

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA MORTE DE FLORES DE
PEREIRAS EUROPEIAS (*Pyrus communis* L.) NO RIO GRANDE DO SUL

Cátia Cristina Rommel
Engenheira Agrônoma/UFRGS

Dissertação apresentada com um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Abril de 2009

“Sem um fim social, o saber será a maior das futilidades.”

Gilberto Freire

AGRADECIMENTOS

Aos percalços por me fazerem crescer, às fronteiras por me mostrarem que limites são linhas imaginárias ultrapassáveis e a um não sei quê que me faz ser mais do que razão.

À minha família por ser família, aos meus pais pelo suporte e apoio incondicional, à minha tia Marli por estar comigo e aos meus sobrinhos por matarem minha sede: puros, límpidos e revigorantes como água fresca.

À distância que ensina novas formas de proximidade e à proximidade de Elisa, Viole, Bruno, Javi e Lobo.

Às mãos de comadre que me sustentaram, acolheram, guiaram e sem as quais não sei se seria possível a passagem destes dois anos: Fal e Isa. Aos velhos ou novos, mas sempre amigos: Mateus, Bruna, Viviane, Márcia, Fátima, Léo, General e seu Comandante.

À casa da 'Família Feliz' por permitir que eu vivesse em um lar.

Aos colegas e amigos fitossanitários Adriana, Joseane, Giovana, Felipe e Júlia pela boa convivência, apoio e chimarrões. À Joseane meu agradecimento especial por ouvir minhas experiências de trabalho, compartilhar as suas e assim evitar a reincidência de erros.

Aos funcionários da Embrapa Uva e Vinho pela ajuda e prestatividade, em especial ao Sr. Valdair, Sra. Justina, Tânia e Angélica.

Ao Dr. João Bernardi e ao Prof. Emerson Del Ponte pela ajuda e atenção em dúvidas fitotécnicas e epidemiológicas, respectivamente.

À Embrapa pelo financiamento do projeto, ao Pomar Mussatto por abrir suas portas para a pesquisa e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Meus sinceros agradecimentos à ciência, ao PPG Fitotecnia, ao Prof. Valmir Duarte e à Dra. Rosa Valdebenito-Sanhueza por terem sido essenciais na escolha de meus caminhos.

ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA MORTE DE FLORES DE PEREIRAS EUROPEIAS (*Pyrus communis* L.) NO RIO GRANDE DO SUL ¹

Autora: Cátia Cristina Rommel

Orientador: Valmir Duarte

Co-orientadora: Rosa Maria Valdenbenito-Sanhueza

RESUMO

Observou-se recentemente a morte de flores de pereiras europeias (*Pyrus communis* L.) em pomares de Vacaria, RS. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* tem sido associada a este sintoma em vários países, entretanto, não há registros deste patógeno associado a flores de pereiras no Brasil. Além disso, *P. syringae* pv. *syringae* possui uma fase epifítica, não bastando a detecção da bactéria para caracterizá-la como agente causal da doença, no caso de primeiro registro no país. Assim, se faz necessário um estudo etiológico e epidemiológico da morte de flores de pereiras europeias no Rio Grande do Sul. Objetivou-se com este trabalho (i) identificar o agente causal; (ii) conhecer as condições de ambiente e hospedeiro que favorecem a doença; (iii) monitorar a presença de bactérias em gemas ao longo do ano; (iv) quantificar a doença a campo; (v) verificar a ocorrência da doença em pomares de Vacaria, RS. Os resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos, PCR e sequenciamento do gene rRNA 16S de dois isolados patogênicos (Pack9 e Pack10) indicaram tratar-se de *Pseudomonas* sp., mas não *P. syringae* pv. *syringae*. O estágio fenológico, no momento da inoculação, não interferiu na intensidade da doença; temperaturas de 15 e 20 °C favoreceram a doença. A incidência média de flores necrosadas no estágio de plena floração foi de 3,8%. A presença de *Erwinia amylovora* e *Pantoea agglomerans* em gemas de pereiras europeias não foi detectada. A frequência de *P. syringae* pv. *syringae* e *Pseudomonas* sp. nas gemas foi de 0,7 e 16,3%, respectivamente, sendo que a última teve um pico em outubro (30%). A ocorrência da morte de flores foi registrada nos três pomares de pereiras europeias vistoriados em Vacaria, RS.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (73 p.) Abril, 2009.

ETIOLOGY AND EPIDEMIOLOGY OF BLOSSOM DEATH IN EUROPEAN PEAR (*Pyrus communis* L.) IN RIO GRANDE DO SUL¹

Author: Cátia Cristina Rommel
Adviser: Valmir Duarte
Co-adviser: Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza

ABSTRACT

Blossom death has been lately observed in European pear (*Pyrus communis* L.) orchards in Vacaria, RS. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* has been associated with this symptom in several countries. However, there is no report of this pear disease etiology in Brazil. Furthermore, *P. syringae* pv. *syringae* has an epiphytic phase, that is, its detection is not enough evidence to characterize it as the causal agent of the disease in case of the first record for the country. Thus, it is necessary to perform an etiological and epidemiological studies of the European pear blossom blast in Rio Grande do Sul. The objective of this work was (i) to identify the causal agent; (ii) to know the environmental and the host conditions that favor the disease; (iii) to monitor, through detection in buds, the presence of bacteria throughout the year; (iv) to quantify the disease in fields; (v) to verify the occurrence of the disease in orchards in Vacaria, RS. Two pathogenic isolates were obtained (Pack9 and Pack10) and the identification by physiological and biochemical tests, PCR and rRNA 16S gene sequencing showed they belong to the genus *Pseudomonas* but not *P. syringae* pv. *syringae*. The phenological stage at the time of inoculation did not affect the intensity of the disease; temperatures of 15 and 20 °C favor the disease. The average incidence of necrotic flowers at the full bloom stage was 3.8%. There was no detection of *Erwinia amylovora* or *Pantoea agglomerans* in European pear buds. *P. syringae* pv. *syringae* was detected in low frequency (0.7%) and *Pseudomonas* sp. mean frequency was 16.3%, while there was a higher frequency (30%) in October. The disease was observed in all three European pear orchards visited in Vacaria, RS.

¹ Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (73 p.) April, 2009

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 A cultura da pereira	4
2.2 Crestamento bacteriano de pereiras.....	5
2.3 Fase epifítica de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	8
2.4 Crestamento bacteriano <i>versus</i> fogo bacteriano	9
2.5 Identificação de bactérias	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Isolamento de possíveis agentes etiológicos.....	13
3.2 Teste de patogenicidade	14
3.3 Caracterização dos isolados	16
3.3.1 Testes bioquímicos e fisiológicos	16
3.3.3 Sequenciamento e análise <i>in silico</i> dos produtos amplificados	21
3.4 Efeitos da temperatura, estágio fenológico e isolado na intensidade da doença.....	22
3.4.1 Instalação do ensaio.....	22
3.4.2 Construção de escala descritiva.....	24
3.4.3 Avaliação do ensaio	24
3.5 Detecção e flutuação populacional de patógenos em gemas de pereiras 'Packham's Triumph'	25
3.5.1 Padronização do método de extração de DNA e detecção	25
3.5.2 Projeção de oligonucleotídeos iniciadores	27
3.5.3 Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores	28
3.5.4 Sensibilidade do método.....	29
3.5.5 Coleta e processamento das amostras.....	31
3.5.6 Detecção e flutuação populacional	31
3.6 Incidência da doença a campo.....	32
3.7 Ocorrência da doença em pomares de Vacaria, RS	32

4 RESULTADOS.....	34
4.1 Isolamento de possíveis agentes etiológicos.....	34
4.2 Teste de patogenicidade	36
4.3 Caracterização dos isolados.....	37
4.4. Escala descritiva para morte de flores de pereiras europeias	40
4.5 Efeitos da temperatura, estágio fenológico e isolado na infecção e desenvolvimento da doença.....	41
4.6.1 Padronização do método de extração de DNA e detecção	44
4.6.2 Projeção de oligonucleotídeos iniciadores	46
4.6.3 Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores.....	47
4.6.4 Sensibilidade do método	49
4.6.6 Detecção e flutuação populacional.....	51
4.7 Incidência da doença a campo	55
4.8 Ocorrência da doença em pomares de Vacaria, RS.....	55
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES.....	64
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
9 APÊNDICE.....	73

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Concentração de reagentes, condições de PCR e características de eletroforese utilizadas para cada par de oligonucleotídeo iniciador. Porto Alegre, RS, 2009.....	29
2. Características dos isolados de fungos obtidos na primavera de 2007. Vacaria, RS, 2007.....	34
3. Características LOPAT dos isolados patogênicos às flores de pereiras europeias 'Packham's Triumph' e de <i>Pseudomonas</i> spp. Porto Alegre, RS, 2008.....	37
4. Similaridade entre as sequências parciais dos isolados patogênicos, obtidas a partir do sequenciamento do gene rRNA 16S, e sequências depositadas no GenBank. Porto Alegre, RS, 2009.....	40
5. Significância estatística (teste F, ANOVA paramétrica) do efeito da temperatura, isolado, estágio fenológico e suas interações sobre o índice de doença da morte de flores de pereiras europeias 'Packham's Triumph'. Vacaria, RS, 2008.....	42
6. Detecção de bactérias em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' coletadas a cada dois meses durante o ano de 2008. Proporção de amostras positivas (%). Porto Alegre, 2009	52

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Exsudação bacteriana em flores de pereiras europeias 'Packham's Triumph' inoculadas com os isolados Pack9 (A) e Pack10 (B). Vacaria, RS, 2008..... 36
2. Amplificação de DNA dos isolados patogênicos por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6 (1-4) e B1/B2 (5-8): M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1 e 5) Pack9; (2 e 6) Pack10; (3 e 7) Pss281 (controle positivo); (4 e 8) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2008..... 38
3. Amplificação do DNA dos isolados obtidos em 2008 por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6 (Figura A) e B1/B2 (Figura B): M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1) Golin 1; (2) Golin 2; (3) Golin 4; (4) Golin 5; (5) Golin 6; (6) Golin 8; (7) Golin 11; (8) Golin 12; (9) Golin 13; (10) Golin 14; (11) Golin 15; (12) Golin 16; (13) Golin 17; (14) Golin 18; (15) Caieron 13; (20) Caieron 27; (21) Caieron 29; (22) Boff 1; (23) Boff 2; (24) Pss281 (controle positivo); (25) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2009..... 39
4. Escala descritiva para morte de flores de pereiras europeias (*Pyrus communis* L.) associada à *Pseudomonas* sp. Vacaria,RS,2008..... 41
5. Curvas de progresso da morte de flores de pereiras europeias 'Packham's Triumph' sob diferentes temperaturas e inoculação de diferentes isolados. Ultimo ponto seguido por mesma letra em cada gráfico significa que as médias da última avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Vacaria, 2008..... 43
6. Perfil eletroforético dos produtos de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6 utilizando diferentes métodos de extração de DNA do isolado patogênico Pack9, em cultura pura ou na presença de macerado de gemas de pereiras europeias: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1) Pack9/lise alcalina; (2) Pack 9/ fervura; (3) Pack9/lise de Edwards; (4) Pack9/FTA; (5) gema+Pack9/fervura; (6); gema+Pack9/lise de Edwards; (7) gema+Pack9/FTA; (8) gema+Pack9/FTA + pré-lavagem com álcool; (9) gema+Pack9/maceração com micropistilo/FTA; (10) Pack9/palito de madeira/fervura; (11) Pss281 (controle positivo); (12) água (controle negativo). (5-8) maceração com palito de madeira. Porto Alegre, RS, 2008..... 45

Alegre, RS. 2008.....

7. Perfil eletroforético dos produtos de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6, utilizando diferentes métodos de extração de DNA dos isolados Pack9, Pack10 e Pss281, em cultura pura ou na presença de macerado de gemas de pereiras europeias: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1) Pack 9/ fervura; (2) Pack 10/ fervura; (3) Pack 9/ FTA; (4) Pack 10/ FTA; (5) Pss281/ fervura; (6) Pss281/ FTA; (7) gemas + Pss281 + PVP/fervura; (8) gemas + Pss281 + PVP/ FTA; (9) gemas + Pss281 + PVP/ FTA + lise de Edwards; (10) gemas + Pss281 + PVP/ FTA + pré-lavagem com álcool; (11) gemas+Pss281 + PVP /FTA + lise de Edwards + pré-lavagem com álcool; (12-15) repetição de 8-11; (16) água (controle negativo). Porto Alegre, RS. 2008 46
8. Perfil eletroforético dos produtos de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6; M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1) Pack 9; (2) Pack 10; (3) Pss281; (4) Ea551; (5) Pa1331; (6) água (controle negativo). Porto Alegre, RS. 2009..... 48
9. Perfil eletroforético dos produtos de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores SyrB1/SyrB2 (1-6), DspE1/DspE2 (7-12) e PaaA1/PaaA2 (13-18): M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1,7,13) Pack 9; (2, 8,14) Pack 10; (3, 9, 15) Pss281; (4, 10, 16) Ea551; (5, 11, 17) Pa1331; (6, 12, 18) água (controle negativo). Porto Alegre, RS. 2009..... 49
10. Sensibilidade do método de detecção de *Pseudomonas* spp. em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' através de extração de DNA por FTA + PVP + pré-lavagem em álcool e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1-10) diluições células de Pss281 de 10¹² até 10² UFC.mL⁻¹ em macerado de gemas; (11) Pss281 (controle positivo); (12) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2009..... 49
11. Sensibilidade do método de detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' através de extração de DNA por FTA + PVP + pré-lavagem em álcool e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores SyrB1/SyrB2: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1-10) diluições sucessivas de células de Pss281 de 10¹² até 10² UFC.mL⁻¹ em macerado de gemas; (11) Pss281 (controle positivo); (12) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2009..... 50

12. Sensibilidade do método de detecção de *Pantoea agglomerans* em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' através de extração de DNA por FTA + PVP + pré-lavagem em álcool e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores PaaA1/PaaA2: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1-10) diluições células de Pa1331 de 10¹⁰ até 13 UFC.mL⁻¹ em macerado de gemas; (11) Pa1331 (controle positivo); (12) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2009..... 50
13. Sensibilidade do método de detecção de *Erwinia amylovora* em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' através de extração de DNA por FTA + PVP + pré-lavagem em álcool e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores DspE1/DspE2: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1) 150 ng μL^{-1} ; (2) 75 ng μL^{-1} ; (3) 37,5 ng μL^{-1} ; (4) 18,75 ng μL^{-1} ; (5) 9,37 ng μL^{-1} , (6) 4,68 ng μL^{-1} (7) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2009..... 51
14. Proporção de detecção de *Pseudomonas* spp. em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' através de extração de DNA por FTA + PVP + pré-lavagem em álcool e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6. Porto Alegre, RS, 2009..... 52
15. Detecção de *Pseudomonas* spp. em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' através de extração de DNA por FTA + PVP + pré-lavagem em álcool e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1-48) amostras coletadas no mês de outubro; (49) Pss281 (controle positivo); (50) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2009..... 53
16. Temperaturas e amplitude térmica (°C) (Figura A); umidade relativa (%) (Figura B) e precipitação acumulada (mm) (Figura C) em Vacaria, RS, de acordo com o registro da estação meteorológica EMBRAPA-EE (5179), durante o ano de 2008. Dados decendiais. Setas indicam época de coleta de gemas de pereiras. Vacaria, RS, 2009..... 54
17. Incidência de flores necrosadas por planta no estágio de plena floração e proporção (por planta) de amostragens em que se detectou *Pseudomonas* spp. por meio de PCR com os oligos A1/B6. Porto Alegre, 2009..... 56

1 INTRODUÇÃO

Há no Brasil uma grande disparidade entre o consumo e produção de peras, sendo que a produção não chega a representar 30% do que é consumido. Apesar de que a área de cultivo de pereiras seja pequena, a produtividade é também um fator importante, pois representa apenas 1/3 da verificada em países de quem o Brasil importa peras.

Os frutos de pereiras europeias (*Pyrus communis* L.) são os mais apreciados pelos consumidores brasileiros, mas as plantas também são as mais exigentes quanto a condições edafoclimáticas. A dificuldade de adaptação climática das pereiras europeias, e o abortamento de gemas decorrente disso, sempre foram considerados as principais causas da baixa produtividade da cultura. Entretanto, recentemente se observou outro problema em pomares comerciais de pereiras europeias cvs. 'Packham's Triumph', 'William's Bon Chretien' e "Abate Fetel' em Vacaria, RS: a morte de flores. Os sintomas observados consistem em uma lesão necrótica, circular e escura sobre o cálice que em alguns poucos casos evolui para total necrose do receptáculo floral e morte da flor. Cancros em ramos e crestamento de folhas e ramos nunca foram observados.

Em muitos países sintomas idênticos estão associados à doença conhecida como crestamento bacteriano de pereiras, cujo agente causal é

Pseudomonas syringae pv. *syringae* van Hall. No Brasil o patógeno ocorre, mas nunca foi registrado associado a flores de pereiras, além de que nem todos os sintomas que caracterizam o cretamento bacteriano de pereiras foram observados em Vacaria. Há de se considerar ainda, que *P. syringae* pv. *syringae* apresenta fase epifítica, portanto, sua detecção não basta para configurá-la como agente causal da doença, principalmente no caso de primeiro registro da doença no país. Desta forma, se faz necessária uma investigação etiológica e epidemiológica da morte de flores de pereiras europeias que vem ocorrendo em Vacaria, RS.

As hipóteses envolvidas nesta investigação são (i) a morte de flores de pereiras europeias em pomares no Rio Grande do Sul é de etiologia biótica; (ii) *P. syringae* pv. *syringae* está associada a esta doença e (iii) existem condições de ambiente e hospedeiro específicas para a patogênese e são distintas das verificadas em outros países.

Para testar essas hipóteses, este trabalho teve como objetivo:

- Determinar o agente causal, através de isolamento de micro-organismos, testes de patogenicidade e procedimentos de identificação;
- Conhecer as condições de ambiente e hospedeiro que favorecem a doença, inoculando flores destacadas de pereiras em diferentes estágios fenológicos e submetendo-as a diferentes condições de temperatura;
- Monitorar, através de detecção molecular em gemas, a presença de bactérias ao longo do ano;
- Quantificar a doença a campo;

- Verificar a ocorrência da doença em pomares de Vacaria, RS.

Cabe ressaltar que por se tratar de um estudo etiológico, optou-se por chamar a doença investigada de 'morte de flores de pereiras europeias' para não haver associação precipitada do problema verificado em Vacaria com o crestamento bacteriano de pereiras associado à *P. syringae* pv. *syringae*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura da pereira

Dentre as frutas de clima temperado, a pera é a terceira mais consumida no Brasil, sendo superada apenas pela maçã e pêssego (Nakasu & Leite, 1990). No ano de 2005 foram consumidas no país 72 mil toneladas de peras, entretanto a produção nacional não ultrapassou 20 mil toneladas em 2.303 hectares de área plantada (FAO, 2007). Em decorrência disso, o Brasil se torna o maior importador de peras da América do Sul, sendo que a Argentina fornece 80% das importações (Banco do Brasil *apud* Marodin, 1998, p. 1).

A pereira no Brasil é, dentre as frutíferas de clima temperado, aquela em que não ocorreu o desenvolvimento de grandes áreas de produção, ficando restrita a plantios inexpressivos do ponto de vista comercial (Maia *et al.*, 1996). Segundo Camelatto *et al.* (1997), este pouco desenvolvimento é atribuído à baixa produtividade das plantas, principalmente das cultivares europeias (*Pyrus communis* L.) que são consideradas mais exigentes em frio que as cultivares asiáticas (*P. pyrifolia* Burm., *P. serotina*, *P. ussuriensis*, entre outras) (Nakasu & Leite, 1990). A produtividade de pereiras no Brasil tem aumentado (de 6 para 10,5 t.ha⁻¹ em 2005) mas ainda encontra-se muito inferior à de países vizinhos e de quem importa peras, como a Argentina, que tem produtividade média de 29,4 t.ha⁻¹ (FAO, 2007).

Os fatores limitantes para a expansão da cultura no Brasil são: falta de cultivares produtoras de frutas de boa qualidade, adaptadas às condições climáticas; indefinição de porta-enxertos; e, principalmente, o abortamento de gemas florais, que em alguns anos, e dependendo da cultivar, atinge de 30 a 100% das gemas florais (Nakasu & Leite, 1992).

O abortamento de gemas florais também é relatado como importante em cultivos de pereiras em outros países. Na Nova Zelândia, Wokurm (1997) afirma que este distúrbio pode resultar em total perda da produção. Na Espanha, o abortamento de gemas é relatado desde 1981 e foi atribuído à associação de *Pseudomonas* spp. fitopatogênicas com desordens fisiológicas, devido a condições climáticas, nutrição e idade da planta (Tora *et al apud* Marodin, 1998, p. 32). Para Montesinos & Vilardell (2001) a etiologia da doença é complexa: *P. syringae* pv. *syringae* van Hall e sua associação com nucleação de gelo tem sido relacionada com os sintomas desenvolvidos em anos frios. Os postulados de Koch foram completados para *P. syringae* (Montesinos & Vilardell, 1987 e 1991) e o estado nutricional da planta, no período de dormência, com relação a boro e açúcares solúveis tem sido relacionado com alta incidência da doença (Montesinos *et al.*, 1992). No Brasil, o abortamento de gemas florais também na presença de *Pseudomonas syringae*, além de situações de maior acúmulo de frio e baixo peso das gemas (Marodin, 1998).

2.2 Crestamento bacteriano de pereiras

O crestamento bacteriano de pereiras é considerado uma das principais patologias da pereira (Mansvelt & Hatting, 1990). Os sintomas do

crestamento bacteriano de pereiras descritos por Panagopolous & Crosse (1964) associavam a doença à *P. syringae*. Segundo estes autores, as sépalas e o receptáculo floral são os órgãos florais mais afetados, onde lesões circulares, de coloração negra e bordas mais ou menos irregulares aparecem. No pedicelo, a infecção inicial é na forma de estrias negras ao longo do eixo. Com o progresso da doença todos tecidos da flor são afetados ocasionando o crestamento. Os sintomas podem ainda constituir de necrose no cálice, manchas necróticas em frutos e folhas e cancos nos ramos.

No Chile, em 1974, Cancino *et al.* descreveram sintomas de crestamento bacteriano em flores de pereira como lesões escuras iniciando na parte externa das sépalas e receptáculo floral. As lesões progrediam rapidamente, produzindo o crestamento da flor inteira, do ramalhete floral e folhas.

Os sintomas de crestamento bacteriano em flores são semelhantes aos ocasionados em caso de alta severidade de abortamento de gemas florais dormentes associados à *P. syringae* pv. *syringae*, ocasionando redução de flores por ramalhete, flores anormais ou morte total das gemas (Montesinos & Vilardell, 2001). Isso evidencia que o inóculo para o crestamento de flores pode estar presente nas gemas.

As pereiras são suscetíveis ao crestamento das flores nos períodos de pré-floração até início da frutificação, sendo que na plena floração a suscetibilidade é maior (Whitsides & Spotts, 1991). Estes estádios fenológicos também são os mais suscetíveis a danos por geada e tais danos vem sendo atribuídos como um fator de predisposição ao crestamento das

flores (Panagopoulos & Crosse, 1964; Whitsides & Spotts, 1991). A atividade de nucleação de gelo exibida por vários isolados de *P. syringae* pv. *syringae* explicaria o efeito das temperaturas de congelamento no desenvolvimento do crestamento (Lindow *et al.*, 1978; Gross & Cody, 1985). Para Whitsides & Spotts (1991), a incidência de infecção aumenta depois de reação exotérmica ocasionada pelo incremento na temperatura decorrente da fusão do gelo induzido pela atividade nucleadora de *P. syringae* pv. *syringae*. Tal reação exotérmica foi detectada no tecido do ovário da flor. Sule & Seemuller (1987) atribuem o aumento da doença na presença de temperaturas de congelamento à disponibilização de nutrientes decorrente da ruptura das células vegetais com o dano de congelamento e que estimula o crescimento bacteriano.

Entretanto, danos severos de crestamento bacteriano em flores podem ocorrer na ausência de dano por geada, desde que haja presença de *P. syringae* pv. *syringae*, baixas temperaturas e umidade alta durante a floração (Montesinos & Vilardell, 1991; Waissbluth & Latorre, 1978). No Chile a doença também é relatada independente da ocorrência de geada (Cancino *et al.*, 1974). Latorre *et al.* (2002) concluíram que o crestamento bacteriano das flores de pereira ocorre na ausência de temperaturas de congelamento. Ainda para estes autores, a exposição dos tecidos de pereira a temperaturas de 0 °C logo antes ou depois da inoculação com *P. syringae* pv. *syringae*, em ramos destacados de pereira, não influenciou o desenvolvimento do crestamento, provavelmente porque a atividade nucleadora de gelo exibida pelos isolados de *P. syringae* pv. *syringae* usados no estudo pode ocorrer com temperatura acima de 0 °C (Lindow *et al.*, 1978).

Em gemas necrosadas de damasqueiro (*Prunus armeniaca* L.), planta da família Rosaceae (Molnar *apud* Marodin, 1998, p. 153), foram encontrados os fungos *Cytospora cincta* Sacc., (1884), *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey (1945), *Cladosporium carpophilum* Thiim e *Verticillium* sp. Em decorrência da semelhança da sintomatologia entre a morte de flores e abortamento de gemas florais, a descrição destes fungos em gemas de damasqueiro, espécie da mesma família de pereiras europeias, é uma evidência da possibilidade de sua associação com a morte de flores de pereiras.

2.3 Fase epifítica de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Para bactérias que têm uma fase de seu ciclo de vida como epífitas a patogênese ocorre dentro de um contexto de comunidades microbianas que interagem entre si e com o hospedeiro (Beattie & Lindow, 1995 ; Hirano & Uppel, 1990). Segundo Kennelly *et al* (2007), populações de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* podem se desenvolver em flores assintomáticas de pereiras, sendo que os sintomas de crestamento em flores aparecem quando ocorrem condições de período frio e úmido. *Pseudomonas* fluorescentes compreendem o principal grupo de bactérias detectadas flores de pereiras em dois anos de estudos em Corvallis, E.U.A. (Stockwell *et al.*, 1999). *P. syringae*, descrita anteriormente como um componente dominante na microflora natural de peras por Montesinos & Vilardell (1991), foi encontrada também por Stockwell *et al.* (1999) abundantemente na superfície de flores em Corvallis e menos freqüentemente em Medford e Cashmere, E.U.A. Portanto, a presença de *P. syringae* pv. *syringae* em

flores de pereiras não basta para configurar esta bactéria como agente causal do crestamento de flores de pereiras.

2.4 Crestamento bacteriano *versus* fogo bacteriano

Apesar de que tenha um quadro sintomatológico bastante distinto, principalmente quanto à agressividade da doença, o fogo bacteriano, causado por *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al. 1920 emend. Hauben et al. 1998, em sintomas iniciais pode ser confundido com os de crestamento bacteriano em pereiras europeias (Aldwinckle & Beer, 1979; Panagopoulos & Crosse, 1964, Qiu *et al.*, 2008): necrose do receptáculo floral e crestamento de flores e ramos. A distinção dos sintomas entre as duas doenças se dá pela fendas na casca e o sintoma de ‘cajado de pastor’ presentes no caso do fogo bacteriano (Doidge, 1917). ‘Cajado de pastor’ consiste no crestamento do ápice dos de ramos com encurvamento parecendo um cajado.

No Brasil, *E. amylovora* é considerada praga ausente no país (Ministério da Agricultura, 2008) e portanto merece especial atenção ante a possibilidade de ser diagnosticada ou ser confundida, gerando falsos negativos.

A bactéria *Pantoea agglomerans* (Ewing & Fife 1972) Gavini *et al.* 1989 produz pantocina A e pantocina B, antibióticos baseados em peptídeos de baixo peso molecular e que são inibidores de *E. amylovora* (Wright *et al.*, 2001). A *P. agglomerans* possui hábito epifítico e é abundantemente encontrado em pereiras europeias (Sabaratnam & Beattie, 2003), podendo

contribuir com a justificativa da ausência de *E. amylovora* em pereiras no Brasil.

2.5 Identificação de bactérias

A identificação de bactéria é realizada através estratégias polifásicas, isto é, mais de um tipo de método é exigido para identificação da bactéria com boa acurácia (Clarridge, 2004).

O método histórico para realizar a identificação de bactérias é dependente da comparação de uma rigorosa descrição morfológica e fenotípica do isolado a ser identificado com a descrição morfológica e fenotípica de estirpes de referência (Clarridge, 2004). As referências para bactérias fitopatogênicas são encontradas em manuais como o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ou *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Além disso, podem-se compilar os resultados de estirpes caracterizadas com as tabelas de características de cada espécie de bactéria depositada na American Type Culture Collection (ATCC).

Além da identificação fenotípica, que inclui testes bioquímicos e fisiológicos, a identificação molecular, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento, é utilizada como uma das vias para identificação polifásica de bactérias.

A PCR com oligonucleotídeos específicos permite segurança na identificação e também da detecção de fitopatógenos, obtendo-se melhor entendimento de um patossistema e, conseqüentemente, a obtenção de

uma maior eficiência no controle de doenças economicamente importantes (Moura *et al.*, 2005; Santana *et al.*, 2006).

Uma extração de DNA eficiente pode aumentar o desempenho das técnicas moleculares de identificação de fitobactérias. Dentro deste contexto, vários métodos de extração do DNA vem sendo publicados, incluindo os protocolos de extração com fenol e fenol clorofórmio (Roe *et al.*, 1996; Wolf, 2007), aplicação de kits comerciais, liberação do DNA por NaOH (Wang *et al.*, 1993) e lise celular por aquecimento (Thomson & Henry, 1995). A maioria destes métodos se baseia na centrifugação para a separação dos restos celulares do DNA, implicando maior tempo e vários equipamentos de laboratório (Drescher & Graner, 2002).

Um método alternativo para coleta de DNA e estocagem de material biológico foi originalmente desenvolvido para amostras de sangue em diagnóstico neonatal (Guthrie & Susi, 1963). Este método consiste em transferir uma pequena gota de sangue em um cartão que posteriormente é tratado com reagentes químicos que induzem a lise celular, além de inibir o crescimento de microrganismos e proteger os ácidos nucléicos da degradação (Drescher & Graner, 2002). Existe uma ampla gama deste tipo de cartão disponível, incluindo *IsoCode Card* (distribuído por Schleicher and Schuell Diagnostik, Alemanha), *Generation Capture System* (Biozym Diagnostik GmbH, Heissisch-Oldendorf, Alemanha) e *FTA-cards* (*Flinders Technology Associates*) (Whatman, Kent, UK). Para a realização da PCR, um pequeno disco contendo a amostra a ser analisada é cortado e os inibidores são removidos através de uma série de lavagens com reagentes. O disco com o DNA-alvo retido é posto diretamente na mix de reação.

Na década de 1980, um novo padrão para a identificação de bactérias começou a ser desenvolvido. Foi demonstrado que as relações filogenéticas de bactérias, e na verdade todas as formas de vida, podem ser determinadas comparando uma região estável do código genético (Woese, 1987). Esta área da genética em bactérias inclui o uso dos genes que codificam para 5S, 16S (também chamado de subunidade menor) 23S rRNA e os espaços entre estes genes. A região do genoma mais comumente utilizada para fins taxonômicos de bactérias é o gene rRNA 16S (Kolbert & Persing, 1999; Palys *et al.*, 1997; Bottger, 1989).

A utilização do gene rRNA 16S para sequenciamento e comparação com sequências já conhecidas permite a diferenciação entre organismos a nível de gênero em todos os principais filos de bactérias, além de classificar estirpes em múltiplos níveis, incluindo espécie e subespécie (Clarridge, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento de possíveis agentes etiológicos

Nos meses de setembro e outubro de 2007, plantas de pereiras europeias das cvs. 'Carrick', 'Packham's Triumph' e 'Abate Fetel' pertencentes ao Pomar Mussatto e à coleção de variedades da Estação Experimental de Fruticultura Temperada - Embrapa Uva e Vinho, localizados em Vacaria, RS, foram vistoriados para coleta de flores com lesões necróticas na região do ovário. A partir das flores sintomáticas obtidas procedeu-se o isolamento de fungos e bactérias.

Para isolamento de fungos, as flores foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% e Tween 0,001%, seguidos de três enxágües em água destilada e esterilizada (ADE). Destacaram-se as pétalas do restante da flor e estas foram separadamente depositadas sobre meio de cultura BDA (batata, 300; dextrose, 10; ágar, 18 g.L⁻¹, água destilada para completar o volume) contido em placas de Petri. As placas foram incubadas por cinco dias em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25 °C. A partir de cada crescimento micelial com características visuais distintas, transferiram-se segmentos de micélio para outra placa contendo meio de cultura BDA e posteriormente realizou-se a purificação dos isolados através da transferência de ponta de hifa para nova placa. Os isolados de fungos foram descritos quanto às características de crescimento micelial e

agrupados em relação à parte da flor da qual foram obtidos, cultivar e local de coleta. A preservação dos isolados foi realizada através de discos de meio de cultura com crescimento micelial imersos em ADE e mantidos sob temperatura de 4 °C.

Para obtenção de isolados bacterianos, uma pequena porção de tecido, na interface entre o tecido assintomático e a lesão, foi retirada da flor e depositada sobre uma gota de ADE sobre uma lâmina de vidro flambada. O tecido foi triturado com auxílio de um bisturi e, após 5 min, uma alça de platina foi encostada na água e riscada sobre meio KB (peptona, 20; K₂HPO₄, 1,5; MgSO₄.7H₂O, 1,5; Agar, 15g.L⁻¹; glicerol, 15 mL.L⁻¹; água destilada para completar o volume) (Schaad *et al.*, 2001) em placas de Petri. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 h. Colônias isoladas e fluorescentes sob luz ultravioleta (366 nm) foram repicadas para nova placa. Suspensões de células dos isolados bacterianos foram preservadas em glicerol 40% à -20 °C e em ADE à 4 °C.

Na primavera de 2008, os pomares Caieron, Golin e Boff, em Vacaria, foram vistoriados e flores sintomáticas de pereira 'Packham's Triumph' foram coletadas. Apenas o isolamento de bactérias fluorescentes foi feito a partir destas flores, de acordo com o método descrito acima.

3.2 Teste de patogenicidade

Somente os isolados obtidos em 2007 foram testados quanto à patogenicidade. Os isolados bacterianos e de fungos foram testados em flores de ramos destacados de pereiras 'Packham's Triumph' colocados em copos plásticos contendo areia umedecida. Os ramos foram previamente

incubados em câmara de crescimento com 90% de umidade relativa durante 6 h.

Suspensões de células bacterianas de cada isolado, padronizadas visualmente segundo o grau cinco da escala de McFarland, foram aspergidas sobre ramalhetes florais. Para cada isolado, foram aspergidos dois ramos com cinco flores. Para inoculação das flores com os isolados de fungos, discos de micélio foram depositadas sobre o receptáculo floral (Melo Neto & Almeida, 2008). Utilizaram-se dois ramos com cinco flores para cada isolado fúngico. Dois ramos florais aspergidos com suspensão de células de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (IBSBF 281) (Pss 281), cedida pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (2008), constituíram o controle positivo. O controle negativo foi obtido através da aspersão de dois ramos florais com ADE.

Após as inoculações, a nebulização na câmara de crescimento foi suspendida por 4 h para não haver perda de inóculo através de escorrimento. Os ramos florais foram mantidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h, temperatura de 16 ± 1 °C e 90% de umidade relativa por 72 h, quando se realizou a avaliação.

Flores com algum sintoma de necrose ou escurecimento de tecido na região do ovário ou receptáculo floral foram retiradas dos ramos e procedeu-se o isolamento de acordo com o micro-organismo inoculado e conforme método anteriormente descrito. As culturas reisoladas foram comparadas com o isolado inoculado quanto ao formato da colônia, fluorescência, testes de gram, oxidase e catalase.

Os isolados que, além de estarem associados ao sintoma na flor inoculada, puderam ser reisolados, apresentando características idênticas aos originais, foram considerados patogênicos.

3.3 Caracterização dos isolados

A caracterização por meio de testes bioquímicos, fisiológicos e moleculares foi realizada para os isolados patogênicos obtidos na primavera de 2007. Todos isolados bacterianos obtidos na primavera de 2008 foram caracterizados através de PCR como será descrito a seguir.

3.3.1 Testes bioquímicos e fisiológicos

As culturas puras, com 24-48 h de crescimento foram caracterizadas através do LOPAT segundo método descrito por Schaad *et al.* (2001), que inclui produção de levan em meio com sacarose, reação da oxidase, atividade pectolítica em batata, atividade da arginina dehidrolase e reação de hipersensibilidade em fumo.

Para produção de levan, as culturas foram riscadas em meio Nutriente Ágar (extrato de carne, 1; peptona, 5; extrato de levedura, 2; cloreto de sódio, 5; ágar, 15 g L⁻¹; água destilada até completar o volume; pH = 6,8) acrescido de 5% de sacarose (peso/volume). Colônias brancas, mucóides e convexas após cinco dias de incubação indicam reação positiva. Para controle positivo utilizou-se Pss281 e *Pectobacterium brasiliensis* Duarte *et al.* estirpe 212 constituiu o controle negativo.

Verificou-se a presença da enzima citocromo oxidase através de fitas de oxidase (Labor Clin). Os controles negativo e positivo foram os mesmos utilizados na reação de produção de levan.

A atividade pectolítica em batata foi testada em fatias de batata que foram previamente lavadas, desinfestadas (álcool 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 1% por 1 min, três enxágües em ADE) e descascadas. As fatias de batata foram depositadas sobre papel toalha umedecido dentro de uma caixa plástica (gerbox). Para cada isolado, um palito de madeira esterilizado foi encostado na cultura e cravado em uma fatia de batata. A caixa foi, então, coberta e incubada a 22 °C por 24 h. Realizaram-se três repetições. A maceração do tecido da batata a partir do ponto em que o palito foi cravado indicou resposta positiva. *P. brasiliensis* 212 e Pss281 constituíram os controles positivo e negativo, respectivamente.

Para o teste da atividade da arginina dehidrolase, culturas com 24 h foram transferidas para 15 mL de meio de cultura semi-sólido Thornley 2A (peptona, 1; NaCl, 5; K₂HPO₄, 0,3; Arginina HCl, 10; Agar, 3 g L⁻¹; vermelho de fenol, 1 mg L⁻¹; água destilada para completar o volume; pH 7,2) contido em tubos de ensaio, cobertas com 1 mL de óleo mineral esterilizado e incubadas a 28 °C. A cor vermelha em até quatro dias indica reação positiva. Pss281 foi utilizada como controle negativo.

Suspensões de células bacterianas (10⁸ UFC.mL⁻¹) foram injetadas no espaço intercelular de folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) através de uma seringa. O colapso do tecido na região em que foi injetada a suspensão de células bacterianas após 24 h é considerado como reação de

hipersensibilidade positiva. Pss281 foi utilizada como controle positivo e ADE como controle negativo.

Além do LOPAT, os isolados foram caracterizados quanto à composição da parede celular (teste de Gram pelo método KOH 3%), presença da enzima catalase, capacidade de nucleação de gelo e utilização de 95 fontes de carbono através do sistema BIOLOG (MicroLog™ System, 4.0).

Para avaliar a capacidade de nucleação de gelo dos isolados patogênicos, misturou-se gelo triturado e álcool em uma caixa de isopor para obter a temperatura de -5 a -10 °C. Gotas de 10µL de suspensão de células bacterianas (10^8 UFC.mL⁻¹) foram depositadas sobre a superfície de barcos de papel alumínio com uma fina camada de parafina, sendo que as que continham bactérias com capacidade de nucleação de gelo congelaram a -10 °C em 30 s. Pss281 e ADE constituíram os controles positivos e negativos, respectivamente.

A caracterização dos isolados patogênicos quanto à utilização de 95 fontes de carbono foi realizada dispensando-se 150 µL de suspensão de células bacterianas ($DO_{620} = 0,3$) em cada poço da placa do sistema BIOLOG. O resultado foi determinado pela leitura da reação 16-24 h após incubação a 28 °C e pelo processamento dos dados em um *software* específico do sistema BIOLOG. Valores de similaridade acima de 0,5 indicaram resultados positivos para identificação de cada isolado. Pss281 foi utilizada como controle positivo.

3.3.2 PCR qualitativa

A extração do DNA dos isolados patogênicos e de Pss281 foi realizada através de lise alcalina, utilizando o protocolo adaptado por Duarte *et al.* (2004).

Células bacterianas cultivadas em caldo LB (peptona, 10 g; NaCl, 5 g; extrato de levedura, 5 g; água destilada, 1 L), sob agitação, durante 24-48 h a 28 °C, foram suspensas em 250 µL de tampão de extração de DNA (100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA; 1% SDS e 50 µg.mL⁻¹ de proteinase K) e incubadas por 3 h a 56 °C. As amostras foram acrescidas de 250 µL de acetato de amônio 7,5 M e centrifugadas (12.500 rpm, 15 min, 4 °C). O sobrenadante aquoso, contendo o DNA, foi coletado e precipitado com isopropanol (v/v). As amostras foram incubadas a -20 °C por uma noite, centrifugadas (12.500 rpm, 25 min, 4 °C) e lavadas com etanol 70% (v/v). Posteriormente, as amostras foram secas, suspensas em 50 µL de água Mili-Q e 5 µL de RNase e armazenadas a -20 °C até o uso.

O DNA dos isolados bacterianos obtidos na primavera de 2008 foi extraído pelo método de fervura, que consiste em aquecer a 96°C por 10 min a suspensão de células bacterianas (DO₆₂₀= 0,1).

Os oligonucleotídeos iniciadores (oligos) A1 e B6 (Manceau & Horvais, 1997), universais para várias espécies de *Pseudomonas* e patovares de *P. syringae*, gerando um fragmento de amplificação de 1050 pb, foram utilizados para em PCR qualitativa para todos isolados. Além disso, foram utilizados os oligos B1 e B2 (Sorensen *et al.*,1998), projetados para amplificar genes de síntese de lipodepsinonopeptídeos, específicos para *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *atofaciens* e *P. syringae* pv.

aptata, gerando um fragmento de 752 pb. A PCR foi realizada em termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.), onde diferentes temperaturas de pareamento e concentrações de reagentes foram testadas para a padronização das reações, tomando como base a temperatura de fusão (TM) dos oligos usados. Após o ajuste da reação, para ambos pares de oligos, a PCR foi executada com um volume final 20 μ L, composta por 0,5 μ M de oligos; 1 x tampão de reação (20 mM Tris pH 8,4; 50 mM KCl); 3,0 μ M $MgCl_2$; 0,2 μ M dNTP (Invitrogen); 0,25 U/R Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2 μ L de DNA.

As seguintes condições de PCR foram utilizadas para os oligos A1 e B6: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 15 s, 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72 °C durante 5 min. Para os oligos B1 e B2 as condições utilizadas foram desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 62 °C por 15 s, 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72 °C por 5 min. Em todas as reações foi utilizada água Mili-Q como controle negativo e DNA de Pss281 como controle positivo.

Os produtos das reações com os dois pares de oligos foram visualizados em gel de agarose (Invitrogen) 0,8% (m/v), corado com brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e submetido à eletroforese com corrente elétrica de 50 V durante 2 h e 30 min. O marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) foi usado como referência. Após eletroforese os géis foram expostos a luz ultravioleta e documentados através de câmera fotográfica (Sony Cyber-Shot).

3.3.3 Sequenciamento e análise *in silico* dos produtos amplificados

A amplificação da região ITS dos isolados patogênicos para sequenciamento foi realizada com PCR baseada em oligos universais projetados a partir do gene rRNA 16S (Edward *et al.*, 1989, Li *et al.*, 2006, Qiu *et al.*, 2008): P1 (5'- AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG – 3') e P2 (5'- ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT – 3'). A reação de PCR foi executada com um volume final de 20 μ L, composta por 1 μ M de oligos; 1 x tampão de reação (20 mM Tris pH 8,4; 50 mM KCl); 3,0 μ M MgCl₂; 0,2 μ M dNTP (Invitrogen); 1 U/R Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2 μ L de DNA. As condições utilizadas na reação de amplificação realizada em termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.) consistiram de desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 25 s, 65 °C por 25 s, 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72 °C durante 5 min. Foi utilizada água Mili-Q como controle negativo e DNA de Pss281 como controle positivo. Os produtos da PCR foram visualizados através de eletroforese (50V por 2h e 30 min) em gel de agarose 0,8% (Invitrogen), corado com brometo de etídeo (0,5 μ g.mL⁻¹), gerando bandas de 1550 pb.

O sequenciamento dos produtos de amplificação foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30-45 ng) foram marcados utilizando 3,2 pmol dos oligos P1 e P2 e 2 μ L do reagente *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 μ L. As reações de marcação

foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 55 °C por 5 s e 60 °C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set "Z"*; *Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"*; *BioLIMS Project "3100_Project1"*; *Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"*; e *Analysis Module 1 "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz"*.

As sequências das amostras foram editadas e comparadas às depositadas no GenBank através da plataforma BLAST (GenBank, 2009).

3.4 Efeitos da temperatura, estágio fenológico e isolado na intensidade da doença

3.4.1 Instalação do ensaio

Ramos florais nos estádios fenológicos de balãozinho e plena floração (segundo escala fenológica apresentada em El peral *apud* Marodin, 1998) foram destacados de pereiras 'Packham's Triumph' localizadas em um pomar isolado na Estação Experimental de Fruticultura Temperada da Embrapa Uva e Vinho em Vacaria, RS. Os ramos foram cortados com aproximadamente 15 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro, deixou-se um ramallete floral por ramo e os ramos foram colocados dentro de tubos de

ensaio contendo 15 mL de ADE. Os ramos foram previamente incubados em câmara de crescimento com 90% de umidade relativa durante 6 h.

A partir dos isolados patogênicos e de Pss281 obteve-se isolados resistentes a 200 ppm de rifampicina, riscando-se as culturas em meio KB com gradiente de concentração do antibiótico. Selecionaram-se colônias resistentes e repicou-se dez vezes alternando-se entre meio KB com presença e ausência de 200 ppm de rifampicina.

As flores foram inoculadas através de aspersão de suspensões de células bacterianas dos isolados resistentes, padronizadas segundo o grau cinco da escala de McFarland. Flores aspergidas com ADE constituíram a testemunha. Após a inoculação das flores, os ramos foram colocados dentro de sacos plásticos transparentes contendo papel toalha umedecido e submetidos às temperaturas de 5, 10, 15 e 20 °C, com fotoperíodo de 12 h em incubadoras B.O.D. (Marconi MA 402). Realizaram-se três repetições para cada combinação de estágio fenológico, isolado e temperatura.

O delineamento do experimento foi em parcelas sub-subdivididas, tendo como parcela principal a temperatura, como subparcela o isolado e como sub-subparcela o estágio fenológico, sendo cada fator dentro das parcelas arranjado ao acaso.

A análise estatística de referência foi realizada através da rotina '*Linear Models*' do programa SASTM 8.2. As diferenciações de médias foram feitas pelo teste DMS ($p < 0,05$).

3.4.2 Construção de escala descritiva

A partir do ensaio descrito acima, flores com diversos graus de necrose e que eram representativas do quadro sintomatológico descrito na literatura foram selecionadas e fotografadas.

Agruparam-se as fotos em cinco categorias e uma foto para cada categoria foi escolhida para representar visualmente a classe na escala. A partir da foto, elaborou-se uma descrição do sintoma e de como progrediu a partir da classe anterior.

Essa escala foi usada para guiar a avaliação da intensidade da morte de flores de pereiras europeias.

3.4.3 Avaliação do ensaio

Após 72 h de incubação iniciou-se a avaliação da incidência de flores sintomáticas e intensidade da doença segundo a escala descritiva proposta. As avaliações foram feitas a cada 12 h até o momento em que as flores caíram: 144h após inoculação.

As flores sintomáticas foram marcadas e numeradas a fim de se manter a rastreabilidade e observar-se a evolução da intensidade da doença segundo a escala. Duas flores sintomáticas para cada combinação de estágio fenológico, isolado e temperatura foram utilizadas para isolamento em meio KB com 200 ppm de rifampicina a fim de se confirmar que as lesões estavam associadas aos isolados resistentes inoculados.

Calculou-se o índice de doença ou índice de McKinney segundo a

equação
$$ID = \frac{(\sum[\text{nota na escala} \times \text{frequência}] \times 100)}{\text{total de unidades} \times \text{nota máxima da escala}}$$
 (McKinney,

1923; Czermainski, 1999). Construíram-se curvas de progresso de doença, plotando-se valores do índice de doença no tempo.

3.5 Detecção e flutuação populacional de patógenos em gemas de pereiras 'Packham's Triumph'

Para se conhecer o comportamento do inóculo ao longo do ano, monitorou-se a presença de bactérias em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' ao longo do ano de 2008.

3.5.1 Padronização do método de extração de DNA e detecção

Antes de iniciar-se a coleta das amostras, padronizou-se um método de extração de DNA e detecção por PCR.

Cinco gemas de pereiras europeias foram maceradas dentro de microtubos contendo 500 μL de suspensão em PBS (NaCl, 8; KCl, 0,2; Na_2HPO_4 , 1,44; KH_2PO_4 , 0,24 g L^{-1} ; água destilada para completar o volume) de células bacterianas (10^8 UFC.mL^{-1}) de um isolado obtido em pomar de Vacaria (Pack9) e Pss281. Os macerados foram submetidos aos seguintes protocolos de extração de DNA: (1) fervura a 96 °C por 10 min; (2) Lise de Edwards; (3) FTA[®] Plant Card Whatman (FTA); (4) FTA com pré-lavagem em álcool 70%; (5) FTA e adição de 2% de Polivinilpirrolidona (PVP); (6) FTA com pré-lavagem em álcool 70% e adição de 2% de PVP; (7) Lise de Edwards, FTA com pré-lavagem em álcool 70% e adição de 2% de PVP.

Os diferentes métodos também foram usados para extração do DNA dos isolados a partir de cultura pura e, além do método de extração, testou-

se a forma de maceração das gemas: palito de madeira e micropistilo descartável.

Para extração por cartões FTA transferiram-se 100µL do macerado para superfície do cartão e deixou-se secando em temperatura ambiente por no mínimo 3h. Após, discos de 3 mm de diâmetro foram retirados dos cartões utilizando um cortador (*Harris*) e transferidos para microtubos de 200 µL. Entre as diferentes amostras, o cortador foi desinfestado com álcool 70%. Os discos de papel foram lavados duas vezes, durante 5 min, com 200 µL do reagente FTA (*FTA Purification Reagent*), seguido por duas lavagens com 200 µL de tampão TE⁻¹ (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM, EDTA, pH 8,0) por 5 min. Posteriormente, as amostras foram secas durante 20 min a 56 °C, antes de proceder a eluição. O DNA retido no cartão FTA foi eluído adicionando-se 35 µL de solução alcalina (0,1 N NaOH; 0,3 M EDTA, pH 13,0) aos discos previamente lavados como descrito anteriormente. A solução alcalina foi mantida em contato com o disco do cartão a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, foram adicionados 65 µL de tampão Tris saturado com Cl (0,1 M, pH 7,0), o material foi agitado em vortex durante 5 s, deixado a temperatura ambiente por 10 min e agitado em vortex por 10 s. Os discos de 3 mm foram pressionados nos seus respectivos tubos e descartados. Para a realização da PCR 10 µL da eluição foram adicionados à reação.

O método que inclui a etapa de pré-lavagem em álcool 70% do cartão FTA seguiu o mesmo protocolo, entretanto antes da lavagem com reagente FTA, lavaram-se os discos de papel duas vezes, durante 5 min, com 200 µL de álcool 70%. Quando exigida pelo método, a adição de PVP 2% (m/v) foi realizada no momento de preparação da suspensão de células bacterianas.

O método de extração de DNA através da lise de Edwards diferencia-se por substituir 400 µL de PBS por tampão de Edwards (200 mM Tris HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) no momento da preparação da suspensão de células bacterianas (Edwards *et al*, 1991; Kerkoud *et al*, 2002).

O DNA extraído sob os diferentes protocolos foi submetido à PCR com oligos A1 e B6 de acordo com as condições já descritas e acrescentando-se 2% de PVP na reação. Água Mili-Q foi utilizada como controle negativo. No método de extração de DNA por fervura, 2 µL da suspensão fervida foram usados na PCR.

3.5.2 Projeção de oligonucleotídeos iniciadores

Sequências relacionadas a características específicas de *P. syringae* pv. *syringae*, *Erwinia amylovora* e *Pantoea agglomerans* foram rastreadas a partir do banco de genes ENTREZ do National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2008). As sequências foram editadas para o modo FASTA e submetidas à Plataforma BLAST (GenBank, 2008) para análise de similaridade das sequências com outras sequências genômicas depositas no GenBank. Posteriormente, as sequências foram utilizadas como molde para a projeção dos oligos específicos através do programa Primer 3 (2008). Os oligos também foram submetidos à plataforma BLAST (GenBank, 2008) para verificar a especificidade *in silico*. A síntese dos oligos foi realizada pela *Integrated DNA Technologies* (IDT, 2008).

3.5.3 Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligos projetados (SyrB1 e SyrB2 para *P. syringae* pv. *syringae*, DspE1 e DspE2 para *E. amylovora* e PaaA1 e PaaA2 para *P. agglomerans*) e os oligos A1/B6 e B1/B2 foram testados separadamente quanto à especificidade através de PCR com DNA de Pss281, *E. amylovora* (IBSBF 551) (Ea551), *P. agglomerans* (IBSBF 1331) (Pa1331) e os isolados patogênicos obtidos em pomares de Vacaria, RS. A cultura de *P. agglomerans* (originária de *Pyrus communis* L.) e DNA de *E. amylovora* foram cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (2008). O DNA de Pa1331 foi obtido por fervura.

As PCRs foram realizadas em termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.) e, a partir das TMs dos oligos, diferentes temperaturas de pareamento e concentrações de reagentes foram testadas para a padronização das reações. Após ajuste, as reações foram executadas em um volume final de 20 µL com concentrações de reagentes e condições de reação segundo a Tabela 1. As condições de desnaturação inicial (94 °C por 5 min) e extensão final (72 °C durante 5 min) foram iguais para todas as reações. Água Mili-Q foi utilizada como controle negativo. A visualização dos produtos através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) foi realizada conforme método já descrito, sendo que as diferenças são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1. Concentração de reagentes, condições de PCR e características de eletroforese utilizada para cada par de oligonucleotídeo iniciador. Porto Alegre, RS, 2009.

	A1/B6	B1/B2	SyrB1/ SyrB2	DspE1/ DspE2	PaaA/ PaaA2
[Oligos]	0,5 µM	0,5 µM	0,4 µM	0,25 µM	0,25 µM
[Tampão de reação]	1 x	1 x	1 x	1 x	1 x
[dNTP]	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM
[MgCl₂]	3,0 µM	3,0 µM	3,5 µM	3,0 µM	3,0 µM
[Taq DNA polimerase]	0,25 U/R	0,25 U/R	0,25 U/R	0,25 U/R	0,25 U/R
Condição da reação	(94 °C/30", 55 °C/15", 72 °C/1') 30x	(94 °C/30", 62 °C/15", 72 °C/1') 30x	(94 °C/15", 53 °C/10", 72 °C/15") 35x	(94 °C/30", 53 °C/40", 72 °C/30") 35x	(94 °C/15", 55 °C/10", 72 °C/15") 30x
Eletroforese	Gel 0,8% 50 V 2h 30min	Gel 0,8% 50 V 2h 30min	Gel 2% 60 V 2h 30min	Gel 2% 60 V 2h 30min	Gel 2% 60 V 2h 30min

3.5.4 Sensibilidade do método

Para conhecer-se o nível de detecção do método que inclui extração de DNA com FTA, PVP 2% e pré-lavagem em álcool, culturas com 24-48 h de Pss281 e Pa1331 foram suspensas em PBS + PVP 2% e a concentração de células padronizada por espectrofotometria para $DO_{620} = 0,1$. Diluições sucessivas em PBS + PVP 2% foram obtidas até 10^{-10} . Para contagem das células, 10 µL de cada diluição de Pss281 foram transferidos para placas contendo meio KB. Para Pa1331, procedeu-se de maneira semelhante, porém utilizou-se meio SAM (peptona, 5; extrato de levedura, 5; amido solúvel, 3; Agar, 15g L⁻¹; água destilada para completar o volume) (Costa *et al.*, 2000).

De cada diluição, 500 µL foram acrescentados a cinco gemas acondicionadas em tubos de 1,5 mL e maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de micropistilos descartáveis. Agitaram-se os tubos em vortex por 10

s e deixou-se em temperatura ambiente por 10 min, 100 µL foram, então, transferidos para cartões FTA. O DNA contido nos cartões FTA foi eluído após lavagem, conforme descrito no item 3.5.1. O DNA de cada diluição de Pss281 foi utilizado em PCR com os oligos A1/B6 e SyrB1/SyrB2 e o DNA de cada diluição de Pa1331 utilizado em PCR com os oligos PaaA1/PaaA2, a fim de se verificar o nível de detecção de *P. syringae* pv. *syringae* e *P. agglomerans*, respectivamente. As condições das reações seguiram as descritas na Tabela 1, de acordo com o par de oligo correspondente. DNA genômico de Pss281 e Pa1331 foram usados como controle positivo e água Mili-Q como controle negativo. Adicionalmente, 100 µL de cada macerado foram transferidos para superfície de meio de cultura KB e SAM em placas de Petri. Gemas maceradas em PBS + PVP 2% foram plaqueadas nos dois meios de cultura para constituir o controle negativo.

Para testar sensibilidade do método na detecção de *E. amylovora* procedeu-se de forma distinta, pois por se tratar de praga ausente no país o uso de cultura exige certos procedimentos, portanto, optou-se por utilizar DNA. O DNA de Ea551 em quantidade suficiente para obter concentrações de 4,68; 9,37; 18,75; 37,5; 75 e 150 ng.µL⁻¹ foi adicionado a 500 µL de PBS + PVP 2%. Transferiram-se 500 µL de cada diluição de DNA para tubo de 1,5 mL contendo cinco gemas maceradas. Agitou-se por 10 s e após 10 min transferiram-se 100 µL para cartões FTA. O DNA contido nos cartões FTA foi eluído e utilizado em PCR com os oligos DspE1/DspE2. Foi utilizada água Mili-Q como controle negativo.

3.5.5 Coleta e processamento das amostras

Cinco gemas foram coletadas de 50 pereiras 'Packham's Triumph' localizadas no Pomar Mussatto, em Vacaria, RS, a cada dois meses durante o ano de 2008. As coletas iniciaram em fevereiro e foram realizadas em datas próximas a metade do mês. As gemas foram acondicionadas em tubos de 1,5 mL.

Para o processamento, os tubos contendo as gemas foram mergulhados em nitrogênio líquido e as gemas maceradas com micropistilos descartáveis. Adicionaram-se 500 µL de PBS contendo 2% de PVP e deixou-se 10 min em temperatura ambiente. Após, 100 µL do macerado foram transferidos para o cartão FTA, que foi deixado secar *overnight*. Os cartões foram armazenados dentro de sacos plásticos a temperatura ambiente. Discos de 3 mm do cartão FTA foram lavados, o DNA eluído e armazenado a -20 °C.

3.5.6 Detecção e flutuação populacional

Dez microlitros do DNA eluído de cada amostra foram utilizados em PCR para detecção de *Pseudomonas* spp., *P. syringae* pv. *syringae*, *E. amylovora* e *P. agglomerans* com os oligos A1/B6, SyrB1/SyrB2, DspE1/DspE2 e PaaA1/PaaA2, respectivamente. As reações seguiram as condições descritas na Tabela 1 de acordo com o par de oligo utilizado. DNA genômico de Pss281 (2µL) foi utilizado como controle positivo nas reações com os oligos A1/B6 e SyrB1/SyrB2. O controle positivo nas reações com os oligos DspE1/DspE2 e PaaA1/PaaA2 foram 15 ng de DNA de EA551 e 2 µL de DNA de Pa1331 obtido por fervura, respectivamente. Água Mili-Q foi

utilizada como controle negativo. Os produtos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose em condições conforme a Tabela 1.

A frequência de detecção de cada bactéria ao longo do ano de 2008 foi organizada em figuras. Gráficos que reúnem informações de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação no período de coleta foram plotados para observação da relação destas condições meteorológicas com a frequência de patógenos. Os dados meteorológicos foram organizados a partir do Relatório de Dados Climáticos Observados Diários da estação meteorológica EMBRAPA-EE (5179).

3.6 Incidência da doença a campo

Na primavera de 2008, as 50 plantas de 'Packham's Triumph' que tiveram as gemas coletadas ao longo do ano localizadas no Pomar Mussatto, Vacaria, RS foram avaliadas quanto à incidência de flores com necrose. Em cada planta, no estágio de ramallete floral exposto solto, foram marcados ramos dispostos nos dois lados da fileira, distribuídos uniformemente ao longo da copa e que totalizaram 50 flores. No estágio de plena floração, a proporção de flores sintomáticas nos ramos marcados foi anotada para cada planta.

3.7 Ocorrência da doença em pomares de Vacaria, RS

Além do pomar Mussatto, três pomares de pereiras europeias localizados em Vacaria, RS, foram visitados na primavera de 2008: Boff, Caieron e Golin. No estágio fenológico de plena floração, 450 plantas de 'Packham's Triumph' foram vistoriadas em cada pomar para se verificar a

ocorrência da doença. O número de plantas com flores com necrose foi anotado.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento de possíveis agentes etiológicos

Na primavera de 2007, foram obtidos 28 isolados bacterianos fluorescentes e 31 isolados de fungos a partir de três flores sintomáticas de pereiras 'Abate Fetel', três flores sintomáticas de 'Carrick', 47 flores sintomáticas 'Packham's Triumph', localizadas no Pomar Mussatto, e de três flores sintomáticas de 'Abate Fetel' da coleção de variedades da Embrapa. As características dos isolados de fungos estão descritas na Tabela 2. A maior quantidade de flores de 'Packham's Triumph' com necrose se deve ao fato de que é a cultivar predominante no pomar, portanto, mais plantas foram vistoriadas no momento da coleta.

TABELA 2. Características dos isolados de fungos obtidos na primavera de 2007. Vacaria, RS, 2007.

Isolado	Pomar de origem	Cultivar de pereira	Parte da flor	Característica do micélio
F1A	Mussatto	Carrick	Receptáculo	Aéreo, branco, por toda flor
F1B				Aéreo, branco, restrito
F2A	Mussatto	Abate Fetel	Receptáculo	Aéreo, cinza, rápido crescimento
F2B				Aéreo, branco
F2C				Prostrado, cinza, lento crescimento
F2D				Marrom, centro cinza, bordas regulares
F2E				Prostrado, amarelado, lento crescimento

Continuação TABELA 2. Características dos isolados de fungos obtidos na primavera de 2007. Vacaria, RS, 2007.

Isolado	Pomar de origem	Cultivar de pereira	Parte da flor	Característica do micélio
F2F				Aéreo, branco
F2G	Mussatto	Abate Fetel	Receptáculo	Cinza, crescimento a partir do pedúnculo
F2H				Prostrado, amarelo, lento crescimento
F2I				Aéreo, branco
P2A				Rosado, denso, lento crescimento
P2B	Mussatto	Abate Fetel	Pétalas	Aéreo, branco, rápido crescimento
P2C				Prostrado, rosado
P2D				Aéreo, branco
R1				Prostrado, avermelhado
R2				Prostrado, cinza escuro
R3				Prostrado, branco
R4	Mussatto	Packham's Triumph	Receptáculo	Prostrado, verde
R5				Prostrado, rosado
R6				Prostrado, marrom
R8				Aéreo, branco
P3				Mussatto
P1A				Cinza, aéreo
P1B				Prostrado, denso, branco
P1C				Aéreo, branco, felpudo
P1D	Embrapa	Packham's Triumph	Pétalas	Prostrado, branco
P1E				Escuro, lento crescimento
P1F				Prostrado, verde, bordas regulares
P1G				Aéreo, branco
P1H				Escuro, bordas bordô, centro preto

Em 2008, obteve-se 23 isolados bacterianos fluorescentes a partir de 15 flores sintomáticas coletadas no pomar Caieron, 21 flores sintomáticas coletadas no pomar Golin e três flores sintomáticas coletadas no pomar Boff.

4.2 Teste de patogenicidade

A partir dos isolados fúngicos e bacterianos fluorescentes obtidos na primavera de 2007, apenas seis isolados bacterianos (Pack3, Pack5, Pack7, Pack9, Pack10, Abate1) induziram necrose nas flores de 'Packham's Triumph' inoculadas.

O reisolamento foi possível a partir de flores sintomáticas inoculadas com os isolados bacterianos Pack5, Pack9 e Pack10, obtidos de 'Packham's Triumph' do Pomar Mussatto. Os reisolados a partir da inoculação de Pack9 e Pack10 apresentaram características (formato de colônia, Gram, catalase e oxidase) iguais aos originais. Portanto, Pack9 e Pack10 foram considerados isolados patogênicos às flores de pereiras europeias.

Em flores inoculadas com os isolados Pack9 e Pack10 foi possível visualizar exsudação (Figura 1), evidenciando infecção bacteriana.

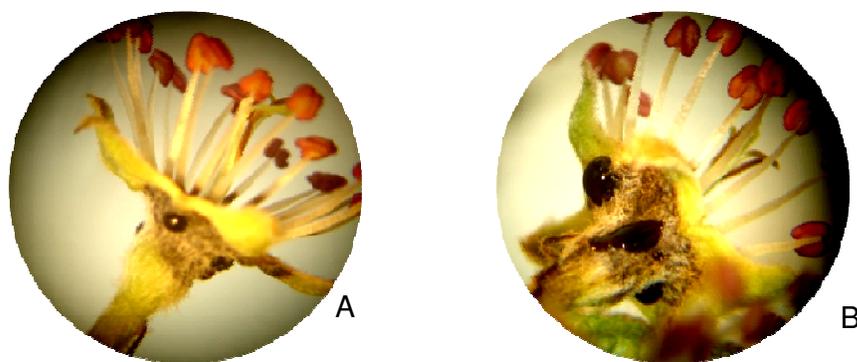


FIGURA 1. Exsudação bacteriana em flores de pereiras europeias 'Packham's Triumph' inoculadas com os isolados Pack9 (A) e Pack10 (B). Vacaria, RS, 2008.

4.3 Caracterização dos isolados

Segundo testes bioquímicos e fisiológicos, os isolados patogênicos Pack9 e Pack10 foram caracterizados como fluorescentes com pigmento verde difusível, Gram negativos, catalase positivos e sem atividade nucleadora de gelo. A caracterização dos isolados patogênicos por testes do LOPAT é apresentada na Tabela 3, assim como as características de algumas *Pseudomonas* spp. segundo Schaad *et al.* (2001).

TABELA 3. Características LOPAT dos isolados patogênicos às flores de pereiras europeias 'Packham's Triumph' e de *Pseudomonas* spp.¹ Porto Alegre, RS, 2008.

Isolado	Levan	Oxidase	Atividade pectolítica em batata	Arginina Dehidrolase	Reação de hipersensibilidade em fumo
Pack9	-	+	-	+	-
Pack10	-	+	-	+	-
Ps ²	+	-	-	-	+
Pf ³	-	+	-	+	-
Pc ⁴	-	+	-	+	-
Pfl ^{5*}	-	+	-	+	-
Pp ^{6*}	-	+	-	+	-

¹Classificação segundo Schaad *et al.* (2001); ²*Pseudomonas syringae*; ³*Pseudomonas fuscovaginae*; ⁴*Pseudomonas corrugata*; ⁵*Pseudomonas fluorescens*; ⁶*Pseudomonas putida*. Saprófitas.

O perfil LOPAT não permitiu a identificação conclusiva de Pack9 e Pack10 entre as *Pseudomonas* spp. fitopatogências, segundo Schaad *et al.* (2001), uma vez que *P. fuscovaginae* e *P. corrugata* são patógenos associados a gramíneas e tomate, respectivamente.

De acordo com o sistema BIOLOG, Pack9 e Pack10 apresentaram valores de similaridade de 0,334 e 0,405, respectivamente, com *P. fluorescens*. Os valores inferiores a 0,5 indicaram resultados negativos para identificação dos isolados patogênicos. Para Pss281 o valor de similaridade com *P. syringae* pv. *syringae* foi de 0,506.

Através de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6 houve amplificação do DNA de Pack9 e Pack10, assim como de Pss281, gerando um produto de 1050 pb e indicando que os isolados pertencem ao gênero *Pseudomonas*. A partir das reações com os oligos B1/B2 houve amplificação apenas do DNA de Pss281 com um produto de 752 pb. A ausência de amplificação do DNA dos isolados patogênicos Pack9 e Pack10 com os oligos B1/B2 indica que não podem ser identificados como *P. syringae* pv. *syringae* (Figura 2).

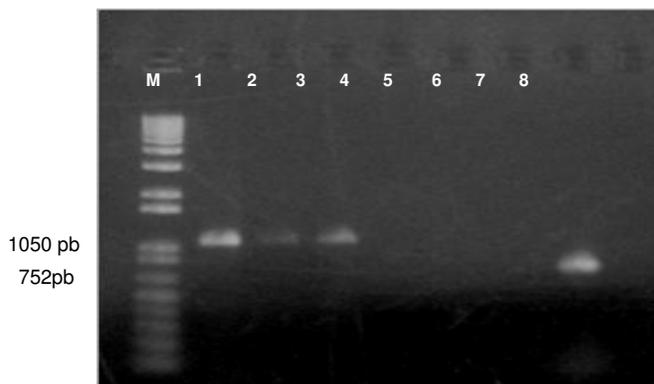


FIGURA 2. Amplificação de DNA dos isolados patogênicos por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6 (1-4) e B1/B2 (5-8): M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1 e 5) Pack9; (2 e 6) Pack10; (3 e 7) Pss281 (controle positivo); (4 e 8) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2008.

A amplificação de DNA com oligos A1/B6, gerando um produto de 1050 pb, foi possível a partir de 17 dos 23 isolados bacterianos fluorescentes obtidos na primavera de 2008, sendo 11 isolados obtidos de flores do pomar Golin, quatro do pomar Caieron e dois do pomar Boff (Figura 3 A). A amplificação do DNA destes isolados por meio dos oligos A1/B6 indica que pertencem ao gênero *Pseudomonas*. A PCR com os oligos B1/B2, que gera um produto de 752 pb para *P. syringae* pv. *syringae*, revelou a amplificação

do DNA de um isolado (Boff1) entre os 23 isolados obtidos em 2008 (Figura 3 B).

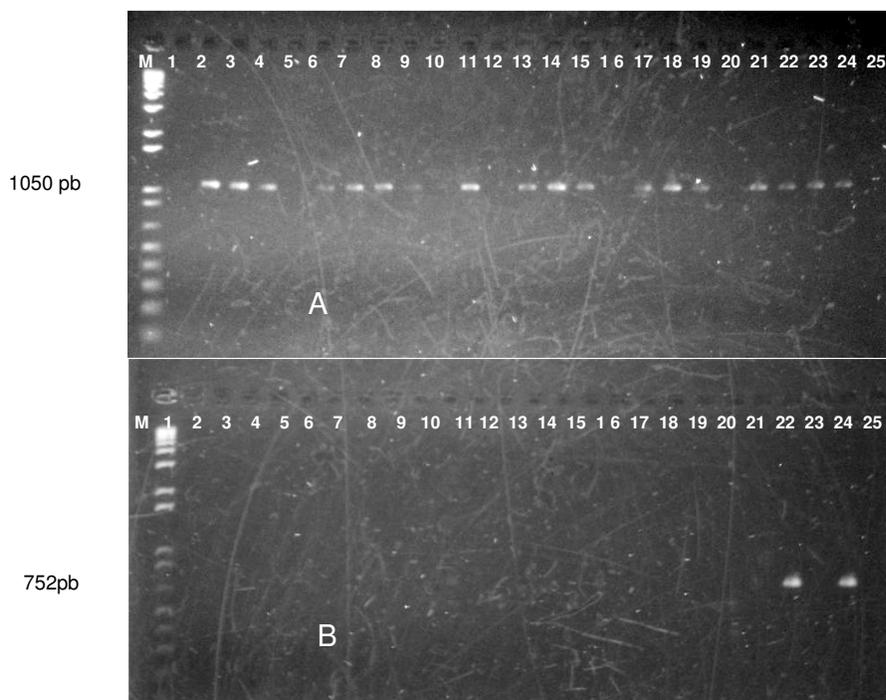


FIGURA 3. Amplificação do DNA dos isolados obtidos em 2008 por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6 (Figura A) e B1/B2 (Figura B): M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1) Golin 1; (2) Golin 2; (3) Golin 4; (4) Golin 5; (5) Golin 6; (6) Golin 8; (7) Golin 11; (8) Golin 12; (9) Golin 13; (10) Golin 14; (11) Golin 15; (12) Golin 16; (13) Golin 17; (14) Golin 18; (15) Golin19; (16) Golin 20; (17) Caieron 3; (18) Caieron 5; (19) Caieron 13; (20) Caieron 27; (21) Caieron 29; (22) Boff 1; (23) Boff 2; (24) Pss281 (controle positivo); (25) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2009.

A comparação das sequências dos isolados patogênicos Pack9 e Pack10, obtidas através do sequenciamento do gene rRNA 16S, com sequências depositadas no GenBank (GenBank, 2009) indicou valores de similaridade que variaram de 97 a 99% com as *Pseudomonas* spp. examinadas (Tabela 4). A similaridade das sequências dos isolados patogênicos com bactérias de outros gêneros associadas a flores de pereiras europeias, como *Erwinia* e *Pantoea*, não ultrapassou 87% (Tabela

4). O fato das sequências dos isolados patogênicos apresentarem similaridade alta (99%) com mais de uma espécie de *Pseudomonas* não permitiu uma interpretação conclusiva sobre sua identificação.

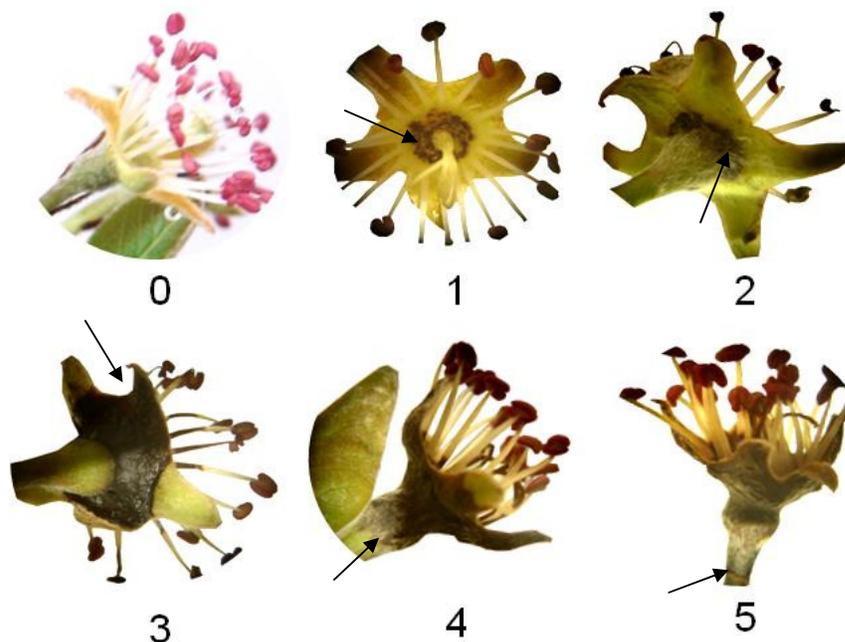
TABELA 4. Similaridade entre as sequências parciais dos isolados patogênicos, obtidas a partir do sequenciamento do gene rRNA 16S, e sequências depositadas no GenBank. Porto Alegre, RS, 2009.

Isolado	Similaridade (%)						
	Pss ¹	Pf ²	Pc ³	Pfl ^{4*}	Pp ^{5*}	Ea ⁶	Pa ⁷
Pack9	99	97	98	99	98	83	85
Pack10	99	99	99	99	99	87	87

¹*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; ²*Pseudomonas fuscovaginae*; ³*Pseudomonas corrugata*; ⁴*Pseudomonas fluorescens*; ⁵*Pseudomonas putida*; ⁶*Erwinia amylovora*; ⁷*Pantoea agglomerans*; * Saprófitas segundo Schaad *et al.* (2001).

4.4. Escala descritiva para morte de flores de pereiras europeias

A escala descritiva elaborada para auxiliar na avaliação da intensidade da morte de flores de pereiras europeias é apresentada na Figura 4. A escala descreve os sintomas e associa a notas de 0-5, abrangendo as diferentes faces que compreendem o quadro sintomatológico associado à morte de flores de pereiras.



- 0→ Ausência de sintomas.
 1→ Necrose inicial no hipanto quando a flor é vista de cima.
 2→ Necrose vista externamente como uma faixa estreita. Sépalas e ovário sem sintomas, quando a flor é vista de cima, hipanto aparece totalmente necrosado.
 3→ Externamente observa-se a necrose avançar para o ovário e ápice das sépalas.
 4→ Necrose atinge totalmente o ovário e as sépalas.
 5→ Necrose avança para o pedicelo.

FIGURA 4. Escala descritiva para morte de flores de pereiras europeias (*Pyrus communis* L.) associada à *Pseudomonas* sp. Vacaria, RS, 2008.

4.5 Efeitos da temperatura, estágio fenológico e isolado na infecção e desenvolvimento da doença

A partir de todas as flores inoculadas das quais se realizou o isolamento, houve crescimento de bactérias fluorescentes resistentes a 200 ppm de rifampicina, confirmando que as lesões estavam associadas aos isolados resistentes inoculados.

Nenhum sintoma foi observado nas flores inoculadas submetidas à temperatura de 5 °C, mesmo após duas semanas da inoculação.

Entre os fatores avaliados, temperatura e isolado tiveram efeito sobre a intensidade da morte de flores de pereiras, assim como a interação entre eles. Não se verificou efeito do estágio fenológico nem das demais interações (Tabela 5).

TABELA 5. Significância estatística (teste F, ANOVA paramétrica) do efeito da temperatura, isolado, estágio fenológico e suas interações sobre o índice de doença da morte de flores de pereiras europeias 'Packham's Triumph'. Vacaria, RS, 2008.

Causas da variação	P<F	
Temperatura	< 0,0001	
Isolado	< 0,0001	
Estádio fenológico	0,6478	Ns
Temperatura x isolado	0,0006	
Temperatura x estágio fenológico	0,2044	Ns
Isolado x estágio fenológico	0,8498	Ns
Temperatura x isolado x estágio fenológico	0,675	Ns

O comportamento dos isolados com relação à morte de flores de pereiras europeias quando submetidas a diferentes temperaturas é apresentado (Figura 5). Percebe-se que a 10 °C apenas Pack9 se diferenciou da testemunha na última avaliação e que os sintomas apareceram 122 h após inoculação. A 15 °C Pack9 e Pss281 se diferenciaram da testemunha na última avaliação, mas não entre si e Pss281 resultou em maior intensidade de doença nas avaliações anteriores. Quando submetidos a 20°C todos isolados diferenciaram-se da testemunha e apresentaram comportamento semelhante ao longo do tempo.

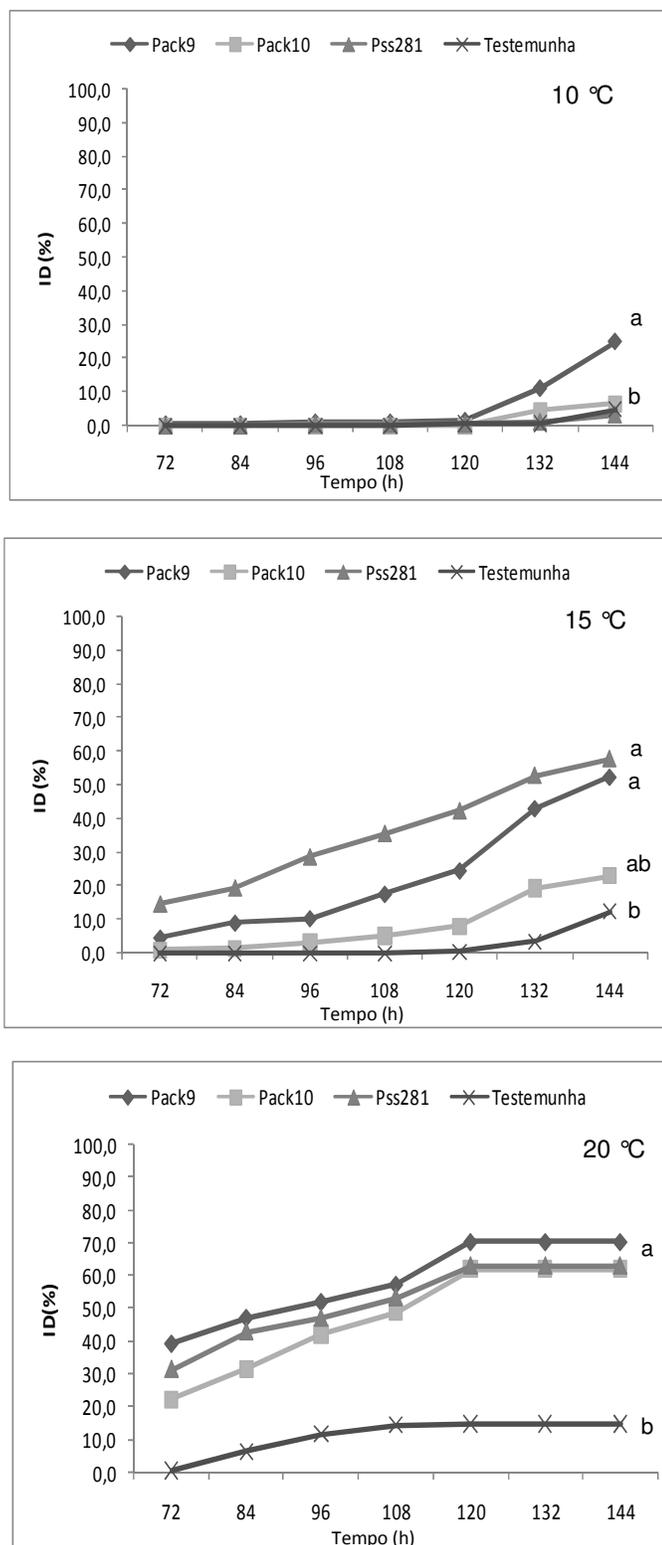


FIGURA 5. Curvas de progresso da morte de flores de pereiras europeias 'Packham's Triumph' inoculadas com três isolados bacterianos e sob diferentes temperaturas. Último ponto seguido por mesma letra em cada gráfico significa que as médias da última avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ID= índice de doença. Vacaria, RS, 2008.

4.6 Detecção e flutuação populacional de patógenos em gemas de pereiras ‘Packham’s Triumph’

4.6.1 Padronização do método de extração de DNA e detecção

O DNA do isolado patogênico Pack9 foi amplificado em PCR com os oligos A1/B6, independentemente do método de extração (lise alcalina, fervura, lise de Edwards ou FTA) (Figura 6, canaletas 1-4). Entretanto, não ocorreu amplificação quando o DNA de Pack9 foi extraído (fervura, lise de Edwards, FTA e FTA com pré-lavagem em álcool 70%) na presença de gemas de pereiras maceradas (Figura 6, canaletas 5, 6, 7 e 8). A forma de maceração (micropistilo ou palito de madeira) não interferiu na amplificação do DNA, já que ocorreu amplificação a partir do DNA extraído quando a suspensão de Pack9 foi deixada em contato com o palito de madeira, simulando-se o processo de maceração das gemas, mas houve inibição da PCR quando o DNA de Pack9 foi extraído na presença de gemas maceradas com micropsitilos (Figura 6, canaletas 9 e 10). Suspeitava-se que, por ser elaborado a partir de *Pinus* sp., rico em compostos tânicos, o palito de madeira poderia inibir a PCR, entretanto os resultados encontrados mostraram que a inibição da reação ocorre em decorrência da presença das gemas de pereiras e não em função do palito de madeira.

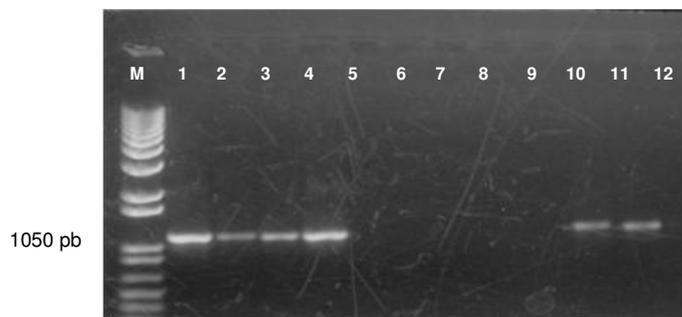


FIGURA 6. Perfil eletroforético dos produtos de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6 utilizando diferentes métodos de extração de DNA do isolado patogênico Pack9, em cultura pura ou na presença de macerado de gemas de pereiras europeias: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1) Pack9/lise alcalina; (2) Pack 9/ fervura; (3) Pack9/lise de Edwards; (4) Pack9/FTA; (5) gema+Pack9/fervura; (6); gema+Pack9/lise de Edwards; (7) gema+Pack9/FTA; (8) gema+Pack9/FTA + pré-lavagem com álcool; (9) gema+Pack9/maceração com micropistilo/FTA; (10) Pack9/palito de madeira/fervura; (11) Pss281 (controle positivo); (12) água (controle negativo). (5-8) maceração com palito de madeira. Porto Alegre, RS. 2008.

O DNA dos isolados Pack10 e Pss281 pôde, da mesma forma que Pack9, ser amplificado por PCR com os oligos A1/B6, independentemente do método de extração (fervura ou FTA) (Figura 7, canaletas 1-6). A amplificação do DNA de Pss281 extraído na presença de gemas de pereiras maceradas foi possível apenas quando o método de extração de DNA combinou acréscimo de PVP 2% no tampão usado para maceração das gemas e FTA com pré-lavagem em álcool (Figura 7, canaletas 10 e 14). A adição do tampão de lise de Edwards a este método resultou em arraste de DNA, sendo preterido, já que representa um passo a mais e não há melhora nos resultados (Figura 7, canaletas 11e 15).

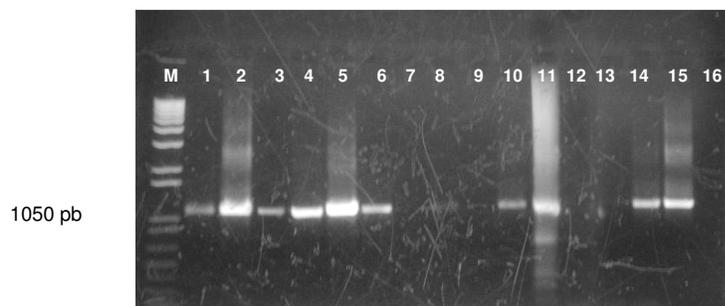


FIGURA 7. Perfil eletroforético dos produtos de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6, utilizando diferentes métodos de extração de DNA dos isolados Pack9, Pack10 e Pss281, em cultura pura ou na presença de macerado de gemas de pereiras europeias: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1) Pack 9/ fervura; (2) Pack 10/ fervura; (3) Pack 9/ FTA; (4) Pack 10/ FTA; (5) Pss281/ fervura; (6) Pss281/ FTA; (7) gemas + Pss281 + PVP/fervura; (8) gemas + Pss281 + PVP/ FTA; (9) gemas + Pss281 + PVP/ FTA + lise de Edwards; (10) gemas + Pss281 + PVP/ FTA + pré-lavagem com álcool; (11) gemas+Pss281 + PVP /FTA + lise de Edwards + pré-lavagem com álcool; (12-15) repetição de 8-11; (16) água (controle negativo). Porto Alegre, RS. 2008.

4.6.2 Projeção de oligonucleotídeos iniciadores

A projeção dos oligos específicos para detecção de *P. syringae* pv. *syringae* foi realizada a partir da sequência do gene *syrB1* que codifica para um aminoácido envolvido na ativação da síntese da siringomicina, tendo como produto a enzima 1 de bio-síntese da siringomicina (NCBI, 2008). A projeção resultou nos oligos SyrB1 (5' – CGT ACA TGA TTA CGG CGA TG – 3') e SyrB2 (5' – TTG TTG CTT GTC GAT TTT GC – 3'), que geram um produto de 202 pb.

Para projeção dos oligos específicos para detecção de *E. amylovora*, escolheu-se o fator de patogenicidade DspE de 198 kDa e com função homóloga ao AvrE de *P. syringae* pv. *tomato*. (Bogdanove *et al.*, 1998). A partir da sequência parcial associada ao fator DspE, projetou-se os oligos DspE1 (5' – CAC TGG GAA CTG AAC ACA AGG – 3') e DspE2 (5' – CAT TTC CCC GCG ATT TTT – 3') que geram um produto de 149 pb.

A produção de pantocina A e pantocina B foi a característica usada para projeção de oligos específicos para detecção de *P. agglomerans*. A pantocina A é codificada por um grupo de genes, entre eles *paaA*, que codifica para uma enzima necessária no processamento do precursor da pantocina A (Wright *et al.*, 2001). A partir da sequência completa do gene *paaA* projetaram-se os oligos PaaA1 (5' – TGA GTT CGC TTC TCC AGA CA– 3') e PaaA2 (5' GTA GAT GGG ACC AAC GGA AA – 3'), que geram um produto de 199pb.

O conteúdo de GC do oligos ficou em torno de 50% e todos foram submetidos à plataforma BLAST (GenBank, 2008) e se mostraram específicos na análise *in silico*.

A projeção dos oligos levou em conta a TM, optando-se por oligos que, segundo o programa Primer 3 (2008), apresentavam TM próxima a 60 °C. Entretanto, o fornecedor dos oligos sintetizados (IDT, 2008) indicou TMs de 53,5, 52,4, 56, 51,3, 55,8 e 54,5 °C para os oligos SyrB1, SyrB2, DspE1, DspE2, PaaA1 e PaaA2, respectivamente. A diferença de TMs entre o programa de projeção e o fornecedor dos oligos decorre da existência de diversas fórmulas para o cálculo da TM. Para definição da temperatura de anelamento na PCR, utilizou-se como referência a TM indicada pela IDT.

4.6.3 Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores

A PCR com os oligos A1/B6 gerou produtos de 1050 pb quando DNA de Pack9, Pack10 e Pss281 foi usado como molde. Não houve amplificação do DNA de Ea551 e Pa1331 (Figura 8). Estes resultados indicaram que os

oligos A1/B6 são, entre as estirpes testadas, específicos ao gênero *Pseudomonas*.

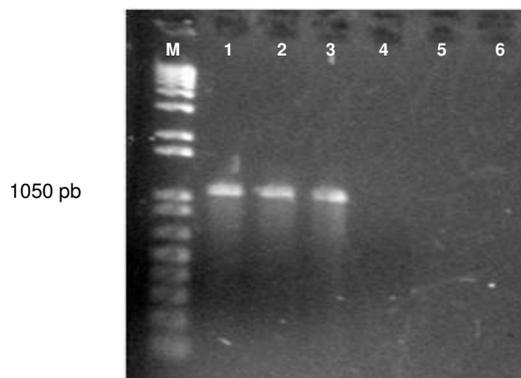


FIGURA 8. Perfil eletroforético dos produtos de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6; M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1) Pack 9; (2) Pack 10; (3) Pss281; (4) Ea551; (5) Pa1331; (6) água (controle negativo). Porto Alegre, RS. 2009.

Quando a PCR foi executada utilizando-se os oligos SyrB1/SyrB2 obteve-se apenas amplificação do DNA de Pss28, com um produto de 202 pb. PCR com os oligos DspE1/DspE2 gerou um produto de 149 pb a partir do DNA de Ea551e a PCR com os oligos PaaA1/PaaA2 foi específica para Pa1331, gerando um produto de 199 pb (Figura 9). Assim, confirma-se a especificidade dos oligos anteriormente verificada *in silico*, sendo que entre as estirpes testadas, a PCR com SyrB1/SyrB2 é específico a *P. syringae* pv. *syringae*, com DspE1/DspE2 a *E. amylovora* e com PaaA1/PaaA2 a *P. agglomerans*.

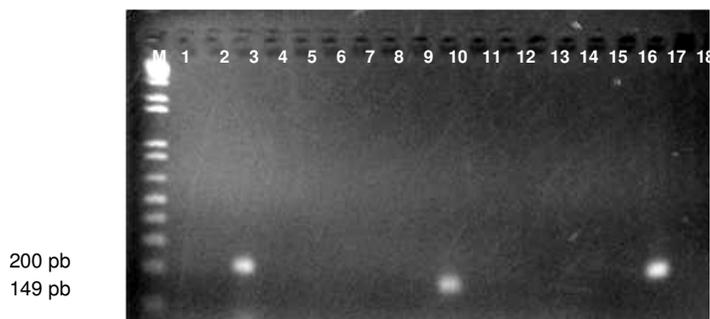


FIGURA 9. Perfil eletroforético dos produtos de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores SyrB1/SyrB2 (1-6), DspE1/DspE2 (7-12) e PaaA1/PaaA2 (13-18): M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1,7,13) Pack 9; (2, 8,14) Pack 10; (3, 9, 15) Pss281; (4, 10, 16) Ea551; (5, 11, 17) Pa1331; (6, 12, 18) água (controle negativo). Porto Alegre, RS. 2009.

4.6.4 Sensibilidade do método

O método de detecção por PCR com oligos A1/B6, extração de DNA por FTA acrescentado de PVP 2% e pré-lavagem em álcool 70% foi capaz de detectar até 10^2 UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas* spp. em macerado de gemas de pereiras (Figura 10). *P. syringae* pv. *syringae* pode igualmente ser detectada até 10^2 UFC.mL⁻¹ em amostra com gemas de pereiras, utilizando PCR com oligos SyrB1/SyrB2 (Figura 11).

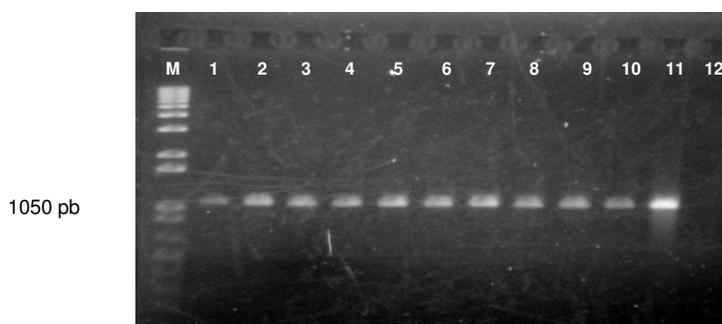


FIGURA 10. Sensibilidade do método de detecção de *Pseudomonas* spp. em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' através de extração de DNA por FTA + PVP + pré-lavagem em álcool e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1-10) diluições sucessivas de células de Pss281 de 10^{12} até 10^2 UFC.mL⁻¹ em macerado de gemas; (11) Pss281 (controle positivo); (12) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2009.

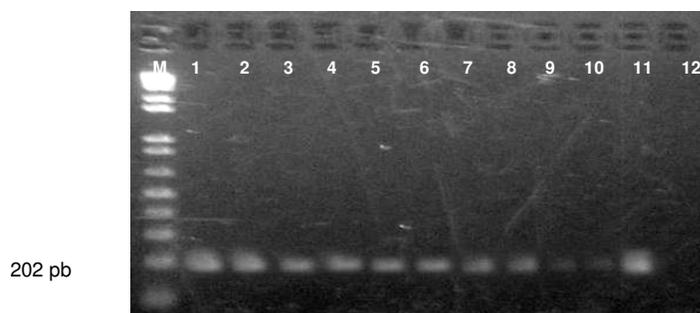


FIGURA 11. Sensibilidade do método de detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' através de extração de DNA por FTA + PVP + pré-lavagem em álcool e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores SyrB1/SyrB2: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1-10) diluições sucessivas de células de Pss281 de 10^{12} até 10^2 UFC.mL⁻¹ em macerado de gemas; (11) Pss281 (controle positivo); (12) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2009.

O mesmo método, mas com os oligos PaaA1/PaaA2, foi sensível até 13 UFC.mL⁻¹ para *Pantoea agglomerans*, entretanto, a eficiência da reação decresceu muito em concentrações menores que 10^7 UFC.mL⁻¹ (Figura 12).

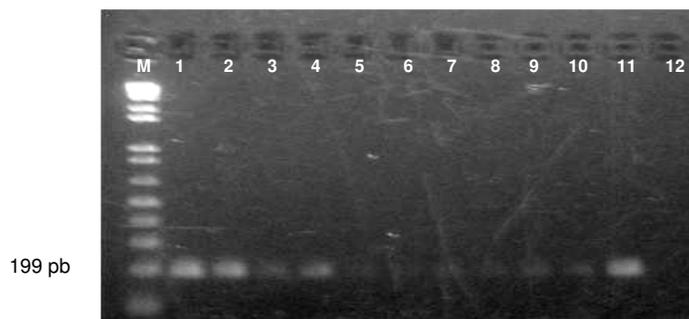


FIGURA 12. Sensibilidade do método de detecção de *Pantoea agglomerans* em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' através de extração de DNA por FTA + PVP + pré-lavagem em álcool e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores PaaA1/PaaA2: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1-10) diluições sucessivas de células de Pa1331 de 10^{10} até 13 UFC.mL⁻¹ em macerado de gemas; (11) Pa1331 (controle positivo); (12) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2009.

Para *Erwinia amylovora* o método de extração de DNA por FTA, PVP 2% e pré-lavagem em álcool 70% seguido por PCR com os oligos DspE1/DspE2 detectou até 9,37 ng.μL⁻¹, o que equivaleria aproximadamente a 10^6 UFC.mL⁻¹ (Figura 13).

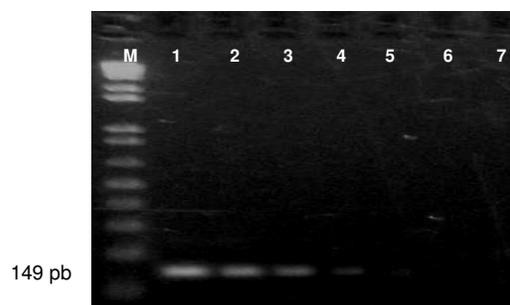


FIGURA 13. Sensibilidade do método de detecção de *Erwinia amylovora* em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' através de extração de DNA por FTA + PVP + pré-lavagem em álcool e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores DspE1/DspE2: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1) 150 ng.µL⁻¹; (2) 75 ng.µL⁻¹; (3) 37,5 ng.µL⁻¹; (4) 18,75 ng.µL⁻¹; (5) 9,37 ng.µL⁻¹; (6) 4,68 ng.µL⁻¹ (7) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2009.

Através de plaqueamento em meio de cultura do macerado de gemas e a suspensão das bactérias, foi possível detectar *Pseudomonas* spp. até 10⁸ UFC.mL⁻¹ e *P. agglomerans* até 10¹ UFC.mL⁻¹ em 24 h. Após 48 h, detectou-se até 10² UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas* spp. e até 13 UFC.mL⁻¹ de *P. agglomerans*. Nas placas que constituíram o controle negativo não houve crescimento de colônias.

4.6.6 Detecção e flutuação populacional

Utilizando-se o método de extração de DNA padronizado e os oligos específicos, não houve detecção de *E. amylovora* e *P. agglomerans* em nenhuma das amostras de gemas coletadas ao longo de 2008 (Tabela 6) . *P. syringae* pv. *syringae* foi detectada apenas em duas de um total de 300 amostras. As amostras positivas para *P. syringae* pv. *syringae* foram coletadas no mês de outubro.

TABELA 6. Detecção de bactérias em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' coletadas a cada dois meses durante o ano de 2008. Proporção de amostras positivas (%). Porto Alegre, 2009.

	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Erwinia</i> <i>amylovora</i>	<i>Pantoea</i> <i>agglomerans</i>
Proporção de detecção	16,3	0,7	0	0

Pseudomonas spp. foram detectadas em todos os meses amostrados, em 16,3% das amostras (Tabela 6, Figura 14). No mês de outubro obteve-se o maior número de amostras positivas para *Pseudomonas* spp. (30%) (Figura 14 e 15), seguido pelo mês de abril (22%). Nas coletas de junho e dezembro houve a menor proporção de detecção (10%) (Figura 14).

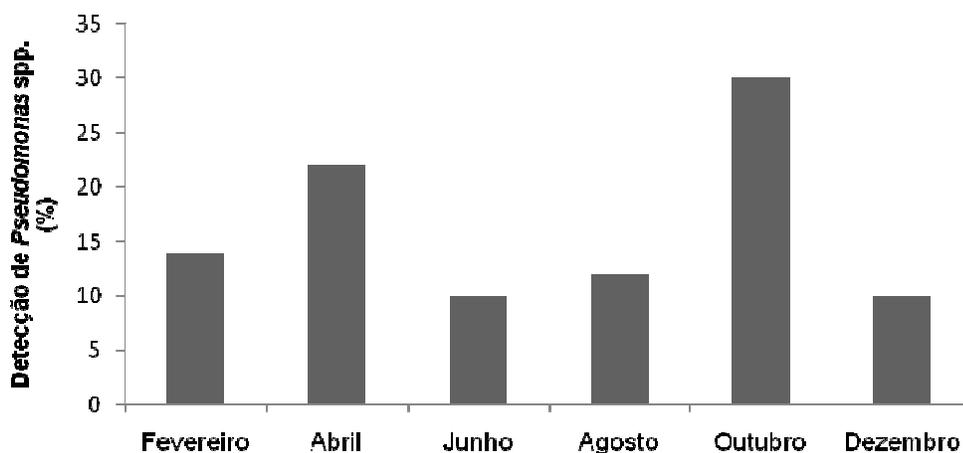


FIGURA 14. Proporção de detecção de *Pseudomonas* spp. em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' através de extração de DNA por FTA + PVP + pré-lavagem em álcool e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6. Porto Alegre, RS, 2009.

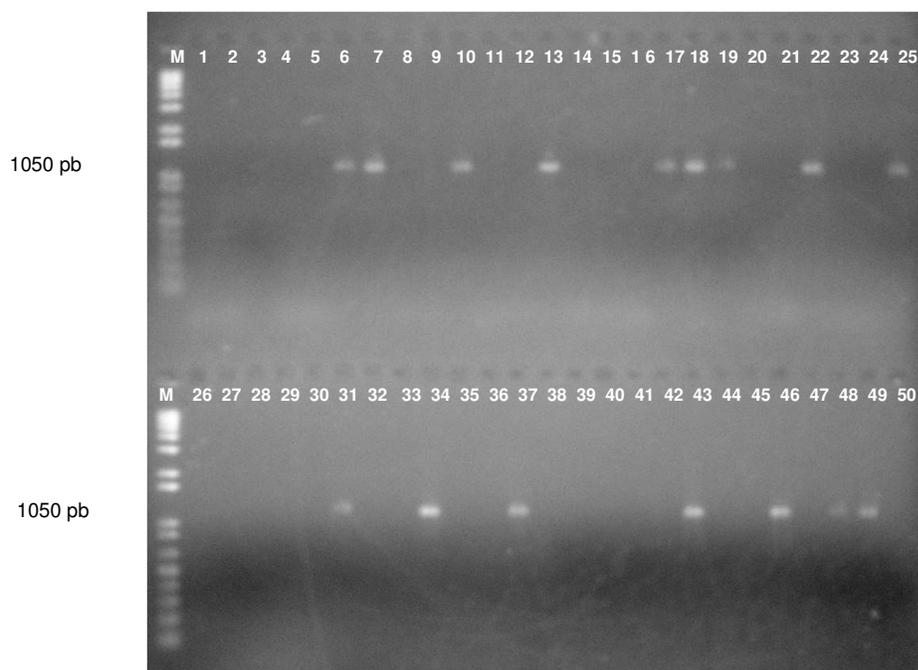


FIGURA 15. Detecção de *Pseudomonas* spp. em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' através de extração de DNA por FTA + PVP + pré-lavagem em álcool e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores A1/B6: M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen); (1-48) amostras coletadas no mês de outubro; (49) Pss281 (controle positivo); (50) água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2009.

Pela análise das condições meteorológicas durante 2008, percebe-se que no período que antecipa a coleta do mês de outubro houve um aumento contínuo de temperatura, com amplitudes térmicas baixas e sem grandes oscilações (Figura 16). Esta mesma tendência na temperatura é observada no período que antecipa a coleta do mês de abril. No período relacionado à coleta de junho se observa temperaturas baixas, com mínimas próximas a zero. Nos meses de dezembro a fevereiro notam-se temperaturas mais altas, com máximas próximas a 30 °C. Além disso, há de se observar que no terceiro decênio de outubro houve precipitação alta, totalizando 240 mm.

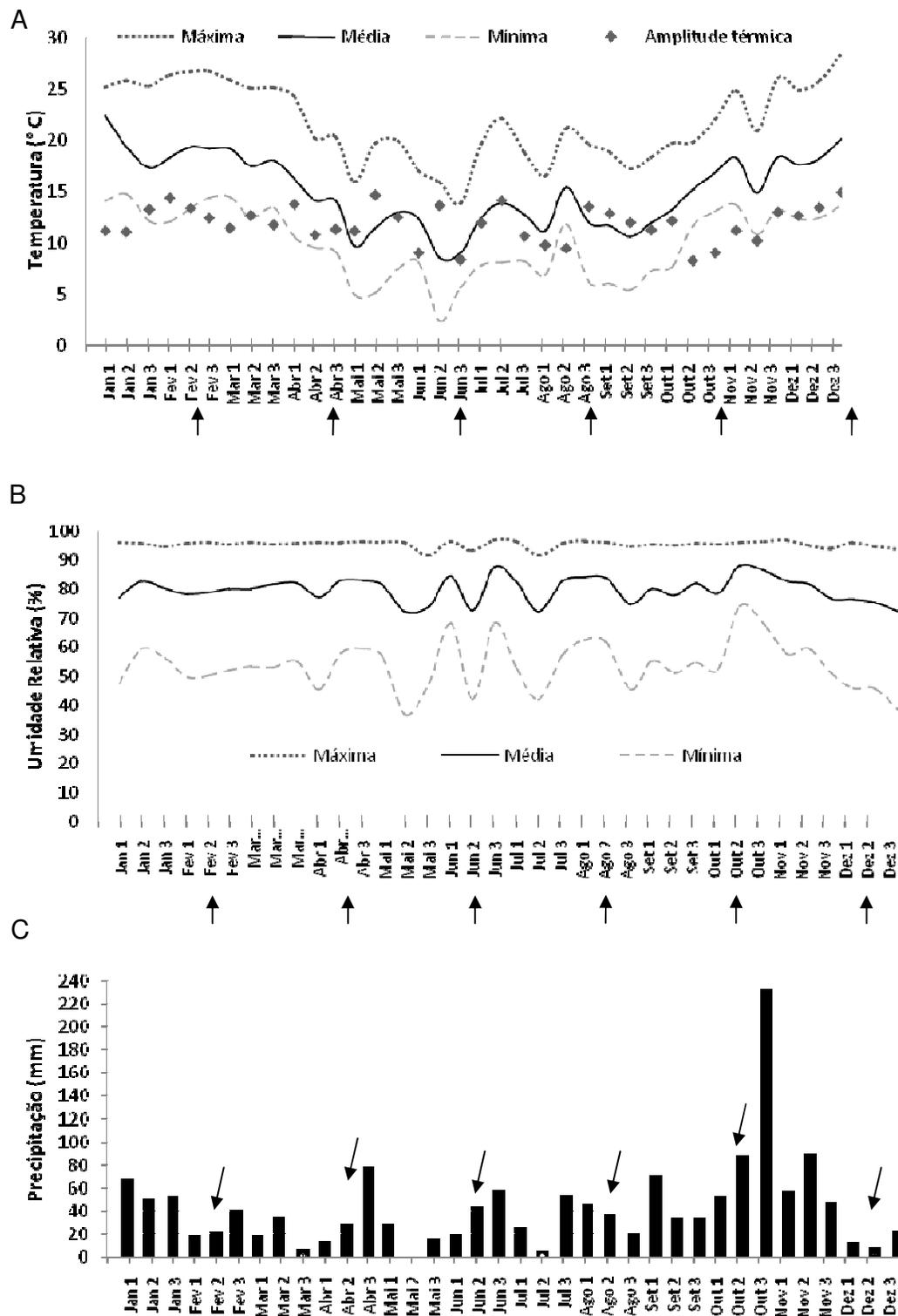


FIGURA 16. Temperaturas e amplitude térmica (°C) (Figura A); umidade relativa (%) (Figura B) e precipitação acumulada (mm) (Figura C) em Vacaria, RS, de acordo com o registro da estação meteorológica EMBRAPA-EE (5179), durante o ano de 2008. Dados decendiais. Setas indicam época de coleta de gemas de pereiras. Vacaria, RS, 2009.

4.7 Incidência da doença a campo

Nas plantas de pereira europeia 'Packham's Triumph' avaliadas em plena floração, a incidência de flores com necrose variou de 0-10%, com uma média de 3,8%. A incidência em cada planta, assim como a proporção por planta de amostragens em que se detectou *Pseudomonas* spp. em gemas por meio de PCR com os oligos A1/B6 estão apresentadas na Figura 17. Segundo análise de correlação não paramétrica de Sperman ($r=0,11938$; $p=0,4090$) não há correlação entre proporção de detecção de *Pseudomonas* spp. em gemas e incidência de necrose nas flores na plena floração. Isto é, plantas em que foi detectada a bactéria nas gemas ao longo do ano não necessariamente apresentaram necrose nas flores na primavera (Figura 17).

4.8 Ocorrência da doença em pomares de Vacaria, RS

Verificou-se a ocorrência de flores com necrose nos três pomares de pereiras europeias visitado durante a época de plena floração, com incidência de 0,2, 2,2 e 2,4% das plantas. Observou-se que nos pomares sem quebra-vento havia maior intensidade de necrose nas plantas que ficavam no começo das linhas.

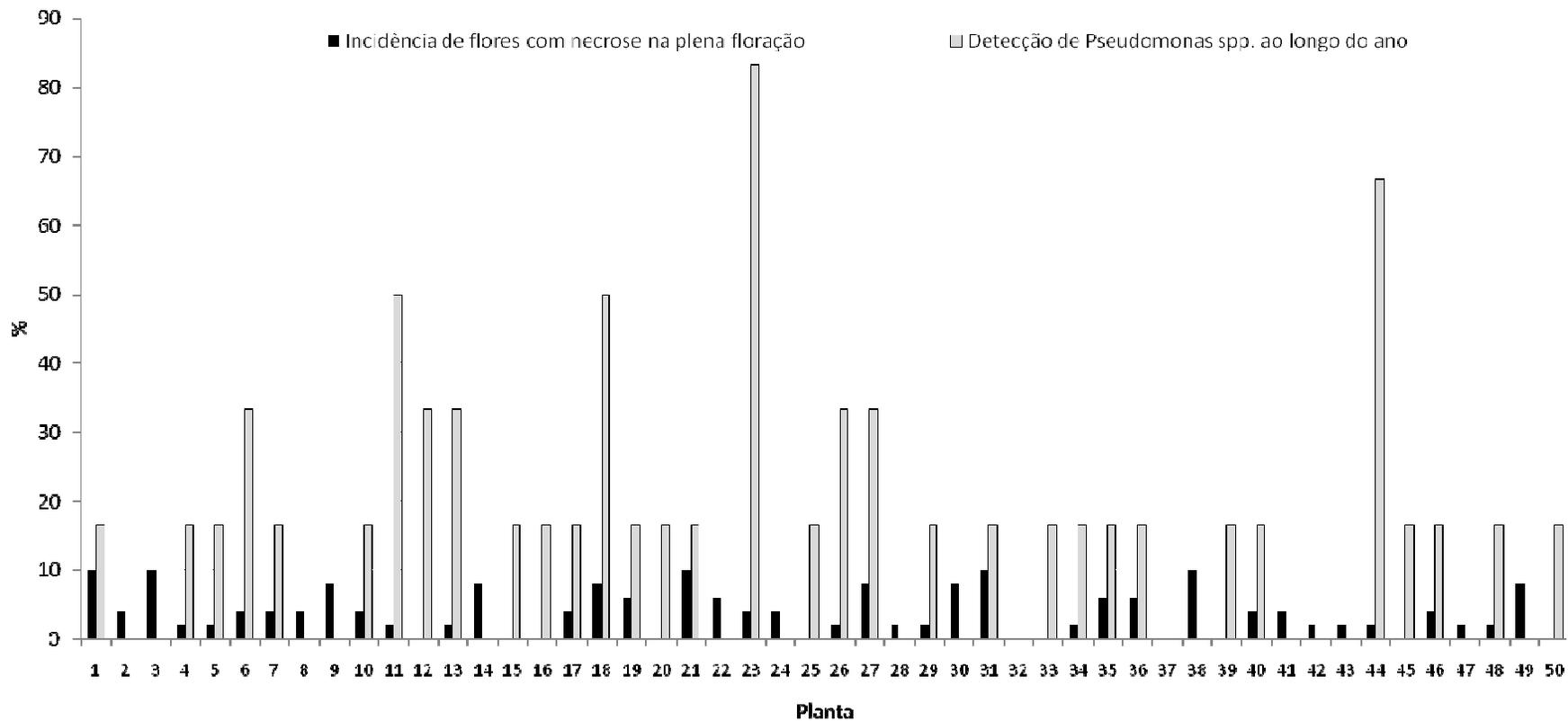


FIGURA 17. Incidência de flores necrosadas por planta no estágio de plena floração e proporção (por planta) de amostragens em que se detectou *Pseudomonas* spp. por meio de PCR com os oligos A1/B6. Porto Alegre, 2009.

5 DISCUSSÃO

A caracterização bioquímica e fisiológica dos isolados patogênicos Pack9 e Pack10 não permitiu a identificação segundo Schaad *et al.* (2001), uma vez que, ao contrário do agente causal do crestamento de flores de pereiras europeias em outros países – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, são oxidase negativa, arginina dehidrolase positivo e não incitam reação de hipersensibilidade em fumo. As características LOPAT de Pack9 e Pack10 conferem com as de *P. fuscovaginae*, *P. corrugata*, *P. fluorescens* e *P. putida*, porém as duas primeiras não são consideradas patógenos em pereiras e as demais são saprófitas (Schaad *et al.*, 2001). Entretanto, isolados associados à morte de flores de pereiras europeias na China e algumas estirpes de referência foram caracterizados como oxidase e arginina dehidrolase positivos e, apesar disso, identificados como *P. syringae* pv. *syringae* (Qiu *et al.*, 2008). Por outro lado, *P. fluorescens*, abundantemente encontrada em pereiras europeias (Stockwell *et al.*, 1999) mas considerada saprófita, teve os postulados de Koch cumpridos para necrose e podridão de couve-flor (Lo Cantore & Iacobellis, 2007), uma evidência de que possa ser classificada como uma espécie patogênica. A patogenicidade de *Pseudomonas* spp. pode ter sido muitas vezes subestimada em função de não apresentarem reação de hipersensibilidade

em fumo. Hirano e Upper (1990) afirmam que a reação de hipersensibilidade em fumo não é uma ferramenta confiável para testar a patogenicidade de *Pseudomonas* spp., já que estirpes patogênicas podem não expressar a reação em fumo, mas apresentarem o gene *hrp* e os fatores envolvidos na patogenicidade.

Apesar da alta acurácia da identificação de bactérias através do gene rRNA 16S, o sequenciamento deste gene em Pack9 e Pack 10 não possibilitou sua identificação. A alta variabilidade de sequências entre lócos ribossomais repetidos tem sido identificada como fonte de variação com um grau apropriado de instabilidade genética, sendo adequado para diferenciação de espécies (Rogers & Burgoyne, 1997). Entretanto, as diferenças em um grupo de sequências não necessariamente refletem a variabilidade verídica, já que estas diferenças podem ser devido a erros gerados durante as reações de amplificação e sequenciamento (Arahal et al., 2004). Além disso, existem casos em que as espécies investigadas têm a mesma sequência, ou muito parecida, impossibilitando sua diferenciação e identificação (Clarridge, 2004). Qiu *et al.* (2008) através do sequenciamento do gene rRNA 16S também obtiveram similaridade alta entre mais de uma estirpe. Encontraram 99% de similaridade entre os isolados obtidos na China com *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *glycinea* (agente causal do crestamento bacteriano em soja) e *P. syringae* pv. *phaseolicola* (associada à feijão), porém concluíram a identificação do isolados como *P. syringae* pv. *syringae* em função da análise de ácidos graxos e utilização de 95 fontes de carbono.

A não amplificação do DNA de Pack9 e Pack10 em PCR com os oligonucleotídeos que amplificam DNA de *P. syringae* pv. *syringae* (B1/B2 e SyrB1/SyrB2) associada à baixa frequência de detecção de *P. syringae* pv. *syringae* em gemas de pereiras é uma evidência de que esta bactéria possa não ser o agente causal da morte de flores de pereiras europeias verificada em Vacaria, RS. A baixa frequência de detecção não permitiu que o primeiro passo dos postulados de Koch fosse cumprido para *P. syringae* pv. *syringae*: associação constante entre patógeno e hospedeiro.

Ao contrário de Latorre *et al.*(2002) que descrevem o estágio ramallete floral exposto no momento da infecção como o mais suscetível, seguido por balãozinho e plena floração e Whitsides & Spotts (1991) que atribuem maior suscetibilidade a flores em plena floração, não se observou efeito dos estádios fenológicos testados (balãozinho e plena floração) sobre a intensidade da doença. Maior intensidade de doença nas temperaturas de 15 e 20 °C corroboram com os resultados de Latorre *et al.* (2002).

A morte de flores de pereiras europeias em condições controladas ocorreu sem necessidade de tratamento de frio, portanto a doença ocorre na ausência de geadas, contrariando Gross & Cody (1985), Whitsides & Spotts (1991) e Sule & Seemuller (1987). A ausência de atividade nucleadora de gelo dos isolados patogênicos reforça a idéia de que temperaturas frias não são essenciais para ocorrência da doença. Entretanto, mesmo que não seja essencial, a nucleação de gelo e geadas podem incrementar a intensidade da doença. Panagopoulos & Crosse (1964) sugerem que as infecções no cálice e receptáculo floral são uma forma endêmica da doença, enquanto o crestamento ocorre apenas quando certos fatores epidemiológicos estão

presentes, sendo a geada na primavera um destes fatores. Em Vacaria a temperatura mínima na primavera fica em torno de 8°C (IPAGRO, 1989). Temperaturas amenas na primavera talvez expliquem a pouca agressividade da doença, sem presença de crestamento de ramos, e a baixa incidência de morte de flores de pereiras que ocorre em Vacaria, 3,8% enquanto que na Espanha observam-se pomares com 40% de incidência de crestamento de flores e a ocorrência em 60% dos pomares de Girona (Montesinos & Vilardell, 1988).

A dificuldade de identificação dos isolados patogênicos Pack9 e Pack10 nas espécies descritas, o comportamento diferente da doença quanto à temperatura e estágio fenológico de maior suscetibilidade e a não detecção de outros patógenos em gemas sugere que o agente causal da morte de flores de pereiras europeias no Rio Grande do Sul possa ser uma espécie não descrita. Para concluir isso, entretanto, são necessárias maiores investigações.

A não detecção de *Erwinia amylovora* em gemas de pereiras 'Packham's Triumph' descarta a possibilidade de que os sintomas observados em Vacaria fossem de fogo bacteriano causado por *E. amylovora*, que em sintomas iniciais se confundem com o crestamento bacteriano associado à *Pseudomonas syringae* (Qiu *et al.*, 2008, Aldwinckle & Beer, 1979)

Em plantas perenes, a população de *Pseudomonas* spp. é geralmente maior na primavera (Hirano & Upper, 1990). Essa informação corrobora com os resultados de maior detecção de *Pseudomonas* spp. em gemas de pereiras no mês de outubro. Apesar de se verificar relação do período que

antecipa a coleta de gemas em outubro com temperaturas mais amenas e menores oscilações, segundo Hirano & Upper (1990) o efeito da temperatura é um fator menor e sugerem como fator maior o aumento da atividade da planta. Sabaratnam & Beattie (2003) afirmam que a população de *Pseudomonas* spp., seja ela epifítica ou endofítica, é dependente da espécie da planta que coloniza, ao contrário de *Pantoea agglomerans* que coloniza epifiticamente as superfícies independentemente da espécie da planta.

A precipitação aparece como o principal fator na distribuição temporal de *Pseudomonas* spp., diminuindo a população em dias de chuva por lavar a superfície das plantas (Hirano & Upper, 1990). A precipitação de 240 mm ocorrida em final de outubro (quatro vezes a precipitação normal para época, IPAGRO, 1989) contribui, assim, para o decréscimo na proporção de detecção de *Pseudomonas* spp. nas gemas de pereiras 'Packham's Triumph' verificada na coleta de dezembro.

O fato de não haver relação entre detecção de *Pseudomonas* spp. em gemas ao longo do ano e a incidência de morte de flores na primavera pode decorrer do fato de que *Pseudomonas* spp. não patogênicas podem ser detectadas nas gemas através do método utilizado. Além disso, sugere que o inóculo para morte de flores pode estar muito mais associado a cada gema individualmente que a planta como um todo.

Por fim, há de se considerar que a detecção de bactérias em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' só foi possível através do método de extração de DNA que inclui FTA, acréscimo de PVP e pré-lavagem com álcool 70% e PCR com os oligos projetados. A tecnologia FTA tem aumentado a sensibilidade de detecção comparada a métodos de

extração convencionais do DNA, além de propiciar a coleta de um grande número de amostras (Orlandi & Lampel, 2000; Mbogori et al., 2006). O cartão FTA é uma matriz fibrosa, a qual os ácidos nucleicos ficam aderidos, reduzindo os passos de coleta de DNA, transporte, purificação e estocagem e, conseqüentemente, reduz o custo e tempo requerido para o processamento do DNA. Esta matriz fibrosa está impregnada com agentes quelantes e desnaturantes que retém e lisam os microrganismos em contato (Belgrader *et al.*, 1995). O PVP, por sua vez, tem a propriedade de formar pontes de hidrogênio com fenóis (Young *et al.*, 1993), que são substâncias constituintes da lignina e portanto presentes em abundância nas gemas de pereiras e inibem a PCR. O método permitiu alcançar níveis de detecção compatíveis com os encontrados por Kerkoud *et al.* (2002), com detecção de 10^2 UFC.mL⁻¹. Para *E. amylovora* o nível de detecção foi considerado baixo (10^6 UFC.mL⁻¹), isso pode decorrer do tipo de estratégia escolhida para projeção dos oligonucleotídeos iniciadores. Uma desvantagem do uso de genes que codificam um produto específico para a projeção de oligos é que normalmente estão presentes na forma de cópia simples na célula, o que pode acarretar numa diminuição considerável da sensibilidade se comparada com genes que possuem múltiplas cópias, tais como gene rRNA 16S (Pastrik & Maiss, 2000).

As informações de temperatura que favorece a doença, ausência de efeito do estágio fenológico e a não relação com praga quarentenária *E. amylovora* são peças-chave para o manejo da morte de flores de pereiras europeias. Além disso, apesar de não se ter identificado a espécie do agente causal, a informação do gênero já dá subsídios suficientes para o

desenvolvimento de métodos de controle da morte de flores de pereiras europeias, evidenciando a relevância deste trabalho.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho chegou-se às seguintes conclusões:

1. a morte de flores de pereiras europeias, observada em pomares de Vacaria, RS, está associada à *Pseudomonas* sp.;
2. o estágio fenológico da pereira no momento da inoculação não tem efeito sobre a intensidade da morte de flores de pereira europeias 'Packham's Triumph';
3. temperaturas amenas (15-20 °C) favorecem a morte de flores de pereiras europeias 'Packham's Triumph' inoculadas com *Pseudomonas* spp. em condições controladas;
4. a morte de flores de pereiras europeias não tem relação com *Erwinia amylovora*;
5. *Pseudomonas* spp. são encontradas em gemas de pereiras europeias 'Packham's Triumph' em todas as épocas do ano.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude da complexidade envolvida no estudo da morte de flores de pereiras europeias, como por exemplo, florada das pereiras apenas uma vez ao ano e em período curto e também diante do fato de que os sintomas foram observados recentemente e, portanto, pouco se conhece sobre a doença no Brasil, este trabalho não põe um ponto final no assunto. Muito pelo contrário, abre as portas para a continuidade das investigações.

A partir deste trabalho surgem perspectivas como obtenção de mais isolados patogênicos, identificação dos isolados já obtidos através do perfil de ácidos graxos, identificação de regiões no gene rRNA 16s dos isolados Pack9 e Pack10 que possam ser usadas para projeção de oligonucleotídeos específicos a fim de se realizar a detecção nas gemas já coletadas, análise temporal da doença a campo, análise espacial, entre outras.

É importante ressaltar que o uso de cartões FTA permite que todo material de DNA analisado possa ser utilizado em estudos futuros, sem nenhum comprometimento na qualidade.

Este trabalho é inédito no Brasil e investigou uma problemática inicial, trazendo informações relevantes antes de a epidemia tornar-se comprometedora. Cabe ao futuro a prevenção e o manejo da doença em níveis de dano econômico aceitáveis.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDWINCKLE, H. S.; BEER, S. V. Fire blight and its control. **Horticulture Review**, Leuven, v. 1, p. 423-474, 1979.

ARAHAL, D.R.; LLOP, P.; ALONSO, M.P.; LOPEZ, M.M. *In silico* evaluation of molecular probes for detection and identification of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v.27, n.5, p.581-591, 2004.

BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p.145-172, 1995.

BELGRADER, P.; DEL RIO, S.A.; TURNER, K.A.; MARINO, M.A.; WEAVER, K.R.; WILLIAMS, P.E. Automated DNA purification and amplification from blood-stained cards using a robotic workstation. **Biotechniques**, New York, v.19, p.426-432, 1995.

BOGDANOVE, A.J.; BAUER, D. W.; BEER, S.V. *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (Type III Secretion) pathway. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 8, p. 2244–2247, 1998.

BOTTGER, E. C. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 65, p. 171–176, 1989.

CAMELATTO, D.; ARRUDA, J.J.P. de; NACHTIGALL, G. R. Abortamento de gemas florais da pereira (*Pyrus communis*, L.) cvs. Packham's Triumph e William's Bon Chretien. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 6., 1997, Belém - PA. **Resumos...** Belém: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 1997. 620 p. p. 485.

CANCINO, L.; LATORRE, B.; LARACH, W. Pear blast in Chile. **Plant Disease**, St. Paul, v. 58, p. 568-570, 1974.

CLARRIDGE, J.E. Impact of 16s rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 4, p. 840–862, 2004.

COSTA, E.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; GARCIA, N.; VIÑAS, I.. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, p. 793-800, 2000.

CZERMAINSKI, A. B. C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.9, p.1545-1555, 1999.

DOIDGE, E. M. A bacterial blight of pear blossom occurring in South Africa. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 4, p. 50-74, 1917.

DRESCHER, A.; GRANER, A. PCR-genotyping of barley seedlings DNA using samples from tissue prints. **Plant Breeding**, Oxford, v.121, p.228-231, 2002.

DUARTE, V.; DE BOER, S.H.; WARD, L.J.; DE OLIVEIRA, A.M.R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil, **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96, p.535-545, 2004.

EDWARD, U; ROGGAL, T.; BLOCKER, H.; ERNDE, M.; BOTTGER, E. C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of gene coding 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, p. 7843-7853, 1989.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for preparation of plant genomic DNA for the PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 1349,1991.

FAO. **Peras y membrillos.** Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 07 ago. 2007.

GENBANK. **Plataforma BLAST.** Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=blastHome. Acesso em: 15 set. 2008.

GENBANK. **Plataforma BLAST.** Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=blastHome. Acesso em: 31 jan. 2009.

GROSS, D.C.; CODY, Y.S. Mechanisms of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.31, p. 403–410, 1985.

GUTHRIE, R.; SUSI, A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v.32, p.338-343, 1963.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p.155-17, 1990.

IDT. Integrated DNA Technologies: síntese de oligonucleotídeos iniciadores. Disponível em: <http://www.idtdna.com>. Acesso em: 16 set. 2008.

INSTITUTO BIOLÓGICO. **Coleção de fitobactérias**. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/bacterias.php>. Acesso em: 05 mai. 2008.

IPAGRO - INSTITUTO DE PESQUISAS AGRONÔMICAS. Seção de Ecologia Agrícola. **Atlas Agroclimático do Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 1989. v. 3. 102p.

KENNELLY, M. M.; CAZORLA, F. M.; VICENTE, A.; RAMOS, C.; SUNDIN, J. W. *Pseudomonas syringae* disease of fruits trees. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, p. 4-17, 2007.

KERKOU, M.; MANCEAU, C.; PAULIN, J. P. Rapid diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, the causal agent of blister spot of apple, by polymerase chain reaction using specifically designed *hrpL* gene primers. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, p.1077-1083, 2002.

KOLBERT, C. P.; PERSING, D. H. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 2, p.299– 305, 1999.

LATORRE. B. A.; RIOJA, M.E.; LILLO, C. The effect of temperature on infection and a warning system for pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Crop Protection**, Oxford, v. 2, p. 33–39, 2002.

LI, B.; XIE, G. L.; ZHANG, J. Z.; JANSSENS, D.; SWINGS, J. Identification of the bacterial leaf spot pathogen of poinsettia in China. **Plant Physiology**, Rockville, v.154, p. 711-715, 2006.

LINDOW, S.E.; ARNY, D.C.; UPPER, C.D. Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 36, p. 831–838, 1978.

LO CANTORE, P.; IACOBELLIS, S. First report of head rot of *brassica oleracea* convar. *botrytis* var. *italica* caused by *pseudomonas fluorescens* in southern italy. **Plant Disease**, St. Paul, v.91, p. 638, 2007.

MAIA, M.L.; AMARO, A.A.; GONÇALVES, J.S. Produção e mercado de pêra e pêssego no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 33-48, 1996.

MANCEAU, C.; HORVAIS, A. Assesment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism

analysis of rRNA operons with special emphasis on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p.498-505, 1997.

MANSVELT, E.L.; HATTING, M.J. Bacterial blossom blast. In: JONES, A.L., ALDWINCKLE, H.S. (Eds.) **Compendium of Apple and Pear Diseases**. St. Paul, MN : The American Phytopathological Society, 1990. p. 64.

MARODIN, G. A. B. **Época e intensidade de abortamento de gemas florais em pereiras (*Pyrus communis* L.) Packham's Triumph em ambientes com distintas condições climáticas**. 1998. 191 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

MBOGORI, M.N.; KIMANI, M.; KURIA, A.; LAGAT, M.; DANSON, J.W. Optimization of technology for large scale plant DNA isolation for use in marker assisted selection. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v.5, n.9, p.693-696, 2006.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, Washington, v. 6, n. 5, p. 195-219, 1923.

MELO NETO, M. L.; ALMEIDA, M. B. Avaliação de métodos de inoculação de *Botrytis cinerea* em uvas das variedades 'crimson' e 'italia melhorada'. XX Congresso Brasileiro de Fruticultura In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20. 2008, Vitória. **Anais**...Vitória:Incepar, 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Lista de pragas quarentenárias**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 15. ago .2008.

MONTESINOS, E.; GISPERT, M.; RECAS, E.; VILARDELL, P. Assessment of key parameters for monitoring and forecasting blast of dormant flower buds in commercial pear orchards in Catalunya, Spain. **Acta Phytopathologica et Entomológica Hungarica**, Budapeste, v. 27, p. 465–471, 1992.

MONTESINOS, E.; VILARDELL, P. On the role of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in blast of pear trees in Catalunya, Spain. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 256, p. 143–151, 1987.

MONTESINOS, E.; VILARDELL, P. Relationships among population levels of *Pseudomonas syringae*, amount of ice nuclei, and incidence of blast of dormant flower buds in commercial pear orchards in Catalunya, Spain. **Phytopathology**, St Paul, v. 81, p. 113–119, 1991.

MONTESINOS, E.; VILARDELL, P. Effect of bactericides, phosphonates and nutrient amendments on blast of dormant flower buds of pear: a field

evaluation for disease control. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 787–794, 2001.

MONTESINOS, E.; VILARDELL, P. El desecamiento bacteriano del Peral producido por *Pseudomonas syringae*. **Fruticultura profesional**, Barcelona, v. 18, p. 56-59, 1988.

MOURA, A.B.; CHITARRA, L.G.; SOUZA, R.M. Métodos de detecção de bactérias em sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.13, p.297-319, 2005.

NAKASU, B.H.; LEITE, D.L. Indicação de porta-enxerto e cultivares de pereira para o Sul do Brasil. **HortiSul**, Pelotas, v. 1, n. 2, p. 20-24, 1990.

NAKASU, B.H.; LEITE, D.L. Pirus 9 - Seleção de pereira para o Sul do Brasil. **HortiSul**, Pelotas, v. 2, n. 3, p. 19-20, 1992.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>. Acesso em: 15 set. 2008.

ORLANDI, P.A.; LAMPEL, K.A. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.6, p.2271-2277, 2000.

PALYS, T.; NAKAMURA, L. K.; COHAN, F. M. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 1145–1156, 1997.

PANAGOPOULOS, C.G.; CROSSE, J. E. Blossom Blight and related symptoms caused by *Pseudomonas syringae* Van Hall on pear trees. **Annual Report of the East Malling Research Station**, Kent, p. 119 -122, 1964.

PASTRIK, K.H.; MAISS, E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. **Phytopathology**, St. Paul, v.148, p.619-626, 2000.

PRIMER 3. **Projeção de oligonucleotídeos iniciadores a partir de seqüências de DNA**. Disponível em: http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi. Acesso em: 16 set. 2008.

QIU, W.; HUAI, Y.; XU, F.; XU, L.; XIE, G.; LI, B.; YU, S.; LIU, J. Pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae* pv *syringae* in China. **Agricultural Sciences in China**, Oxford, v. 7, n.9, p. 1091-1096, 2008.

ROE, B.A.; CRABTREE, J.S.; KHAN, S.A. **DNA isolation and sequencing**. New York: Wiley, 1996.

ROGERS, C.; BURGOYNE, L. Bacterial typing: Storing and processing of stabilized reference bacteria for polymerase chain reaction without preparing DNA- an example of an automatable procedure. **Analytical Biochemistry**, Oxford, v.247, p.223-227, 1997.

SABARATNAM, S.; BEATTIE, G. A. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in Epiphytic and Endophytic Colonization of Leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 69, n. 2, p. 1220–1228, 2003.

SANTANA, F.M.; BIANCHI, V.J.; ROMBALDI, C.V.; GOMES, C.B.; ROSSETO, E.A. Marcadores moleculares na interação, diagnose e caracterização de fungos fitopatogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.14, p.383-403, 2006.

SCHAAD, N. W.; JONES J.B.; CHUN W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3 ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 2001.164p.

SORENSEN, K. N.; KIM, K. H.; TAKEMOTO, J. K. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 226-230, 1998.

STOCKWELL, V. O. ; MCLAUGHLIN, R. J. ; HENKELS, M. D. ; LOPER, J. E.; SUGAR, D. ; ROBERTS, R. G. Epiphytic colonization of pear stigmas and hypanthia by bacteria during primary bloom. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, p. 1162- 1168, 1999.

SULE, S.; SEEMULLER, E. The role of ice formation in the infection of sour cherry leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, p. 173–177, 1987.

THOMSON, D.; HENRY, R. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. **Biotechniques**, New York, v.19, p.349-400, 1995.

WAISSBLUTH, M.E.; LATORRE, B.A.. Source and seasonal development of inoculum for pear blast in Chile. **Plant Disease**, St. Paul, v. 62, p. 651–655, 1978.

WANG, H.; QI, M.; CUTLER, J. A simple method of preparing plant sample for PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.21, p.4153-4154, 1993.

WHITSIDES, S.K.; SPOTTS, R.A. Induction of pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 40, p. 118–12, 1991.

WOESE, C. R.. Bacterial evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 5, p. 221–271, 1987.

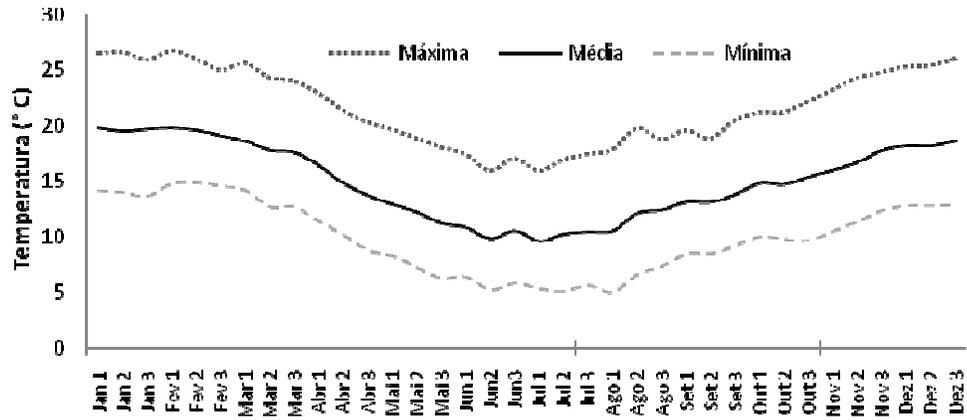
WOLF, J.B. **Applied molecular biology, beginning laboratory manual**. Disponível em: <http://www.research.umbc.edu/~jwolf/method1.html>. Acesso em: 5 out. 2007.

WORKUM, M.V. Nashi profile. **NewZeland Horticultural News**, Wellington, v. 9, n. 2, p. 12-13, 1997.

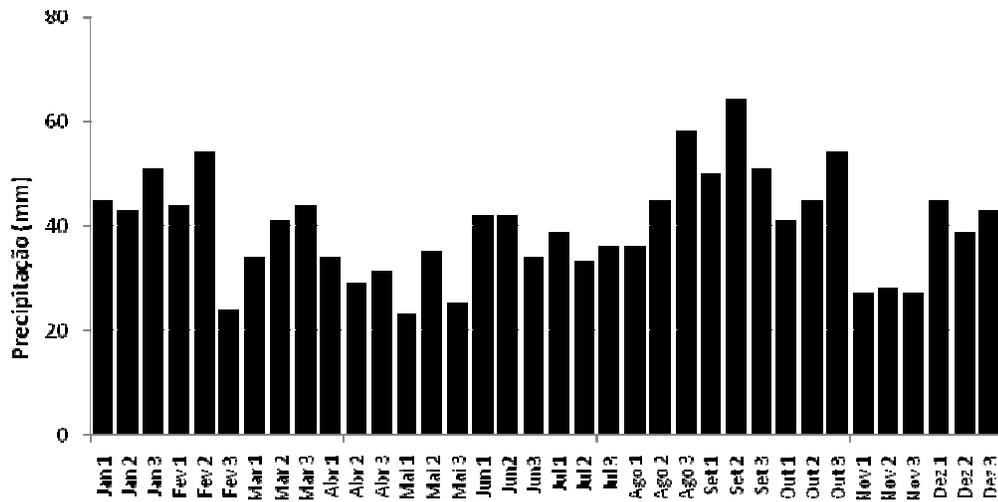
WRIGH, S.A.I.; ZUMOFF, C. H.; SCHNEIDER, L.; BEER, S.V. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 284–292, 2001.

YOUNG, C.C.; BURGHOFF, R. L.; KEIM, L. G.; MINAK-BERNERO, V.; LUTE, J.R.; HINTON, S. M. Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 6, p. 1972-1974, 1993.

9 APÊNDICE



APÊNDICE 1. Temperatura normal em Vacaria, RS. (IPAGRO,1989)



APÊNDICE 2. Precipitação normal em Vacaria, RS. (IPAGRO,1989)