



Detecção de *Erwinia psidii* via enriquecimento em extrato de folhas de goiabeira e imunodifusão radial dupla

Ana Cristina O. Teixeira¹, Marisa A.S.V. Ferreira¹ & Abi S.A. Marques²

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, 70.910-900, Brasília, DF, Brasil; ²Laboratório de Quarentena Vegetal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 70.770-970, Brasília, DF, Brasil.

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

RESUMO

Uma das principais doenças que afetam a produção de goiaba no Brasil é a seca-dos-ponteiros, causada pela bactéria *Erwinia psidii*, cuja disseminação é favorecida por mudas contaminadas. O desenvolvimento de métodos diagnósticos mais eficazes poderia reduzir a disseminação da bactéria no país. Considerando a necessidade de se disponibilizar um método eficiente e simples para a detecção de *E. psidii* em material de propagação, foi objetivo desse trabalho produzir antissoros policlonais específicos contra a bactéria e desenvolver um método de detecção utilizando o enriquecimento da população bacteriana em extrato de folhas de goiabeira seguido de imunodifusão radial dupla. Um antissoro foi produzido contra a estirpe tipo da bactéria IBSBF 435 (ICMP 8426, NCPPB 3555), avaliado quanto à eficiência e especificidade e utilizado na determinação dos limiares de detecção da mesma. O antissoro As15-1 reagiu positivamente com todos as estirpes testadas de *E. psidii*, não reagindo com estirpes de outros gêneros e espécies de bactérias fitopatogênicas e apresentou reação cruzada com dois isolados não patogênicos da flora da goiabeira. O crescimento da população bacteriana no extrato de folhas foi observado após 12 h de incubação a partir de populações iniciais de 10^3 , 10^5 e 10^7 ufc/mL, até 60 h. A partir de 12 h, já foi possível detectar *E. psidii* por enriquecimento e imunodifusão radial nas amostras com populações iniciais de 10^7 ufc/mL e a partir de 36 h, detectou-se a bactéria mesmo em amostras com populações iniciais de 10^3 ufc/mL. Considerando a possibilidade de falsos positivos, é recomendável associar outros métodos diagnósticos ao método aqui proposto.

Palavras-chave: *Psidium guajava*, bacteriose da goiabeira, sorologia, diagnóstico.

ABSTRACT

Detection of *Erwinia psidii* through enrichment in guava leaf extract and double radial immunodiffusion

One of the most important diseases affecting guava production in Brazil is bacterial blight, caused by the bacterium *Erwinia psidii*. Pathogen dissemination often occurs through contaminated propagating plant material. The development of more effective diagnostic methods may reduce pathogen dissemination in the country. Considering the need for a reliable and simple method for detecting the pathogen in plant material, the objectives of this study were to produce *E. psidii*-specific polyclonal antibodies and to develop a detection method using bacterial population enrichment on guava leaf extracts followed by double radial immunodiffusion. The antiserum was produced against the *E. psidii* type strain IBSBF 435 (ICMP 8426, NCPPB 3555) and its efficiency, specificity and sensitivity threshold were determined. The antiserum As15-1 was tested with strains of several plant-pathogenic bacteria and reacted positively with all strains of *E. psidii*, although cross reactions were detected with two non-pathogenic isolates from guava flora. Bacterial multiplication on leaf extracts was observed 12 h after incubation from initial populations of 10^3 , 10^5 and 10^7 ufc/mL, up to 60 h. After 12 h it was already possible to detect *E. psidii* in samples with starting populations of 10^7 cfu/mL. After 36 h, the enrichment technique allowed the detection of *E. psidii* using double radial immunodiffusion in samples with populations as low as 10^3 cfu/mL. Considering the possibility of false positives it is desirable to associate other diagnostic methods with the method proposed in this study.

Keywords: *Psidium guajava*, guava die-back, serology, diagnostic methods.

INTRODUÇÃO

Uma das principais doenças que afetam a produção de goiaba (*Psidium guajava* L.) no Brasil é a bacteriose causada por *Erwinia psidii* Rodrigues Neto *et al.* 1987, conhecida por seca-dos-ponteiros. Esta doença foi relatada,

primeiramente, no Estado de São Paulo (Rodrigues Neto *et al.*, 1987) e estudos posteriores sugerem que foi introduzida em outros estados através de mudas contaminadas assintomáticas (Oliveira *et al.*, 2000; Uesugi *et al.*, 2001; Romeiro *et al.*, 2002). A certificação de mudas de goiabeira é baseada na análise subjetiva das plantas quanto ao aparecimento de sintomas. Entretanto, a análise visual não garante a aquisição de mudas livres do patógeno. Mesmo aparentemente sadias, mudas contaminadas apresentarão sintomas, aproximadamente, dois anos após sua instalação

Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora. Universidade de Brasília. Brasília DF. 2006.

no pomar, tempo necessário para o início da frutificação (Gonzaga Neto *et al.*, 2001).

Um dos fatores que favorece a diagnose preventiva, melhorando a sensibilidade na detecção de fitobactérias é o enriquecimento, o qual consiste em promover a multiplicação das células bacterianas presentes numa amostra por incubação em meios de cultura. Schaad *et al.* (1995) desenvolveram o método denominado Bio-PCR (reação da polimerase em cadeia) para detecção de *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burk.) Gardan *et al.* 1992, em que as amostras foram cultivadas em meio de cultura antes da PCR. Cano & Estrella (1997) confirmaram a confiabilidade e o poder de detecção desse método, identificando o patógeno em uma semente contaminada misturada a um lote de aproximadamente 4.000 sementes sadias. O mesmo princípio foi aplicado para outras fitobactérias como *P. syringae* Van Hall 1902, *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (ex Smith 1908) Gardan *et al.* 1992 e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.* 1978) Willems *et al.* 1992, assim como no estudo de bactérias não fitopatogênicas (Bultreys & Gheysen, 1999; Penyalver *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2004).

Os métodos sorológicos permitem a identificação rápida, simples e precisa de microrganismos, e têm como princípio a união de macromoléculas (anticorpo) ao mesmo tipo de indutor de sua produção (antígeno) (Tortora *et al.*, 2003). Diversas técnicas sorológicas são usadas na detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas (Singh *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Sahin *et al.*, 2003; Yorinori, *et al.*, 2003; Carneiro Jr. *et al.*, 2004), destacando-se ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), imunofluorescência (IF) e imunodifusão radial dupla (ID).

Apesar da simplicidade e rapidez, imunoensaios apresentam algumas desvantagens como: (a) não distinguem entre células viáveis e não viáveis e por isso não identificam o real perigo de disseminação de determinado patógeno; (b) os limiares de detecção são elevados e (c) amostras contendo alta concentração de contaminantes saprofitos podem sofrer interferências devido à competição desses com o patógeno alvo (Saettler *et al.*, 1989).

O método de ID (Ouchterlony, 1958) é realizado em gel de agar ou agarose, onde pode ser observada uma linha de precipitação entre os orifícios, caso haja especificidade entre antígeno e anticorpo. Este método foi utilizado para a detecção de fitobactérias, como *P. syringae* pv. *tabaci* (Wolf & Foster 1917) Young *et al.* 1978 (Alvarez & Marques, 2004; Spitali *et al.*, 2007). Estudos preliminares para a detecção de *E. psidii* através de ID, em mudas assintomáticas de goiabeira, foram realizados por Ribeiro *et al.* (2005).

Considerando a necessidade de se estabelecer um método eficiente e simples para a detecção de *E. psidii*, o presente trabalho teve como objetivo produzir um antissoro específico contra esse patógeno e desenvolver um método de detecção por imunodifusão radial dupla, aumentando a sua sensibilidade pelo enriquecimento em meio natural obtido pela maceração de folhas de goiabeira.

MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta e sete estirpes de *E. psidii* foram utilizadas, sendo 16 provenientes da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo (IBSBF); 26 da coleção de trabalho da Unidade de Bacteriologia, Laboratório de Quarentena Vegetal (LQV) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e cinco da coleção do Laboratório de Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (Tabela 1).

Produção e avaliação de antissoro policlonal anti-*Erwinia psidii*

Um antissoro policlonal foi produzido contra a estirpe tipo de *E. psidii*, IBSBF 435 (ICMP 8426, NCPPB 3555) e avaliado quanto à sua eficiência e especificidade. Para a produção do antissoro, a bactéria foi cultivada em meio sólido 523 de Kado & Heskett (1970), por 48 h a 28 °C. Dessa cultura, foi preparada a suspensão-antígeno a $\pm 10^8$ ufc/mL, cuja concentração foi ajustada pela medida da transmitância. Foi injetado 1,0 mL da suspensão bacteriana acima descrita, fixada com formol a 0,5%, emulsificada com 1,0 mL de adjuvante de Freund (15% de Mamide monoleate e 85% de óleo de parafina) em coelhos de três meses, da raça Nova Zelândia. Foram realizadas quatro aplicações intramusculares na coxa posterior do coelho, a intervalos de sete dias entre aplicações. Para a primeira aplicação utilizou-se o adjuvante completo, que contém BCG (vacina, linhagem avirulenta do bacilo da tuberculose), com o intuito de estimular uma resposta mais rápida do sistema imunológico do animal e, para as aplicações seguintes, o adjuvante incompleto, sem BCG.

A sangria na veia marginal da orelha do coelho foi realizada para avaliação do título do antissoro, sete dias após a última injeção, de acordo com protocolo de Ausubel *et al.* (1999). O antissoro foi diluído em solução salina tampão fosfato (PBS), nas proporções de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64, e avaliado pelo método de imunodifusão radial dupla. Sobre uma lâmina de microscopia, foi preparada camada de agarose a 1% em PBS com azida sódica (1%), com 2 mm de espessura, aproximadamente. Após solidificação foram feitos furos radiais com o auxílio de uma roseta de aço inox. No furo central foram colocados 20 μ L da suspensão bacteriana da estirpe tipo a uma concentração maior que 10^8 ufc/mL e nos furos periféricos foram colocados 20 μ L do antissoro produzido (designado As15), na ordem crescente das diluições. As lâminas foram mantidas em câmara úmida por 24 h para se verificar a formação de bandas de precipitação pela reação antígeno-anticorpo.

Após a obtenção do título satisfatório do antissoro, o sangue foi coletado em frasco de vidro (± 40 mL), mantido por uma hora a temperatura ambiente e aquecido a 37°C por 30 min, após o coágulo ter sido descolado das paredes laterais do frasco. Em seguida, foi mantido sob refrigeração (4°C) por 12-18 h. Após esse período, o soro foi aspirado e centrifugado a 6.000 g por 15 min, descartando-se o coágulo.

TABELA 1 - Designação, origem e reação ao antissoro As15-1 por imunodifusão radial dupla das estirpes de *Erwinia psidii* utilizadas neste estudo

| Estirpe | Procedência | Ano de coleta | ID ^a |
|--|-------------------------------------|---------------|--------------------|
| IBSBF ^b 435 ^c , 446 ^d | Valinhos – SP | 1982 | + ^e , + |
| IBSBF 453, 454, 452 | Valinhos – SP | 1983 | +, +, + |
| IBSBF 493 | Itariri – SP | 1984 | + |
| IBSBF 954 | SP | 1992 | + |
| IBSBF 1347 | Brazlândia – DF | 1997 | + |
| IBSBF 1461 | Urupês – SP | 1999 | + |
| IBSBF 1480 | Santa Tereza – ES | 2000 | + |
| IBSBF 1523 | Carlopolis – PR | 2000 | + |
| IBSBF 1574 | SP | 2001 | + |
| IBSBF 1575 (Emb.A 18-7 ^e) | Brazlândia – DF | 2000 | + |
| IBSBF 1576 (Emb.B 67-1) | Brazlândia – DF | 2001 | + |
| IBSBF 1577 (Emb.B 74-1) | Brazlândia – DF | 2001 | + |
| IBSBF 1579 (Emb.B 78-1) | Brazlândia – DF | 2001 | + |
| Emb.C 75-1, 76-1, 82-1 | Brazlândia – DF (Propriedade 1) | 2002 | +, +, + |
| Emb.C 133-1, 134-1, 140-1, 142-2 | Brazlândia – DF (Propriedade 2) | 2002 | +, +, +, + |
| Emb.C 148-2, 150-1, 151-2, 153-1 | Brazlândia – DF (Propriedade 3) | 2002 | +, +, +, + |
| Emb.C 294-1, 295-3, 296-1, 299-3 | Brazlândia – DF (Propriedade 4) | 2002 | +, +, +, + |
| Emb.C 338-2, 339.1, 342-1, 343-2, 345-2 | Brazlândia – DF (Propriedade 5) | 2002 | +, +, +, +, + |
| Emb.C 400-3 | Brazlândia – DF (Propriedade 6) | 2002 | + |
| Emb.C 421-2, 424-1, 432-1, 435-2, 439-3 | Brazlândia – DF (Propriedade 7) | 2002 | +, +, +, +, + |
| UnB ^f 1285, 1286 | Brazlândia – DF (Propriedade 9) | 2004 | +, + |
| UnB 1287 | Brazlândia – DF (Propriedade 2) | 2005 | + |
| UnB 1288 | Brazlândia – DF (Propriedade 11) | 2005 | + |
| UnB 1289 | Brazlândia – DF (Propriedade 12) | 2005 | + |

^aReação de imunodifusão radial dupla em agarose, utilizando-se o antissoro A15-1; ^bColeção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo; ^cestirpe tipo; ^dReisolamento da estirpe tipo IBSBF 435; ^eColeção de Fitobactérias: Laboratório de Quarentena vegetal - Unidade de Bacteriologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; ^fUniversidade de Brasília, Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Departamento de Fitopatologia; ^gReação de imunodifusão positiva, com a formação de banda de precipitação.

O sobrenadante foi colocado em um frasco esterilizado, adicionando-se azida sódica para uma concentração final de 0,025%. Ao antissoro foi acrescentada glicerina na proporção 1:1 e estocado sob refrigeração (4°C). O material dessa última coleta foi designado As15-1, não sendo misturado ao da primeira coleta (titulação).

A especificidade do antissoro foi determinada frente a 47 estirpes de *E. psidii* (Tabela 1) e 10 estirpes de outros gêneros e espécies de bactérias fitopatogênicas: *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Emb.A 226-1), *A. avenae* subsp. *citrulli* (Aac 1-12), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (CBCEN 10), *Pectobacterium carotovorum*

subsp. *carotovorum* (Emb.A 243-1), *Erwinia* sp. (Emb. A 12-5, isolada de milho), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Emb.C 478), *P. syringae* pv. *tomato* (CNPH 45), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Emb.A 62-6), *X. axonopodis* pv. *sesami* (Emb.C 333-1) e *X. campestris* pv. *campestris* (Emb.C 481-1). Além disso, testou-se também o antissoro frente a 10 isolados bacterianos saprofíticos da flora natural da goiabeira, obtidos de folhas, pedúnculos de frutos mumificados ou da extremidade dos brotos de goiabeira. Embora não tenham sido identificados, esses isolados não se mostraram patogênicos à goiabeira. Para os ensaios com ID, utilizou-se o método descrito acima, mas posicionando-se

o antissoro no orifício central e as suspensões bacterianas nos orifícios periféricos. A estirpe tipo (IBSBF 435) foi regularmente usada como controle positivo e PBS como controle negativo.

Determinação dos limiares de detecção de *Erwinia psidii*

O enriquecimento bacteriano foi conduzido em extrato de folhas de goiabeira da cv. Paluma. Folhas jovens (1 g), obtidas de mudas sadias mantidas em casa de vegetação, foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados, recebendo 3,5 mL das suspensões bacterianas em diferentes concentrações. As folhas foram levemente esmagadas com pistilo de cerâmica, com o intuito de permitir que a suspensão bacteriana entrasse em contato com o extrato das mesmas. As temperaturas de incubação foram 29 a 31°C durante o dia e 26 a 27°C durante a noite. Foram realizadas quatro repetições, para cada tratamento, os quais corresponderam às concentrações de inóculo de $\pm 10^7$, 10^5 e 10^3 ufc/mL. Utilizou-se 250 μ L da mistura suspensão bacteriana-extrato de folhas para a diluição seriada e o plaqueamento em meio sólido 523. A estimativa da evolução populacional de *E. psidii* no extrato das folhas de goiabeira foi realizada durante 60 h, a intervalos de 12 h. Nos mesmos intervalos, o limiar de detecção por imunodifusão radial dupla foi determinado, conforme descrito anteriormente, utilizando-se 20 μ L da mistura suspensão-extrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um antissoro policlonal específico para *E. psidii* foi produzido, usando-se como antígeno a estirpe tipo (IBSBF 435). O título obtido, de 1:16 da concentração original, foi satisfatório para o método de imunodifusão radial dupla (Figura 1A).

Submetido ao teste de especificidade, o antissoro, identificado como As15-1, apresentou reação antígeno-antissoro positiva para a estirpe tipo, assim como para as demais estirpes de *E. psidii*, previamente identificadas e usadas como referência (Tabela 1). Não houve reação com

as estirpes de fitobactérias de outros gêneros, espécies ou patovares testados (Figura 1B). Entretanto, houve reação cruzada com dois isolados saprofiticos da flora bacteriana da goiabeira, indicando a presença de epitopos em comum. As reações cruzadas são freqüentes com antissoros policlonais (Trigalet *et al.*, 1978) e, embora possam produzir resultados falso-positivos, não invalidam o diagnóstico, sobretudo quando mais de uma técnica é usada para um diagnóstico conclusivo.

A ID é um método simples e rápido, mas pouco sensível para uso rotineiro em detecção de fitobactérias, pois é necessária uma concentração elevada da bactéria alvo para que a reação seja visível. Estudos preliminares, utilizando enriquecimento aliado à sorologia para detecção, foram realizados por Ribeiro *et al.* (2005), quando se verificou que a multiplicação de *E. psidii* em folhas de goiabeira esmagadas possibilitava sua detecção através de ID. Contudo, a população final detectável não foi quantificada.

As populações bacterianas e os resultados da ID a cada intervalo de 12 h (Tabela 2) e a curva do crescimento bacteriano no extrato das folhas durante 60 h (Figura 2) são apresentadas. Nenhum dos tratamentos apresentou reação sorológica positiva no T0 (tempo zero). A partir de 12 h, já foi possível detectar *E. psidii* nas amostras com populações iniciais de 10^7 ufc/mL. Neste tratamento foi observado crescimento bacteriano em todas as repetições, as quais atingiram concentração de 10^8 ufc/mL, com 25% de resultado positivo para ID. Para os demais tratamentos, após 12 h de incubação, houve crescimento bacteriano, mas não houve detecção por ID. Entretanto, a partir de 36 h, detectou-se a bactéria mesmo nas amostras com populações iniciais de 10^3 ufc/mL.

De acordo com os resultados obtidos, se a contaminação de materiais de propagação a serem examinados correspondesse a uma população inicial de *E. psidii* de 10^7 ufc/g de tecido, seria possível a detecção da bactéria em 25% das amostras dentro de 12 h e após 36 h seria possível concluir o diagnóstico. Se a contaminação dos materiais fosse de 10^5 ufc/g de tecido, a detecção da bactéria

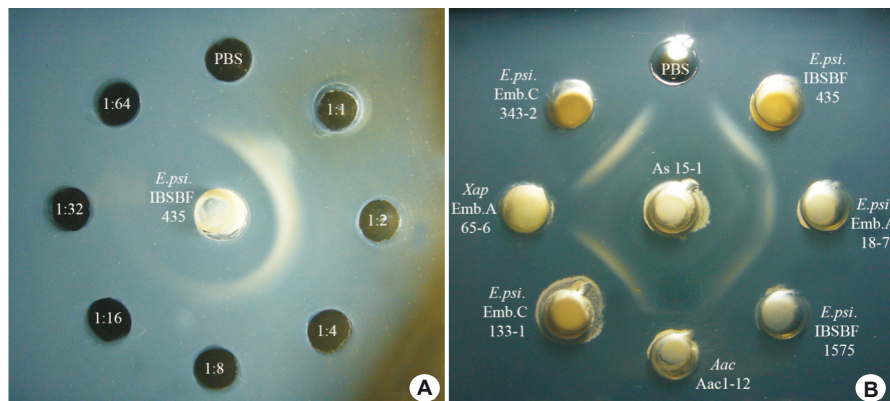
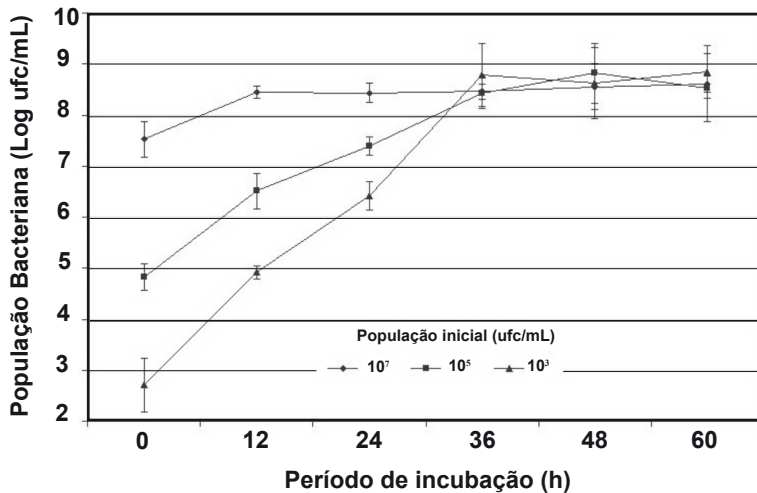


FIG. 1 - Teste de imunodifusão radial dupla para avaliação do antissoro As15, produzido para identificação de *Erwinia psidii*: A – titulação do antissoro com a bactéria homóloga (IBSBF 435), onde os valores nos poços periféricos representam a diluição do antissoro; B – avaliação da especificidade do antissoro, observando-se a banda de precipitação (reação positiva) para as estirpes de *E. psidii* (*E. psi.*) e ausência de reação com estirpes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*), *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (*Aac*) e com o controle negativo (PBS).

TABELA 2 - Crescimento populacional de *Erwinia psidii* (estirpe Emb.A 18-7) a partir de diferentes concentrações iniciais, em extrato de folhas de goiabeira e limiares de detecção da bactéria por imunodifusão radial dupla

| Concentração inicial (ufc/mL) | Tempo (h) | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------------------------|-----------------|---------------------|----|---------------------|----|---------------------|-----|---------------------|-----|---------------------|-----|
| | 0 | | 12 | | 24 | | 36 | | 48 | | 60 | |
| | População ¹ | ID ² | População | ID | População | ID | População | ID | População | ID | População | ID |
| 10 ⁷ | 3,3x10 ⁷ | 0 | 2,8x10 ⁸ | 25 | 2,7x10 ⁸ | 75 | 2,9x10 ⁸ | 100 | 3,6x10 ⁸ | 100 | 4,0x10 ⁸ | 100 |
| 10 ⁵ | 6,7x10 ⁴ | 0 | 3,2x10 ⁶ | 0 | 2,4x10 ⁷ | 25 | 2,7x10 ⁸ | 75 | 6,6x10 ⁸ | 75 | 3,4x10 ⁸ | 75 |
| 10 ³ | 5,2x10 ² | 0 | 8,3x10 ⁴ | 0 | 2,6x10 ⁶ | 0 | 6,2x10 ⁸ | 50 | 4,2x10 ⁸ | 50 | 7,1x10 ⁸ | 75 |

¹População bacteriana (ufc/mL), média de quatro repetições; ²Porcentagem de repetições com resultado positivo para imunodifusão radial dupla em gel de agarose.

**FIG. 2** - Crescimento populacional de *Erwinia psidii* em extrato de folhas de goiabeira maceradas, durante o período de 60 h. Cada ponto representa a média das quatro repetições e as barras verticais representam o erro padrão da média.

se daria após 24 h de incubação em 25% dos casos. Com um nível de contaminação de 10³ ufc/g de tecido, as primeiras reações positivas em ID ocorreriam após 36 h.

A concentração da suspensão bacteriana reativa com o anticorpo anti-*E. psidii* esteve sempre em torno de 10⁸ ufc/g de tecido (75% das reações positivas). Observa-se, entretanto, que em algumas repetições, as suspensões apresentando igual concentração não apresentaram reação positiva em ID, o que evidencia a possível ocorrência de falsos negativos. Por outro lado, houve reação positiva de uma suspensão a 10⁵ ufc/mL após 60 h. Como as técnicas moleculares e sorológicas podem detectar tanto células viáveis quanto não viáveis (Saettler *et al.*, 1989, Theodoro & Maringoni, 2002) é possível que, nesse caso, um certo número de células tivesse perdido a viabilidade.

As divergências observadas para a reação de ID, com suspensões de mesma concentração, podem ser explicadas pela inibição da reação por substâncias presentes no extrato das folhas. O esmagamento de tecidos pode provocar a liberação

de substâncias que possuam atividade antimicrobiana, sendo que em folhas de goiabeira há relato de uma atividade moderada contra bactérias gram- negativas (Nair & Chanda, 2007). É possível que, depois de 48 h, houvesse no extrato de folhas, maior concentração de substâncias derivadas da degradação das mesmas, como o quinino, que poderia interferir na reação antígeno-anticorpo.

Pode-se concluir que, independente do nível de contaminação, *E. psidii* pode ser detectada em material vegetativo de goiabeira no intervalo de 36 a 60 h por ID após enriquecimento, período em que a maioria das populações, foi reativa com o antissoro policlonal produzido contra a bactéria. Entretanto, a possibilidade de falsos positivos deve ser considerada, tendo em vista as reações cruzadas observadas com dois isolados bacterianos da flora da goiabeira. Assim, é recomendável a utilização de mais de um método para confirmação dos resultados. Por outro lado, ao final das 60 h de análise, a porcentagem de detecção por ID permaneceu em torno de 75% em dois dos tratamentos.

Nesses casos, acredita-se que um período maior de incubação poderia resultar na detecção da bactéria em 100% das amostras, reduzindo significativamente a ocorrência de falsos negativos.

A disponibilização de um método simples e rápido, que possa ser usado em laboratórios pouco equipados, é vantajosa. O método de enriquecimento bacteriano em extrato de folhas de goiabeira aliado à imunodifusão radial dupla, reúne rapidez e baixo custo. Com o aumento da população pelo enriquecimento, a baixa sensibilidade da ID é contornada, podendo ser utilizada na análise de mudas, caso sejam portadoras de *E. psidii* em baixas concentrações (10^3 ufc/mL). Apesar desse aporte na redução do limiar de detecção da ID, o processo pode ser melhorado pela purificação do antissoro e os falsos negativos podem ser reduzidos pelo uso concomitante de outros métodos para diagnose, além de modificações no preparo do extrato de folhas, visando reduzir a ação de possíveis inibidores.

Os resultados obtidos no presente estudo poderão ser utilizados por técnicos da Defesa Vegetal para a certificação de viveiros. Isto contribuiria, certamente, para a redução da disseminação da bactéria para novos pomares, outros estados ou regiões produtoras de goiaba no Brasil, como a região Nordeste que, até o momento, encontra-se livre da doença. Da mesma forma, o desenvolvimento de outras ferramentas, tais como as moleculares, contribuirão para maior eficiência da diagnose precoce da seca-dos-ponteiros.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de Mestrado à primeira autora; a Joaniece P.S. Damasceno e Alexandre P. Mendes, do Laboratório de Quarentena Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por sua valiosa colaboração na execução dos experimentos; ao Dr. Júlio Rodrigues Neto, curador da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo (IBSBF) e ao Professor Carlos H. Uesugi, do Departamento de Fitopatologia da UnB, pela cessão das estirpes; ao Paulo Augusto C. Marinho e Wesley R. Souza, pela edição das imagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez E, Marques ASA (2003) Caracterização molecular, sorológica e nutricional de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* provenientes de fumo, feijão e soja: desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico do fogo selvagem. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 52.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1999) Short protocols in molecular biology. 4th Ed. John Wiley & Sons Inc.
- Bultreys A, Gheysen I (1999) Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. Applied and Environmental Microbiology 65:1904-1909.
- Cano GM, Estrella LH (1997) A simple and efficient PCR method for the specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seeds. World Journal of Microbiology & Biotechnology 13:463-437.
- Carneiro Junior JB, Silveira SF, Souza Filho GA, Olivares FL, Giglioti EA (2004) Especificidade de anti-soro policlonal a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Fitopatologia Brasileira 29:614-619.
- Ghosh M, Verma SC, Mengoni A, Tripathi AK (2004) Enrichment and identification of bacteria capable of reducing chemical oxygen demand of anaerobically treated molasses spent wash. Journal of Applied Microbiology 96:1278-1286.
- Gonzaga Neto L, Soares JM, Teixeira AHC, Moura MSB (2001) Goiaba: produção – aspectos técnicos. Petrolina, PE. Embrapa Semi-Árido, Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica (Frutas do Brasil, 17).
- Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976.
- Lee IM, Lukaesko LA, Maroon CJM (2001) Comparison of Dig-labeled PCR, Nested PCR, and ELISA for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field-grown potatoes. Plant Disease 85:261-266.
- Nair R, Chanda S (2007) *In-vitro* antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. Brazilian Journal of Microbiology 38:452-458.
- Oliveira JR, Ventura JA, Silva IT, Costa H (2000) Ocorrência da bacteriose da goiabeira, causada por *Erwinia psidii*, no Estado do Espírito Santo. Fitopatologia Brasileira 25(Supl):328.
- Ouchterlony O (1958) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progress Allergy 5:1-78.
- Penyalver R, Garcia A, Ferrer A, Bertolini E, Lopez MM (2000) Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. Applied and Environmental Microbiology 66:2673-2677.
- Ribeiro RG, Melo LA, Santos JP, Mendes AP, Martins OM, Marques ASA (2005) Avaliação preliminar de técnicas sorológicas na detecção de *Erwinia psidii* em mudas de goiabeiras assintomáticas. Fitopatologia Brasileira 30(Supl):57.
- Rodrigues Neto J, Robbs CF, Yamashiro TA (1987) A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. Fitopatologia Brasileira 12:345-350.
- Romeiro RS, Batista UG, Barbosa JG & Rodrigues Neto J 2002 Situação e perspectivas de controle da morte das pontas da goiabeira (*Erwinia psidii*) em Minas Gerais - Relato de um caso. Revista Ceres 49:329-334.
- Saettler AW, Schaad NW, Roth DA (1989) (Eds.) Detection of bacteria in seed and other planting material. Saint Paul MN. APS Press.
- Sahin F, Abbasi PA, Ivey MLL, Zhang J, Miller SA (2003) Diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis* from lettuce. Phytopathology 93:64-70.
- Schaad NW, Cheong SS, Tamaki S, Hatziloukas E, Panopoulos NJ

(1995) A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85:243-248.

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

Spitali M, Smith ARW (2007) Structure of the lipopolysaccharide side chain of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* strain NCPPB 79 (=CFBP1615), in relation to O-serogroup. *Journal of Phytopathology* 155:1-7.

Theodoro GF, Maringoni AC (2002) Sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em maniveira sob condições ambientais.

Pesquisa Agropecuária Brasileira 37:945-953.

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

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

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

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

Recebido 18 Agosto 2007 - Aceito 14 Maio 2008 - TPP 7089

Editor Associado: Valmir Duarte