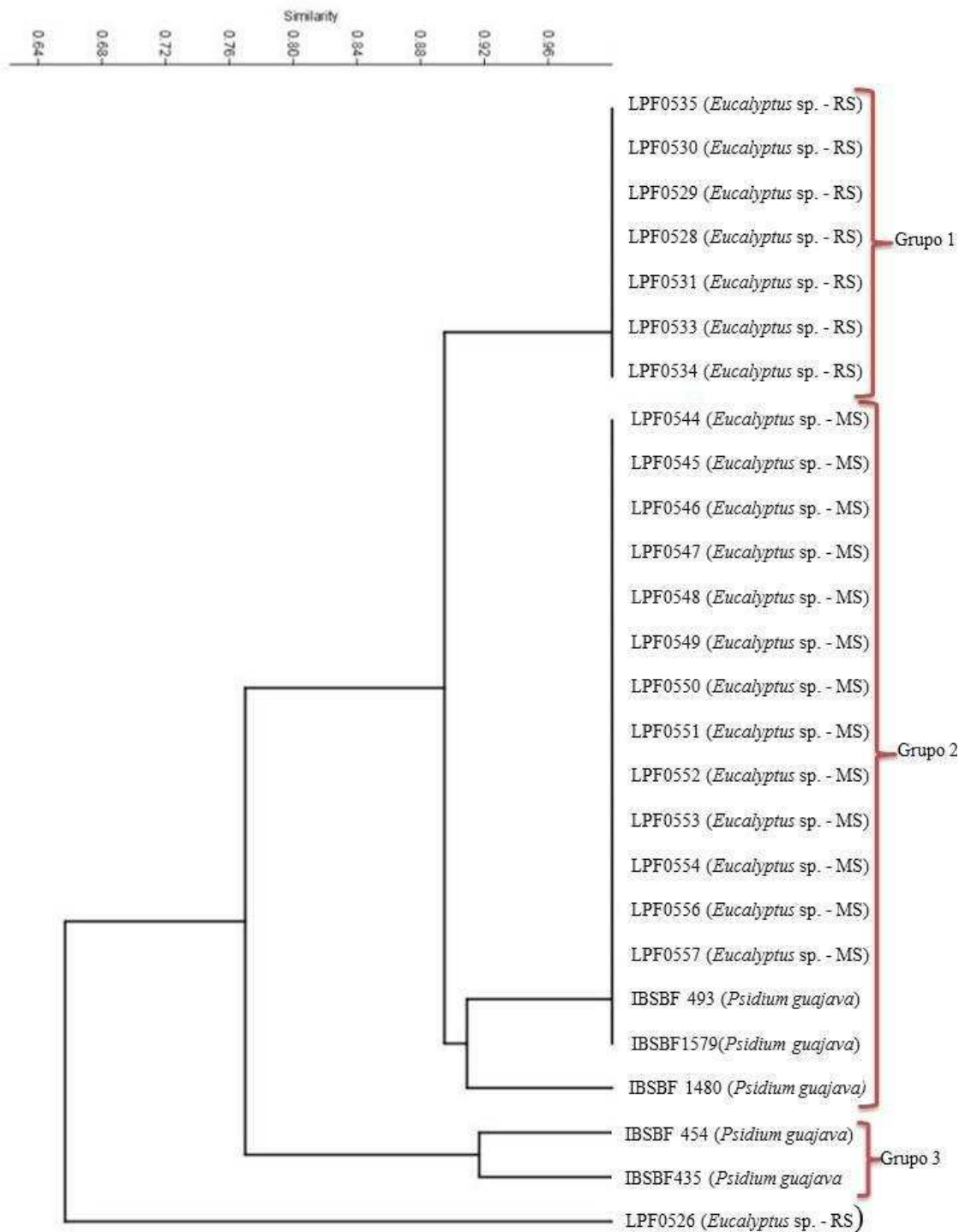


Figura 3: Dendrograma construído com os perfis de fragmentos amplificados por REP - PCR dos isolados de *Erwinia psidii* obtidos de eucalipto (LPF0526 a LPF0557) e goiabeira (IBSBF1579 a IBSBF435). As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade. O dendrograma foi baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard e a análise de agrupamento foi determinada pelo método UPGMA.

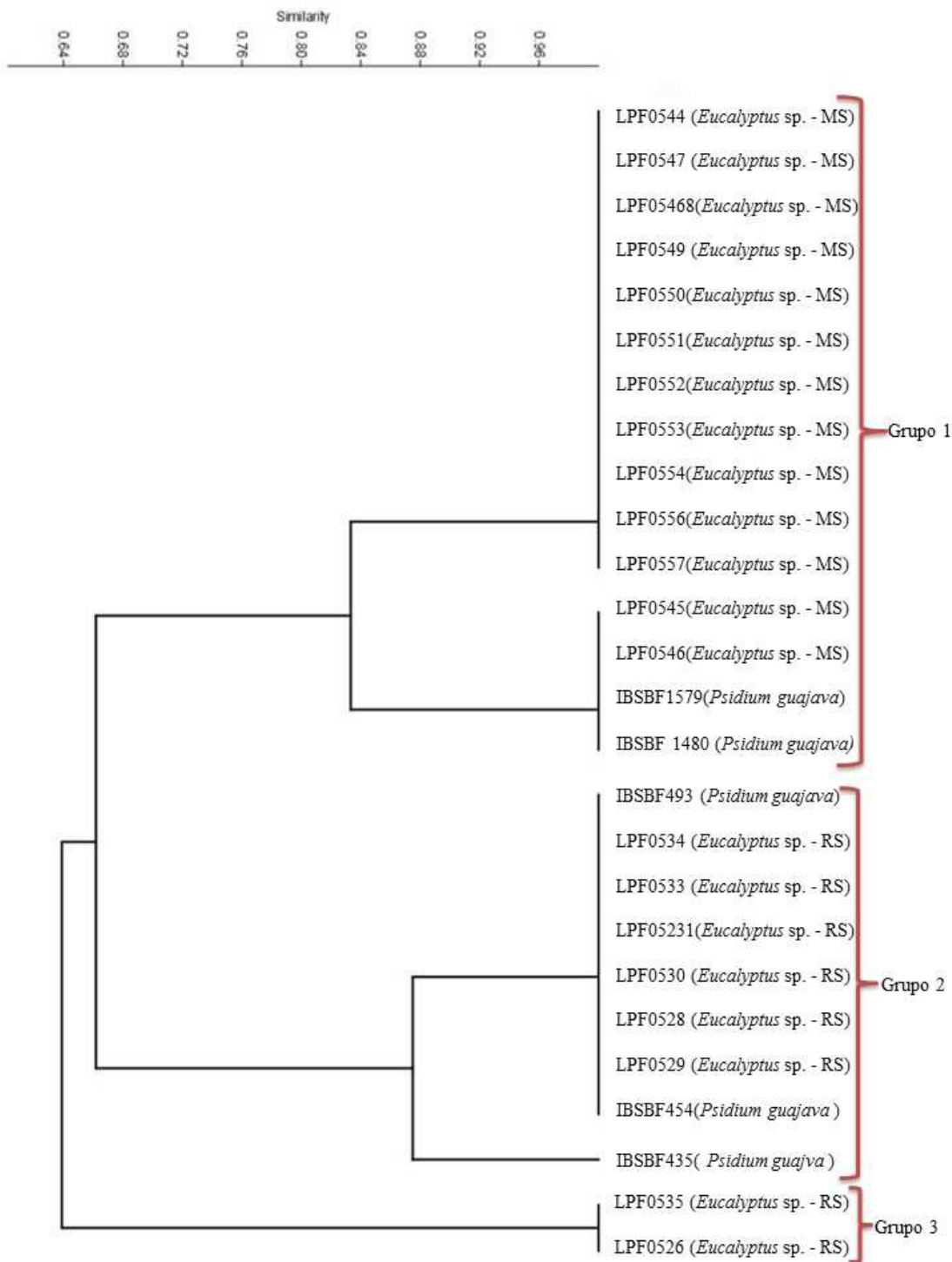


Figura 4: Dendrograma construído com os perfis de fragmentos amplificados por ERIC - PCR dos isolados de *Erwinia psidii* obtidos de eucalipto (LPF0526 a LPF0557) e goiabeira (IBSBF1579 a IBSBF435). As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade. O dendrograma foi baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard e a análise de agrupamento foi determinada pelo método UPGMA.

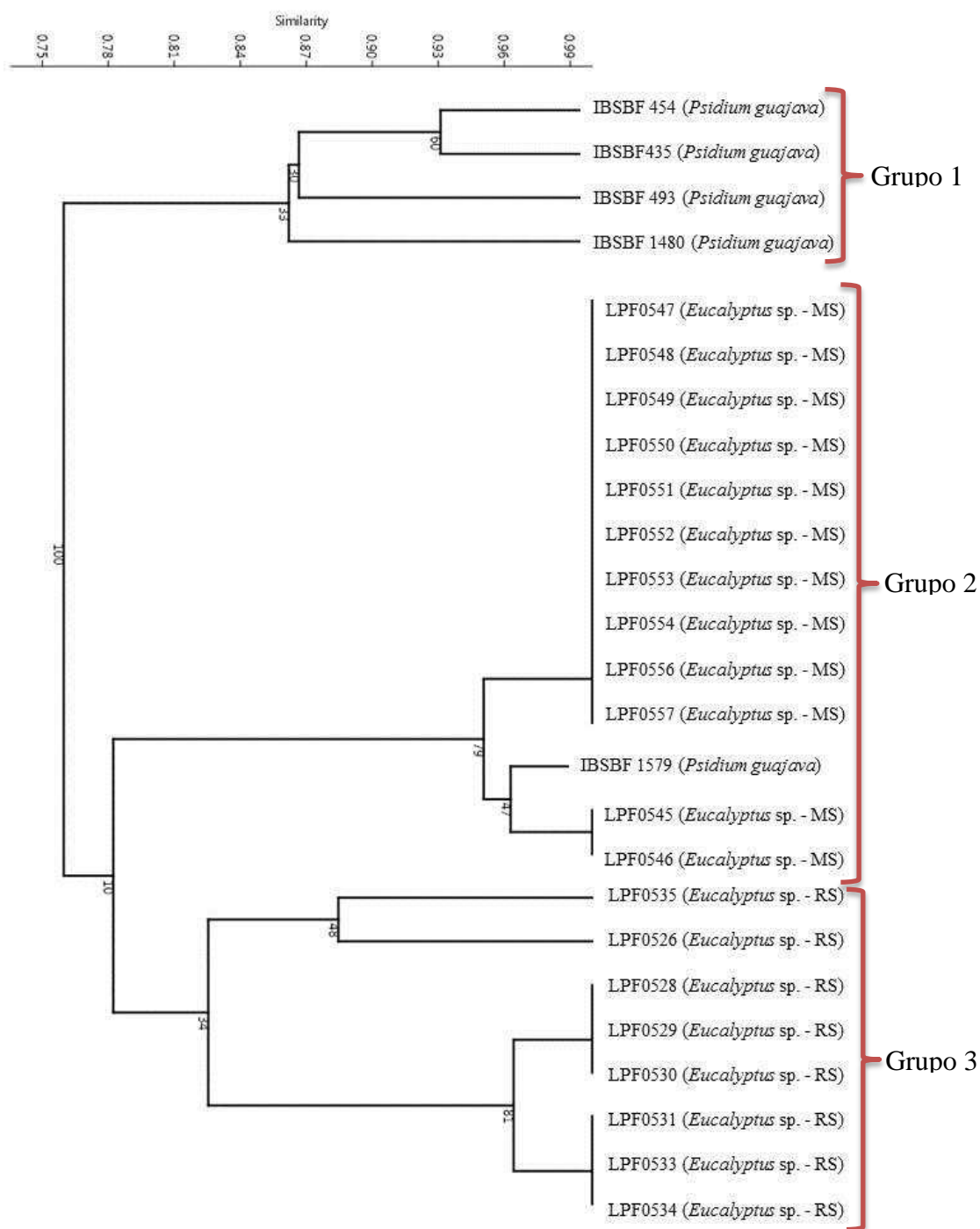


Figura 5: Dendrograma construído com os perfis de fragmentos amplificados por rep - PCR (REP, ERIC e BOX) dos isolados de *Erwinia psidii* obtidos de eucalipto (LPF0526 a LPF0557) e goiabeira (IBSBF1579 a IBSBF435). As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade. O dendrograma foi baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard e a análise de agrupamento foi determinada pelo método UPGMA.

Tabela 2: Porcentagem de locos polimórficos e diversidade gênica em populações de *Erwinia psidii*.

Marcador	Tamanho (pb)	Polimorfismo (%)	Nº de Locos	Diversidade Gênica		
				Eucalipto MS	Eucalipto RS	Goiabeira
BOX	400 - 5000	46,15	13	0	0,54	0,90
ERIC	100 – 4500	50	8	0	0,25	0,90
REP	150 - 5000	50	12	0,28	0,43	0,90

Tabela 3: Índice de diversidade genética e estimativa de desequilíbrio de ligação para região (A) e hospedeiro (B) em subpopulações de isolados de *Erwinia psidii*

População	Eucalipto		Total
	Mato Grosso do Sul	Rio Grande do Sul	
N ¹⁾	13	8	21
Nº haplotipo	2	4	6
H ²⁾	0,42 (-1,78 – 2,14)	1,25 (-1,73 – 2,19)	1,4 (-1,76 – 2,16)
G ³⁾	0,68 (-1,73 – 2,19)	0,80 (-1,40 – 2,52)	0,68 (-1,27 – 2,65)
E (8) ⁴⁾	1,87	4	3,96
H _E ⁵⁾	0,28	0,78	0,70
Ia ⁶⁾	0	-2,76*	3,53*
Rd ⁷⁾	-*	-0,46*	0,37*

População	Eucalipto (RS e MS)		Total
	Goiabeira		
N ¹⁾	5	21	26
Nº haplotipo	5	6	11
H ²⁾	1,61 (-1,72 – 2,2)	1,40 (-1,76 – 2,16)	1,93 (-1,75 – 2,17)
G ³⁾	1,00 (-1,22 – 2,70)	0,22 (-1,23 – 2,69)	0,76 (-0,87 – 3,05)
E (5) ⁴⁾	5	3	3,63
H _E ⁵⁾	1,00	0,705	0,809
Ia ⁶⁾	-0,50	-3,53*	2,59*
Rd ⁷⁾	-0,62	-0,36*	0,18*

¹⁾N: Tamanho da amostra

²⁾H: Índice de Shannon – Wiener e intervalos de confiança entre parênteses

³⁾G: Índice de Stoddart e Taylor escalonado e intervalos de confiança entre parênteses

⁴⁾E(n): Índice de riqueza para o menor n amostral

⁵⁾H_E: Índice de equitabilidade

⁶⁾Ia: Índice de associação

⁷⁾Rd: Índice de associação multilocos

* significativo a 1% probabilidade

Tabela 4: Diferenciação genética entre populações de *Erwinia psidii* (diagonal inferior).

População	Eucalipto - RS	Eucalipto - MS	Goiaba
Eucalipto - RS	1,0		
Eucalipto - MS	0,82*	1,0	
Goiabeira	0,54	0,75*	1,0

*significativo a 1% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Os isolados de *Erwinia psidii* utilizados neste estudo apresentaram baixa variabilidade genética. O resultado da análise de agrupamento permitiu separar os isolados de acordo com o hospedeiro e região geográfica. No entanto, essas diferenças foram muito baixas, demonstrando que os isolados são muito próximos geneticamente. Teixeira et al. (2009) trabalhando com populações de *E. psidii* de goiabeira de diferentes regiões do Brasil, encontraram resultado semelhante, concluindo que os isolados de *E. psidii* do Distrito Federal são semelhantes aos do Paraná, Espírito Santo e de São Paulo.

Apesar da análise dos dados permitir a separação dos isolados por região e por hospedeiro, um dos isolados de goiabeira agrupou-se com os isolados de eucalipto. Mesmos isolados distintos genotipicamente foram bastante similares independentemente do hospedeiro, goiabeira ou eucalipto, apoiando fortemente a hipótese de que o patógeno não difere entre estes hospedeiros. Além disso, Arriel et al. (2014) demonstraram que o isolado de *E. psidii* LPF 0534 de eucalipto e o isolado tipo IBSBF 435 de goiabeira foram patogênicos a ambos os hospedeiros. Em conjunto esses resultados demonstram que a infecção de *E. psidii* em *Eucalyptus* spp. é resultado de uma adaptação recente do patógeno ao eucalipto. Esta hipótese foi avaliada para *Puccinia psidii* em eucalipto, sendo neste caso rejeitada. Entretanto, diferentemente do observado neste trabalho, a estrutura populacional de *P. psidii* foi fortemente influenciada pelas espécies hospedeiras do fungo, levando à existência de biótipos adaptados a cada distinto hospedeiro (Graça et al. 2013).

A diversidade genética é composta de dois aspectos, riqueza e equitabilidade. Riqueza é o número de genótipos presentes em uma população e equitabilidade diz respeito

a como os genótipos estão distribuídos dentro das populações (Grunwald et al. 2003). Neste estudo, os maiores valores de riqueza e equitabilidade foram detectados nas subpopulações da bactéria de goiabeira, quando se avaliou o hospedeiro e nas populações de *E. psidii* do RS, quando se avaliou somente as populações de eucalipto. Indicando que estas subpopulações apresentam o maior número de genótipos e que eles estão distribuídos mais uniformemente dentro das mesmas.

Baseadas nos índices G e H e os respectivos intervalos de confiança não foi detectada diferença genotípica entre os isolados estudados. Já a diversidade gênica foi maior nas populações de *E. psidii* provenientes de goiabeira, quando avaliado por hospedeiro e do eucalipto para RS quando avaliado por região. Em populações de microrganismos, índices de diversidade gênica e genotípica são necessários para estimar a diversidade genética, e o conhecimento da diversidade genética de um agente patogênico pode auxiliar no estabelecimento de hipóteses sobre sua evolução, compreensão da relação entre patógeno x hospedeiro, além de ajudar nos métodos e estratégias de controle (Grunwald et al. 2003). Segundo Teixeira et al. (2009) o limitado grau de diversidade genética entre os isolados de *E. psidii* é, provavelmente, devido à disseminação da fitobactéria através de mudas de goiaba assintomáticas do estado de São Paulo para os outros estados. Para o eucalipto, o baixo grau de diversidade genética encontrado indica que a bactéria foi recentemente introduzida nesse hospedeiro. Até o presente, a doença encontra-se restrita em poucas regiões do país, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, e tem sido registrada em um pequeno número de clones comerciais e plantios seminais de poucas espécies, principalmente *E. dunnii* e *E. grandis*.

Em goiabeira, a disseminação da bactéria ocorre principalmente por ferramentas de poda e mudas contaminadas (Marques et al. 2007). Em eucalipto não se tem conhecimento de como o patógeno inicia a infecção. Uma das hipóteses é que, assim como para goiabeira, o manuseio de ferramentas na multiplicação das mudas clonais de eucalipto possa disseminar o patógeno. No entanto, diferentemente de *R. solanacearum* (Alfenas et al. 2006) até o momento, a doença não foi constatada em mudas em viveiro. Além disso, a doença tem ocorrido também em plantios seminais, cuja produção de mudas não é tão favorável à disseminação da bactéria.

As bactérias são principalmente clonais, por serem organismos de reprodução assexuada, mas podem permutar genes por conjugação, que são interpretados como eventos de recombinação em estudos de polimorfismo (Mhedbi-Hajri et al. 2013). A população de *E. psidii* de goiabeira não apresentou taxa de recombinação significativa, mostrando que a taxa de variabilidade provavelmente vem de mutações, ao passo que a variabilidade da população da bactéria de eucalipto (composta pelas subpopulações de MS e RS) é causada pela recombinação.

A limitada diversidade genética encontrada nas populações de *E. psidii* obtidas neste estudo constitui uma importante informação no desenvolvimento de estratégias de controle da doença, devendo ser considerada no estudo para seleção de plantas resistentes. Entretanto, estudos sobre a variabilidade da agressividade na população do patógeno são necessários. Portanto, este estudo fornece a primeira informação sobre a estrutura genética das populações de *Erwinia psidii* obtidas de plantas de eucalipto e goiabeira, mostrando que há baixa variabilidade genética entre as populações.

REFERÊNCIAS

- Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA (2006) *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31: 357-366.
- Agapow PM, Burt A (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1:101-2.
- Arriel DAA, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior N, Souza HP, Alfenas AC (2014) Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. *Forest Pathology* 44: 225-265.
- Coutinho TA, Brady CL, Vaart M, Van der Wart M, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Perez C, Wingfield, MJA (2011) New shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 40: 55-60.
- Graça RN, Ross-Davis AL, Klopfenstein NB, Kim MS, Peever TL, Cannon PG, Alfenas AC (2013). Rust disease of eucalypts, caused by *Puccinia psidii*, did not originate via host jump from guava in Brazil. *Molecular Ecology* 22: 6033-6047.
- Grunwald NJ, Goodwin SB, Milgroom, MG, Fry We, (2003) Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93: 738-746.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.
- Junqueira NTV, Andrade LRM, Pereira M, Lima MM, Chaves RC (2001) Doenças da goiabeira no cerrado. Embrapa – SP Circular Técnico 15: 25.
- Kado EI, Heskett MG (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated

with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2286-2295.

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

Marques ASA, Coelho MVS, Ferreira MASV, Damasceno JPS, Mendes AP, Vieira TM (2007) Seca dos Ponteiros da Goiabeira Causada por *Erwinia psidii*: Níveis de Incidência e Aspectos Epidemiológicos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29: 488-493.

Mhedbi-Hajri N, Hajri A, Boureau T, Darrasse A, Durand K, et al. (2013) Evolutionary History of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas axonopodis*. *PLoS ONE* 8(3): e58474. doi:10.1371/journal.pone.0058474

Maynard Smith J, Smith NH, O'rourke M, Spratt BG (1993). How clonal are bacteria? *Proceeding of the National Academy of Sciences* 90: 4384-4388

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

Rademaker JLW, De Bruijn FJ (1997). Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In Anolles GG, Gresshoff PM (Eds.). *DNA markers: protocols, applications & overviews*. New York. J. Willey & sons 151- 171.

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

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

Romeiro RS, Oliveira, JR, Pomella, AWV, Barbosa JG, Couto FAA (1994) Situação e perspectivas de controle da morte das pontas da goiabeira (*Erwinia psidii*) em Minas Gerais, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 19: 309.

- Schaad NW (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Pau-Minesota. APS Press The American Phytopathological Society.
- Shannon CE, Wiener W (1949). The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, Urbana, IL
- Sneath PH, Skoal RR (1999) Numerical taxonomy. San Francisco, CA: W.H. Freeman and company, p.573.
- Stoddart JA, Taylor JF (1988). Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. Genetics 118:705-11.
- Teixeira, ACO, Marques, ASA, Ferreira MASV (2009) Low genetic diversity among pathogenic strains of *Erwinia psidii* from Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 40: 78-684.
- Uesugi CH, Melo PAF, Lima MLP, Moraes CA, Tomita CK, Café ACF, Ueno B (2001) Ocorrência de *Erwinia psidii* em goiabeira no Distrito Federal. In: Congresso Paulista de Fitopatologia 24.
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn, FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (REP-PCR). Methods in Molecular Cell Biology 5: 25–40.

CAPÍTULO 2

Resistência de *Eucalyptus* spp. à *Erwinia psidii*

RESUMO

A seca de ponteiros do eucalipto, causada por *Erwinia psidii*, é considerada uma doença emergente e com elevado potencial de perdas na eucaliptocultura. O uso de material resistente é via de regra, a melhor estratégia para o controle de doenças em espécies arbóreas. Entretanto, até o momento não se sabe o nível de resistência de espécies de *Eucalyptus* à infecção dessa bactéria. Assim, neste trabalho, avaliou-se, por inoculação sob condições controladas, a resistência de *Eucalyptus pellita*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus grandis*, quanto à infecção de *E. psidii*. Observou-se variabilidade inter e intra-específica entre os materiais testados. A espécie *E. pellita* e uma procedência de *E. urophylla* apresentaram maior número de genótipos resistentes. Os resultados deste trabalho são importantes para nortear a busca de fontes de resistência para a seca de ponteiros do eucalipto.

INTRODUÇÃO

Recentemente, uma nova e severa doença foi relatada na cultura do eucalipto. Denominada de seca de ponteiros, ela é causada pela bactéria *Erwinia psidii*, descrita inicialmente no Uruguai, Argentina (Coutinho et al. 2011) e no Brasil (Arriel et al. 2014). No Brasil, a doença foi observada em plantios clonais de *E. saligna*, de híbridos de *E. urophylla* × *E. grandis* ("urograndis") e em plantios seminais de *E. grandis* e *E. dunnii* (Arriel et al. 2014). 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, necrose do pecíolo e da nervura central das folhas. Nos ramos jovens das plantas, algumas vezes, podem ser observados o escurecimento da medula e exsudação macroscópica e microscópica de pus bacteriano. Em determinados clones são observados a murcha e morte da árvore no campo (Arriel et al. 2014).

O controle de doenças bacterianas em plantas é geralmente difícil, tornando-se praticamente impossível após o início da epidemia. Entre outros motivos, isso se dá devido à rápida multiplicação do patógeno e à pequena disponibilidade de produtos registrados (Fritscher-Neto & Borém, 2012). Observações de campo têm demonstrado variabilidade de eucalipto quanto à resistência à seca de ponteiros (Acelino C Alfenas, comunicação pessoal, 2015), fazendo da resistência genética uma possibilidade de controle. A resistência genética no controle de doenças tem sido utilizada na eucaliptocultura desde o final da década de 1980. Aliada à característica de multiplicação clonal do eucalipto, a resistência foi fundamental no controle do cancro do eucalipto (*Chrysoporthe cubensis*) no Brasil (Guimarães et al. 2010). Atualmente, já existem protocolos de avaliação e seleção de clones resistentes às principais doenças que incidem na cultura (Fonseca et al. 2010). Para *E. psidii* foi desenvolvido recentemente um protocolo de inoculação que induz nas plantas os mesmos sintomas da doença no campo (Hélio G. Ferraz, comunicação pessoal).

Assim, em função da característica da doença e da variação em sua intensidade entre diferentes espécies e clones de *Eucalyptus* no campo, acredita-se que o plantio de materiais resistentes seja uma alternativa eficiente para o controle da seca de ponteiros. Portanto, a busca de fontes de resistência é fundamental para a seleção de materiais

resistentes para plantio comercial bem com para embasar os programas de cruzamento inter e intraespecífico, visando à obtenção de materiais resistentes. Assim, neste trabalho avaliou-se a resistência de diferentes genótipos de eucalipto a infecção de *E. psidii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolado

Para a inoculação foi utilizado o isolado LPF 0534 de *E. psidii*, da Coleção de Culturas do Laboratório de Patologia Florestal (UFV), obtido de *Eucalyptus dunnii*, proveniente de Guaíba, Rio Grande do Sul e caracterizado por Arriel et al. (2014). O isolado utilizado foi cultivado em meio sólido 523 (Kado & Heskett, 1970) e incubado por 24 h a 28°C.

Material Vegetal

Para a identificação de fontes de resistência a *E. psidii* foram avaliadas progênies intraespecíficas de *E. pellita*, *E. camaldulensis*, *E. urophylla*, *E. saligna* e *E. grandis*, sendo que para *E. urophylla* foram avaliadas plantas provenientes de três procedências (Timor, Ilege e Litara). Essas espécies foram escolhidas em virtude de sua importância silvicultural no Brasil e pela disponibilidade de sementes. Foram inoculadas 30 mudas de cada procedência ou espécie, totalizando 210 plantas avaliadas. Como testemunha foram utilizadas 10 plantas do clone 6061 (*E. urophylla* × *E. grandis*), por se mostrar muito suscetível à doença no campo (Arriel et al. 2014). As mudas seminais foram produzidas em tubetes, contendo substrato Carolina Soil® (Sphagnum 70%, palha de arroz torrefada 20%, perlita 10%) e enriquecido com superfosfato (6.0 kg m⁻³) e Osmocote® (19: 06: 10 em 1.5 kg m⁻³). Depois da germinação das sementes, realizou-se o desbaste das mudas excedentes, mantendo apenas a planta mais vigorosa por recipiente. Aos 60 dias de idade, as mudas foram transplantadas para sacolas com capacidade de 2L contendo o mesmo substrato e fertilizadas quinzenalmente com solução de NPK (05: 10: 30 a 6 g L⁻¹).

Inoculação e avaliações

Para a inoculação das mudas, a haste principal foi marcada com fitas adesivas delimitando os pontos de inoculação. Foram inoculadas as três primeiras gemas axilares do ápice da haste principal com palitos de madeira previamente esterilizados, impregnados com cultura bacteriana. Foram utilizadas três testemunhas, para cada tratamento, cujas plantas foram apenas feridas com palito estéril. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação da Clonar Resistência a Doenças Florestais e avaliadas em intervalos de quatro em quatro dias até trinta e dois dias após a inoculação (dai). Para cada planta foi atribuída uma nota de acordo com a presença de sintomas de seca de ponteiros. Para isso, utilizou-se a escala de notas (Figura 1) desenvolvida por Hélivio G. Ferraz (dados não publicados), onde: 0- plantas sem sintomas; 1- necrose da nervura central e, ou nervuras secundárias; 2- morte de folhas sem perda de dominância apical; 3- minicancro e, ou cancro; 4- morte do ápice com perda de dominância apical; e 5- morte do terço apical da haste principal. Visando à confirmação da bactéria nos tecidos da planta, as mudas foram submetidas à presença de exsudação microscópica de pus bacteriano, 32 dai.

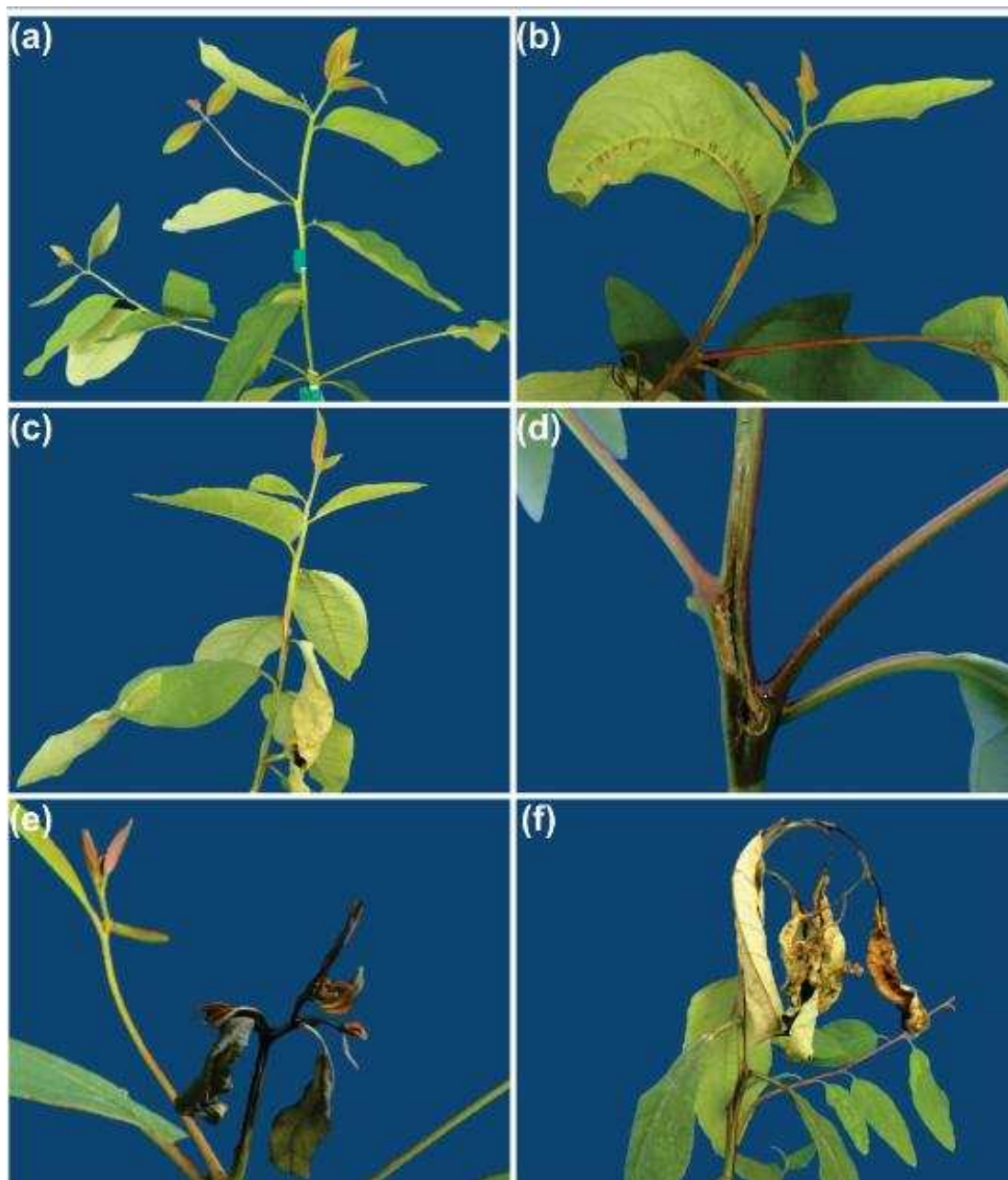


Figura 1: Escala de notas utilizada para avaliar a seca dos ponteiros causada por *Erwinia psidii* em *Eucalyptus* spp. (a) 0- Plantas sem sintomas; (b) 1- Necrose da nervura central e, ou nervuras secundárias; (c) 2- Morte de folhas sem perda de dominância apical; (d) 3- Mini cancro e, ou cancro; (e) 4- Morte do ápice com perda de dominância apical; e (f) 5- Morte do terço apical da haste principal. Figura gentilmente cedida por Hélivio G. Ferraz (dados não publicados).

Delineamento Experimental

O experimento foi esquematizado em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos (espécies e procedências de *Eucalyptus* spp.) e 30 repetições. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso, contendo uma planta.

RESULTADOS

Aos quatro dias após a inoculação surgiram os primeiros sintomas na base das folhas do terço apical das mudas. As primeiras lesões iniciaram como pequenas manchas verde-escuras, encharcadas e oleosas (anasarca), posteriormente evoluíram para necrose das nervuras. Com o passar do tempo os sintomas evoluíram para a queima do ápice e em alguns casos todo o terço apical da muda se tornou necrosado. Esporadicamente, em algumas plantas houve a formação de mini cancro, podendo ser superficial ou mais profundo (Figura 2). Além dos sintomas descritos, observou-se exsudação macroscópica e microscópica de pus bacteriano (Figura 2).

Houve diferença no nível de resistência inter e intra-específica (Figura 3). Em todos os tratamentos, foram obtidos indivíduos com morte do terço apical, nota 5 da escala. Apenas *E. pellita* e uma procedência de *E. urophylla* apresentaram mais de 50% de plantas resistentes (nota 1 e, ou 2), já os demais materiais apresentaram baixa frequência de indivíduos resistentes (Figuras 4 e 5).

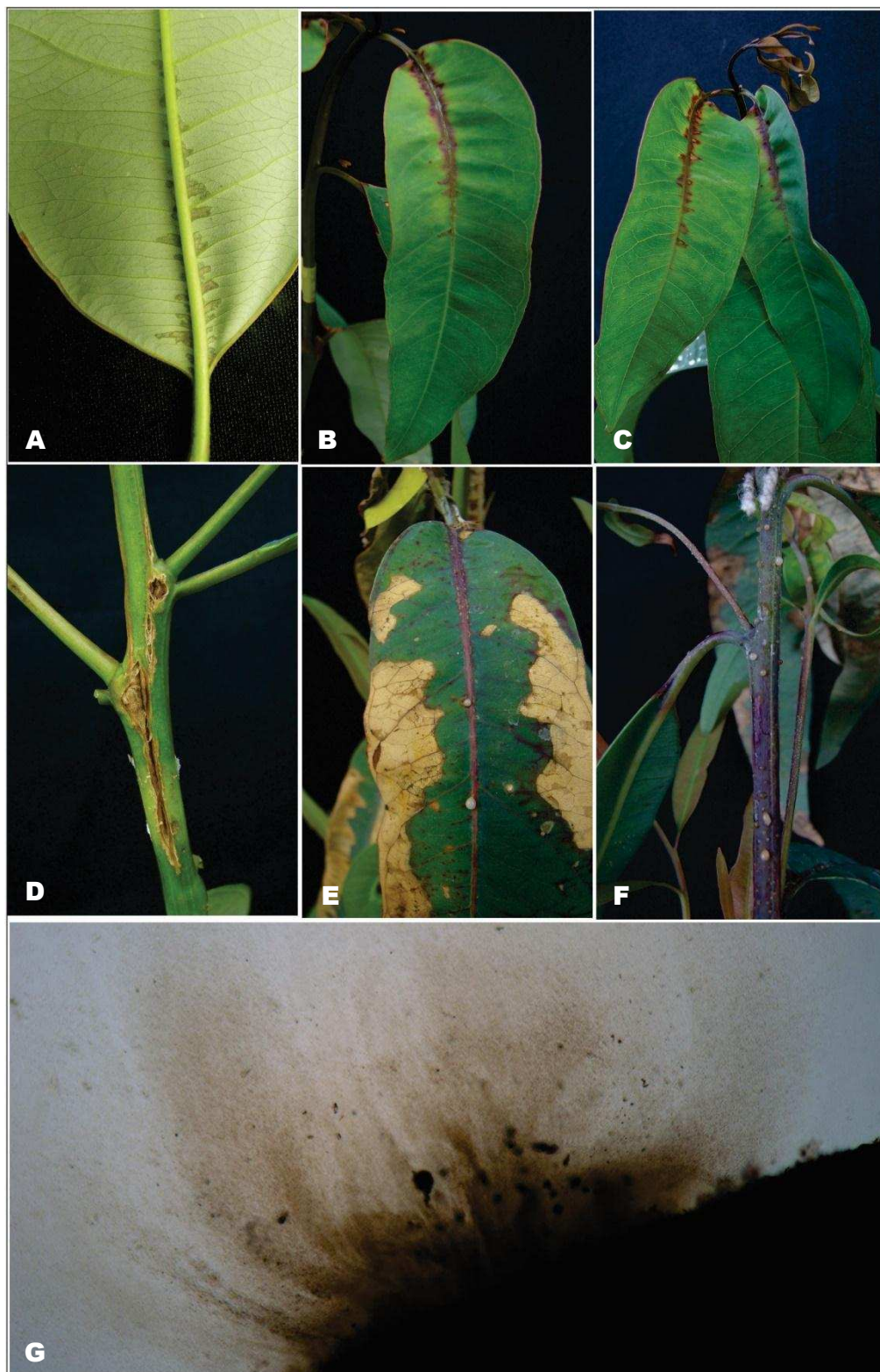


Figura 2: Sintomas observados nas espécies de *Eucalyptus* spp, inoculadas com *Erwinia psidii* (LPF 0534). A - Anasarca; B - necrose da nervura principal; C - morte do ápice; D – mini cancro; E - exsudação de pus bacteriano na folha; F - exsudação de pus bacteriano no caule; G - exsudação microscópica de pus bacteriano em gota.

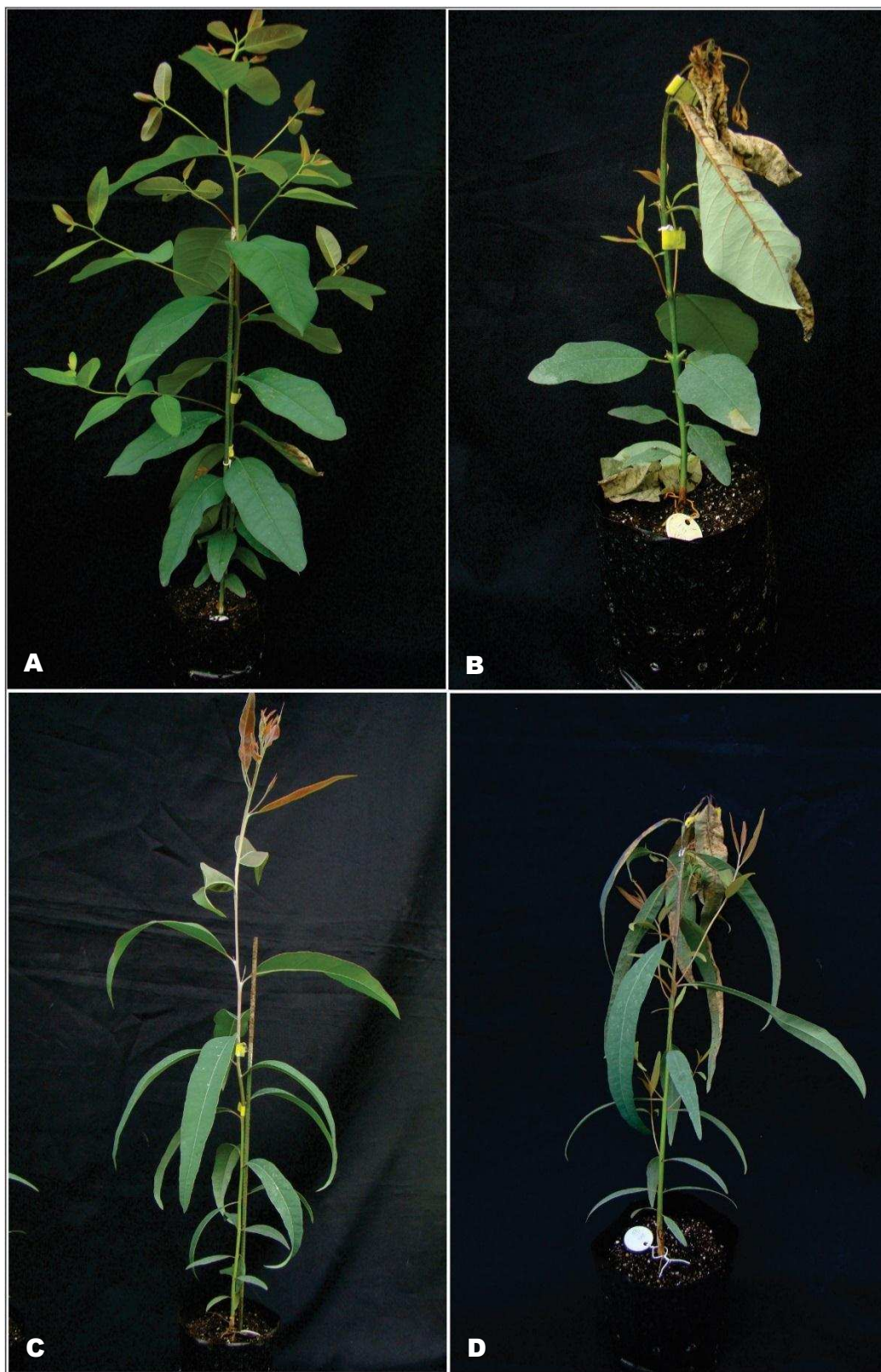


Figura 3: Plantas de *Eucalyptus pellita* resistente (A) e suscetível (B) a *Erwinia psidii* e plantas de *E. camaldulensis* resistente (C) e suscetível (D) .

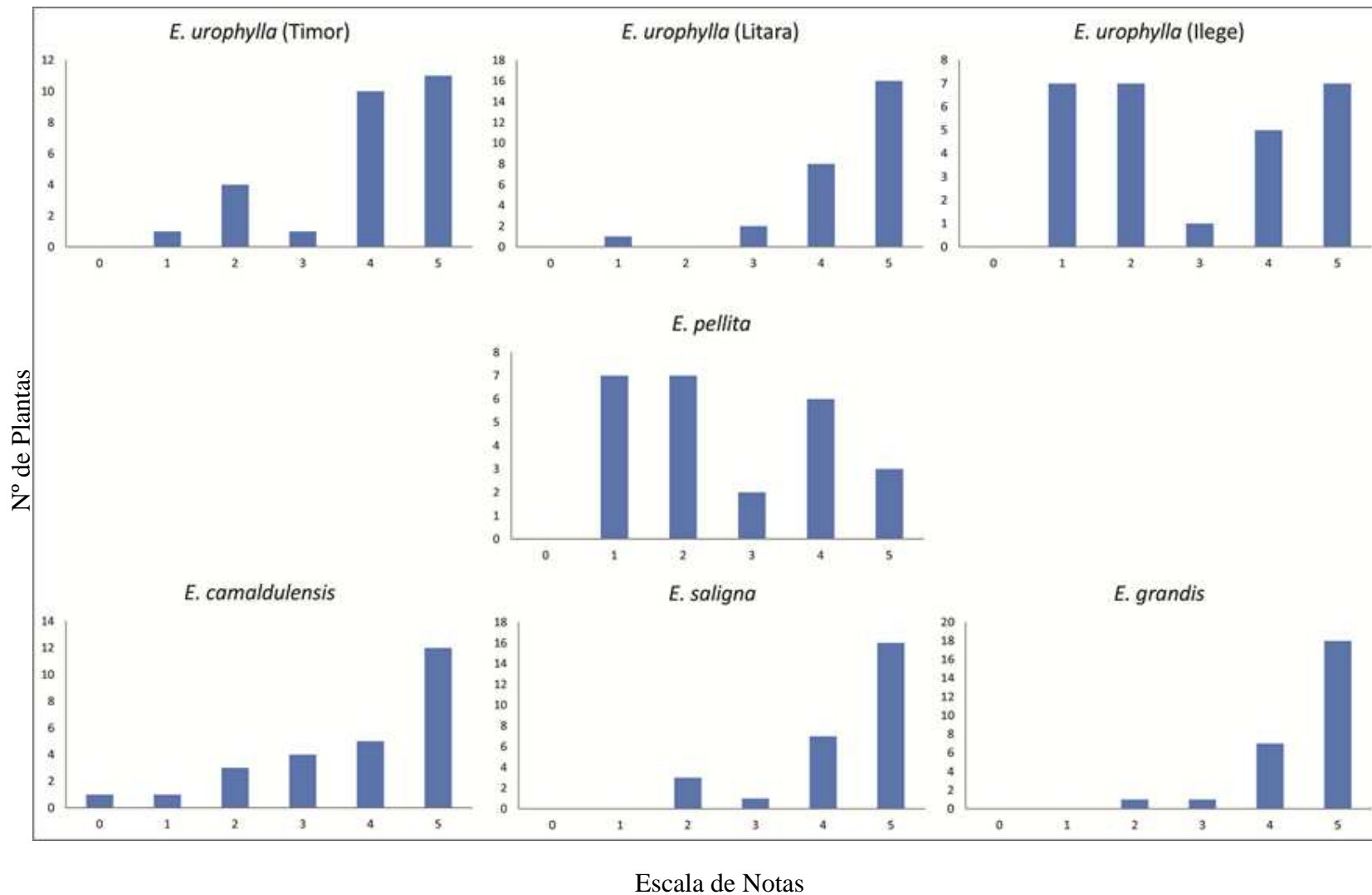


Figura 4: Distribuição do número de plantas por espécie avaliada e por nota recebida pela escala de notas.

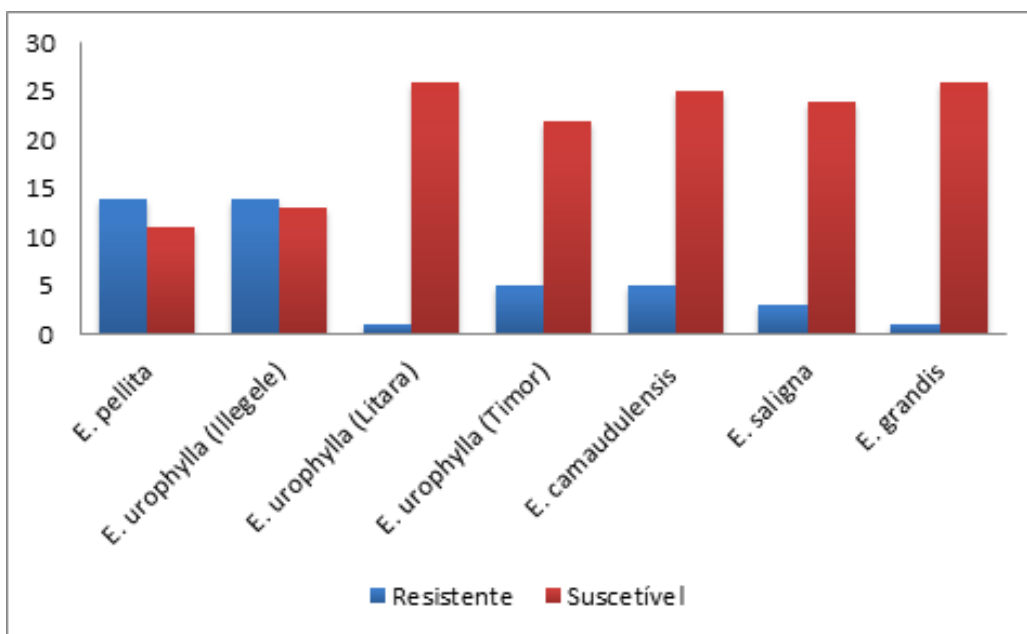


Figura 5: Número de plantas resistentes e suscetíveis por espécie de Eucalyptus.

Tabela 1: Classificação das progênies de Eucalyptus spp. quanto à resistência à seca de ponteiros, inoculadas com o isolado LPF 0534 de *Erwinia psidii*, baseada na escala de sintomas.

Espécie	Procedência	Número de Plantas Resistentes (notas 1 e/ou 2)	Porcentagem de plantas resistentes (%)
<i>E. pellita</i>	Clonar	16	59,23
<i>E. urophylla</i>	Ilege	14	51,85
<i>E. urophylla</i>	Timor	5	18,52
<i>E. urophylla</i>	Litara	1	3,70
<i>E. camaldulensis</i>	Clonar	4	14,81
<i>E. saligna</i>	Clonar	3	11,11
<i>E. grandis</i>	Clonar	1	3,70

DISCUSSÃO

Dentre as estratégias de controle de doenças de eucalipto, o uso da resistência genética está entre as alternativas mais eficientes (Alfenas et al. 2009; Xavier et al. 2007). Por tanto a busca de novas fontes de resistência torna-se fundamental para nortear os programas de cruzamentos que visam à transferência da característica de resistência (Mafia et al. 2011). Todas as espécies avaliadas neste trabalho apresentaram variabilidade quanto à resistência a *E. psidii*. Entretanto, *E. pellita* e uma das três procedências de *E. urophylla* (Ilege) apresentaram frequência de plantas resistentes acima de 50%. Além da resistência a *E. psidii* demonstrada neste trabalho, *E. pellita* constitui também fonte de resistência à ferrugem, mancha-de-*Calonectria* e à murcha-de-*Ceratocystis* (Guimarães et al. 2010), apesar de ter algumas procedências suscetíveis à mancha-de-*Calonectria* (Alfenas et al. 2015). Esses resultados demonstram que *E. pellita* é uma importante espécie para os programas de melhoramento genético do eucalipto, principalmente como fonte de genes de resistência a doenças.

Assim como *E. pellita*, uma das procedências de *E. urophylla* apresentou mais de 50% de plantas resistentes. Esse resultado é importante do ponto de vista de controle da doença, já que *E. urophylla*, juntamente com *E. grandis*, é uma das principais espécies de eucalipto utilizadas no Brasil, como espécie pura e principalmente em cruzamentos com *E. grandis* (Mafia et al. 2011). Entretanto, como *E. grandis* e duas das três procedências de *E. urophylla* foram suscetíveis a *E. psidii*, recomenda-se que os clones híbridos “urograndis” ou *E. urophylla* sejam selecionados quanto à resistência à seca de ponteiros, antes do plantio do clone em escala comercial.

Foi considerada como suscetível as plantas que apresentaram nota 4 e ou 5 (perda da dominância apical) e nota 3, que apresentavam o sintoma de cancro. A perda da dominância apical, leva ao superbrotamento das gemas laterais e atraso no desenvolvimento das mudas (Arriel et al. 2014), que acarreta em prejuízo ao eucaliptocultor. E a presença de cancro, pode servir de porta de entrada para outros patógenos, levar a quebra da planta e tornar a madeira de baixa qualidade para serraria (Alfenas et al. 2009).

Neste trabalho, a maioria das plantas inoculadas (71,4%) foi suscetível a *E. psidii* o que demonstra o potencial de danos dessa doença na eucaliptocultura. Entretanto, a variabilidade para resistência encontrada demonstra ser possível a seleção de genótipos resistentes. Diferentemente do observado neste trabalho, em goiabeira Rezende (2006) verificou que as principais variedades plantadas são altamente suscetíveis à bactéria, sendo necessário recorrer a espécies não domesticadas em busca de fontes de resistência.

Neste trabalho utilizou-se apenas um isolado de *E. psidii* na seleção para resistência, baseado no fato das populações deste patógeno apresentarem baixa diversidade genética (Capítulo 1). Entretanto, é necessário avaliar a durabilidade da resistência encontrada, considerando diferentes isolados do patógeno (Coutinho et al. 2000), para maior precisão na determinação da resistência a esta doença. A variabilidade interespecífica e intraespecífica para resistência encontrada neste trabalho também foi observada por outros autores, com outros patógenos e outras espécies e procedências de *Eucalyptus* spp. (De Carvalho et al. 1998; Guimarães et al. 2010; Mafia et al. 2014; Mafia et al. 2011). Estes resultados demonstram que a resistência genética pode efetivamente ser utilizada no controle das principais doenças da eucaliptocultura.

REFERÊNCIAS

- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009). Clonagem e doenças do eucalipto. 2^a Ed. Editora UFV. Viçosa, MG. 500 p.
- Alfenas RF, Lombard L, Pereira OL, Alfenas AC, Crous PW (2015). Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Studies in Mycology* 80: 89-130.
- Arriel DAA, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior, N, Souza HP, Alfenas, AC (2014). Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. *Forest Pathology* 44: 225-265.
- Coutinho TA, Brady CL, Vaart M, Van der Wart M, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Perez C, Wingfield MJ (2011). A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 40: 55–60.
- Coutinho TA, Roux J, Riedel, KH, Terblanche, J, Wingfield MJ (2000). First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. *Forest Pathology*, 30(4): 205-210.
- De Carvalho ADO, Alfenas AC, Maffia, LA, Carmo, MGF. (1998). Resistência de espécies, progênies e procedências de *Eucalyptus* à ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33(2): 139-147.
- Fonseca SM, Resende MDV, Alfenas AC, Guimarães LMS, Assis TF, Grattapaglia D. (2010). Manual prático de melhoramento genético de eucalipto. Editora UFV. Viçosa, MG. v.1. 200 p.
- Fritsche-Neto R, Borém A (2012). Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos. Visconde do Rio Branco: Suprema, p. 240.
- Guimarães LMS, Resende MDV, Lau D, Rosse LN, Alves AA, Alfenas AC (2010). Genetic control of *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* resistance to canker caused by *Chrysosporthe cubensis*. *Genetics and Molecular Biology*, 33(3):525-531.

- Kado EI, Heskett MG (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60: 969-976.
- Mafia RG, Alfenas AC, Ferreira MA (2014). Avaliação da resistência do eucalipto à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. *Revista Árvore*, 38(4): 649-656.
- Mafia RG, Alfenas AC, Ferreira EM, Binoti DHB (2011). Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. *Revista Árvore*, 35(4): 817-824.
- Rezende AMFA (2006). Estudo sobre a resistência genética e produtos químicos no controle da bacteriose da goiabeira, M.sC. Tese, Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- Xavier AA, Junghans DT, Alfenas AC (2007). Resistance of *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* to rust. *Revista Árvore*, 31(4): 731-735.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- 1- A técnica rep – PCR foi eficiente para a caracterização da diversidade genética da população em estudo.
- 2- As análises de rep – PCR revelaram que há baixa variabilidade genética entre as populações de *E. psidii* de eucalipto e goiaba.
- 3- Os isolados de eucalipto foram agrupados de acordo com a região geográfica.
- 4- As espécies e procedências de *Eucalyptus* diferiram quanto á resposta da planta a infecção de *E. psidii*.
- 5- *Eucalyptus pellita* foi à espécie que apresentou maior frequência de plantas resistentes (59,23 %), seguida de *E. urophylla* (Ilege) (51,85%).