

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

SOBREVIVÊNCIA DE *ERWINIA PSIDII* EM CONDIÇÕES DE FILOPLANO,  
SOLO E RESTOS FOLIARES DE EUCALIPTO

Fabiane Laís Bieler  
Engenheiro Agrônomo/UFPR

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de  
Mestre em Fitotecnia  
Área de Concentração Sanidade vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Abril de 2020

CIP - Catalogação na  
Publicação

Bieler, Fabiane Laís  
Sobrevivência de *Erwinia psidii* em condições de  
filoplano, solo e restos foliares de eucalipto /  
Fabiane Laís Bieler. -- 2020.  
59 f.  
Orientador: Roberto Lanna Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2020.

1. Fitotecnia. 2. Fitopatologia. 3. Bacteriologia.  
I. Lanna Filho, Roberto, orient. II. Título.

FABIANE LAÍS BIELER  
Engenheira Agrônoma - UFPR

## **DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **MESTRA EM FITOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 27.04.2020  
29.04.2021  
Pela Banca Examinadora

Homologado em:  
Por

ROBERTO LANNA FILHO  
Orientador - PPG Fitotecnia  
de  
UFRGS  
Fitotecnia

CHRISTIAN BREDEMEIER  
Coordenador do Programa  
Pós-Graduação em

LAURI LOURENÇO RADÜNZ  
PPG Fitotecnia/UFRGS

JOSÉ ANTÔNIO MARTINELLI  
PPG Fitotecnia/UFRGS

EDSON BERTOLINI  
PPG Fitotecnia/UFRGS

YULIET FRANCO CARDOZA  
Laboratório Agrônômica

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela oportunidade e coragem dados a mim.

Agradeço aos meus pais, Guni e Rita e irmãos, Cristina e Renato por não medirem esforços por mim e por sempre me incentivarem a busca pelo conhecimento.

Agradeço ao meu namorado André por estar sempre do meu lado. Sempre me apoiando e dando força quando eu não conseguia mais fazer por mim mesma. Muito obrigada por todo o suporte e amor.

Agradeço ao meu orientador, Roberto Lanna Filho, por me auxiliar na busca do título de Mestre e por todo conhecimento a mim transmitido.

Agradeço ao professor Edson, e demais professores e técnicos do Departamento de Fitossanidade por todo conhecimento, amizade e inspiração que compartilhamos neste período.

Agradeço à UFRGS, PPG Fitotecnia e CAPES por possibilitarem a minha formação acadêmica.

Agradeço aos colegas de pós-graduação e graduação pelo companheirismo, principalmente Flávia e Indianara.

E por último, agradeço a Stella e Eddie por toda gentileza e amor.

# **SOBREVIVÊNCIA DE *Erwinia psidii* EM CONDIÇÕES DE FILOPLANO, SOLO E RESTOS FOLIARES DE EUCALIPTO<sup>1</sup>**

Autora: Fabiane Laís Bieler

Orientador: Professor Roberto Lanna Filho

## **RESUMO**

A seca-de-ponteiros do eucalipto, causada por *Erwinia psidii*, é uma das doenças mais importantes da eucaliptocultura. No entanto, não há estudos da sobrevivência do patógeno sobre possível comportamento epifítico ou saprofítico. Assim, esse estudo teve como objetivo geral monitorar o período de sobrevivência da fitobactéria *E. psidii* em condições epifíticas, de solo e restos foliares. A CR01R (*E. psidii* resistente à rifampicina) foi isolada de folhas jovens com anasarca e necrose da nervura central. O mutante foi obtido pelo método da placa gradiente por crescimento espontâneo a 100 mg L<sup>-1</sup> de rifampicina. A estabilidade do mutante foi testada por repicagens sucessivas em meio 523 com e sem antibiótico. Em adição, a CR01R foi comparada à estirpe CR01, quanto à patogenicidade, agressividade e crescimento. No filoplano, células vivas da CR01R foram inoculadas sobre os clones 32864 e 37350 de eucalipto. A população fitobacteriana foi monitorada semanalmente. A sobrevivência da fitobactéria foi monitorada em solo esterilizado (SE) e não-esterilizado (SNE), após infestação artificial por rega. Em restos foliares, folhas destacadas dos clones foram inoculadas com a CR01R e, após sintomas, picotadas e colocadas dentro de sacos de nylon. Em seguida, depositadas sobre SE e SNE, bem como nos estratos de 5 e 15 cm. Em todos os ensaios, a quantificação da população fitobacteriana foi determinada pela contagem da UFC g<sup>-1</sup>/cm<sup>-1</sup> de tecido foliar/solo/restos foliares, mediante diluição seriada e semeadura em meio 523 suplementado com rifampicina e azoxistrobina. Os resultados mostraram que, em filoplano dos clones 37350 e 32864, células vivas da CR01R foram detectadas até 30 e 60 dias, respectivamente. Em SNE e SE a CR01R sobreviveu até os 5 e 120 dias, respectivamente. Em restos foliares, a CR01R foi detectada em todos os estratos do SE e SNE em até 120 e 180 dias, respectivamente. Em todos os ensaios supracitados, quando a CR01R não foi detectada em meio de cultura, a confirmação se deu pelo uso da PCR com *primers* específicos. Os estudos demonstraram que, a fitobactéria pode sobreviver por dias ou meses na ausência do hospedeiro e servir como fonte de inóculo para o incremento ou introdução do patógeno em florestas com a presença ou ausência da doença.

---

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (59f.) Abril, 2020.

# **SURVIVAL OF *Erwinia psidii* IN PHYLLOPLANE, SOIL AND EUCALYPTUS DEBRIS CONDITIONS<sup>1</sup>**

Author: Fabiane Laís Bieler

Adviser: Professor Roberto Lanna Filho

## **ABSTRACT**

*Erwinia psidii* is an airborne bacterium causal agent of eucalyptus bacterial blight in Brazil. However, there are no studies on the survival of the pathogen under endophytic or saprophytic conditions. Therefore, the aim of this study was to obtain a rifampicin-resistant *E. psidii* CR01 strain and to determine the survival of the pathogen under phylloplane, soil and eucalyptus debris conditions. The CR01 strain was isolated from young leaves with water-soaking and midrib necrosis. Rifampicin-resistant mutant (CR01R) was obtained by the gradient plate method by spontaneous growth at 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  of rifampicin. Mutant stability was tested by successive subcultures on 523-medium with and without rifampicin. In addition, the CR01 and CR01R strains were compared for pathogenicity, aggressiveness and growth. On the phylloplane of 32864 and 37350 clones, the mutant was inoculated. The bacterial population were monitored weekly. Phytobacteria survival was also monitored in sterile (SS) and non-sterile (NS) soil, after artificial infestation by irrigation. In the leaf debris study, leaves from 37350 and 32864 clones were inoculated with CR01R and, after symptoms, cut and put in nylon bags. Afterwards, it were put above SS and NS, well as 5 and 15cm depth. In all studies, bacterial population size was estimated from plate counts made after 2 to 3 days' incubation at 28 °C and expressed as CFU g<sup>-1</sup> leaf tissue/soil/ leaf debris, by means of serial dilution and plating on 523-medium supplemented with rifampicin and azoxystrobin. The results showed that on phylloplane of 37350 and 32864 clones, live cells from CR01R strain were detected up to 30 and 60 days, respectively. In NS and SS soil, CR01R survived up to 5 and 120 days, respectively. In eucalyptus leaf debris, the CR01R strain was recovered on the soil surface or buried 5 or 15 cm deep under SS and SN conditions up to 120 and 180 days, respectively. In all studies, samples were discontinued after the CR01R strain was not recovered. An analysis by PCR using specific-primers was performed to confirm the result. Studies have shown that *E. psidii* can survive for days or months on absence of the host. Notably, it can serve as a primary inoculum of dieback disease for the increase or introduction of dieback disease on forests with the presence or absence of the pathogen.

---

<sup>1</sup>Master Dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (59p.) April, 2020.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 <i>Erwinia psidii</i> .....	4
2.2 A cultura do eucalipto .....	5
2.3 Sobrevivência saprofítica de fitobactérias da parte aérea .....	7
2.4 Terminologia.....	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
3.1 Isolamento e preservação da fitobactéria .....	14
3.2 Obtenção do mutante CR01R .....	15
3.3 Curva de Crescimento bacteriano .....	15
3.4 Teste de patogenicidade .....	16
3.5 Teste de agressividade.....	16
3.6 Sobrevivência epifítica.....	17
3.7 Sobrevivência em solo.....	17
3.8 Sobrevivência em restos foliares .....	19
3.9 Análise estatística.....	20
4 RESULTADOS.....	21
4.1 Comportamento e característica do mutante CR01R .....	21
4.2 Teste de patogenicidade e agressividade .....	23
4.3 Sobrevivência em filoplano.....	24
4.4 Sobrevivência em solo.....	25
4.5 Sobrevivência em restos foliares .....	26
5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÕES.....	36
7 REFERÊNCIAS .....	38
8 ANEXO .....	48

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

<p>FIGURA 1. Colônias de <i>E. psidii</i> da estirpe selvagem (CR01) e mutante (CR01R) sobre meio 523. Colônias com pigmentação esbranquiçada, superfície brilhante, bordos lisos e aspecto mucoide. (Magnitude = 1 cm). .....</p>	22
<p>FIGURA 2. Curva de crescimento das fitobactérias <i>Erwinia psidii</i> selvagem CR01 e mutante CR01R em meio líquido 523. O triângulo cheio (▲) e vazio (Δ) representam as estirpes selvagem e mutante, respectivamente.....</p>	22
<p>FIGURA 3. Patogenicidade da <i>Erwinia psidii</i> CR01 (selvagem) e CR01R (mutante) em folhas de <i>Eucalyptus saligna</i>. Sintomas típicos de anasarca no limbo foliar e escurecimento da nervura principal. (Magnitude = 1 cm). .....</p>	23
<p>FIGURA 4. Comparação do desenvolvimento da lesão na nervura central de folhas destacadas do clone 37350 (<i>E. urophylla</i> × <i>E. globulus</i>), após inoculação das <i>Erwinia psidii</i> CR01 (—) e CR01R (---). O triângulo cheio (▲) e vazio (Δ) representam as estirpes selvagem e mutante, respectivamente.....</p>	24
<p>FIGURA 5. População da <i>Erwinia psidii</i> CR01R sobre o filoplano dos clones 32864 (resistente) e 37350 (suscetível). Sobrevivência por 60 dias da fitobactéria sobre o filoplano do clone 32864 (A). Sobrevivência por 30 dias da fitobacteriana sobre o filoplano do clone 37350 (B). .....</p>	25
<p>FIGURA 6. População da <i>Erwinia psidii</i> CR01R em solo esterilizado e não-esterilizado. Sobrevivência por 120 dias da estirpe CR01R em condições de solo esterilizado (A). Em condições de solo não-esterilizado a estirpe CR01R sobreviveu por apenas cinco dias (B).....</p>	26
<p>FIGURA 7. Persistência da <i>Erwinia psidii</i> CR01R em restos foliares do clone 32864 em solo esterilizado e não-esterilizado. População da estirpe CR01R em amostras de restos foliares sobre (A) e sob [5 e 15 cm (B e C) ] o solo esterilizado, bem como sobre (D) e sob [5 e 15 cm (E e F)] o solo não-esterilizado. ....</p>	28
<p>FIGURA 8. Sobrevivência da população da <i>Erwinia psidii</i> CR01R em restos foliares do clone 35370 em solo esterilizado. Declínio da população fitobacteriana em solo esterilizado nas profundidades 0cm (A), 5cm (B) e 15cm (C), e solo não esterilizado nas profundidades 0cm (D), 5cm (E) e 15cm (F). .....</p>	31



## 1 INTRODUÇÃO

A área plantada de eucalipto no Brasil corresponde à 70% da produção da silvicultura, com produção média de  $36 \text{ m}^3\text{ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ . A cultura é utilizada como material para a indústria moveleira, metalúrgica, energética dentre outros, gerando uma renda de aproximadamente R\$ 7,0 bilhões. Além disso, a cadeia produtiva do eucalipto emprega direta e indiretamente 2,7 milhões de pessoas (IBA, 2019). Embora a eucaliptocultura tenha papel importante na geração de empregos, há uma grande perda na produção devido à diversos fatores, entre eles os danos causados por doenças (Carvalho *et al.*, 1998; Wingfield *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2018).

A seca-de-ponteiros é uma das doenças emergentes mais importantes da eucaliptocultura e tem proporcionado perdas em genótipos comerciais, na ordem de 10-30% (informação pessoal de Norton Borges Junior). Causada por *Erwinia psidii* Rodrigues Neto, Robbs & Yamashiro, a fitobactéria tem promovido surtos epidêmicos em florestas de eucalipto no estado do Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul em diferentes genótipos elites. A doença foi reportada pela primeira vez em espécies de *Eucalyptus* em 2011 na Argentina e Uruguai (Coutinho *et al.*, 2011), porém no Brasil foi descrita somente a partir de 2014 (Arriel *et al.*, 2014). A fitobactéria acomete

principalmente os meristemas primários dos ramos, brotações e folhas novas (Coutinho *et al.*, 2011; Arriel *et al.*, 2014). No xilema, pode mover para partes distantes do local de infecção. Além disso, adjacente aos vasos xilemáticos, os tecidos parenquimáticos e esclerenquimáticos também são colonizados pelo patógeno (Montoya-Estrada *et al.*, 2019).

Um programa de combate à seca-de-ponteiros depende da compreensão do ciclo de vida da fitobactéria. Como patógeno da parte aérea, não há estudos que atestam a habilidade da *E. psidii* em sobreviver na ausência do hospedeiro. Não raro, fitobactérias autóctones de órgãos aéreos podem sobreviver por um longo período na ausência do hospedeiro (Graham *et al.*, 1989; Arnaud-Santana *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 1991; Hildebrand *et al.*, 2001; Lamichhane & Varvaro, 2013, Marques & Samson, 2016).

A carência de estudos sobre a natureza saprofítica da fitobactéria impossibilita traçar estratégias eficientes para mitigar a doença em florestas plantadas ou prevenir a disseminação para áreas indenes. Isto porque a persistência de células bacterianas viáveis no solo, em restos culturais ou filoplano podem sustentar a presença de inóculo no ambiente ou sobre o hospedeiro. Notadamente, a compreensão do período de sobrevivência da *E. psidii* nas condições supracitadas, muito mais do que desvendar fases importantes do ciclo de vida da fitobactéria, possibilita empregar medidas adequadas de controle. Certamente, proporcionando reduzir os impactos causados pelo patógeno às espécies ou híbridos de eucalipto comerciais.

Em vista disso, esse estudo teve como objetivo geral monitorar o período de sobrevivência da fitobactéria *Erwinia psidii* em condições epifíticas, de solo e restos foliares. E, como objetivos específicos, obter um mutante de

*E. psidii* resistente ao antibiótico rifampicina (CR01R) com crescimento, patogenicidade e agressividade semelhante ao selvagem (CR01), e realizar o monitoramento da população da fitobactéria na superfície foliar de clones de *Eucalyptus* spp., em solo proveniente de florestas plantadas de eucalipto, e em condições de restos foliares na superfície do solo e enterrados nas profundidades de 5 e 15 cm.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Erwinia psidii*

A fitobactéria *Erwinia psidii* Rodrigues Neto, Robbs & Yamashiro pertence à família Enterobacteriaceae, possui características típicas do grupo 'amylovora' ou grupo I, e faz parte de um dos gêneros com maior importância agrônômica (Rodrigues Neto *et al.*, 1987; Paulin, 2000). Gram negativa, anaeróbica facultativa, e não formadora de endósporos, a fitobactéria se move por autopropulsão com flagelos peritricos. As colônias são esbranquiçadas, brilhantes, mucoides, com bordas bem definidas e lisas (Coelho *et al.*, 2002; Baylis, 2006). O tamanho da célula da fitobactéria pode variar entre 0.5 a 1.0 por 1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$  (Hauben *et al.*, 1998; Hauben & Swings, 2005).

*E. psidii* pode habitar o vaso xilemático, bem como os tecidos adjacentes, tais como parênquima e esclerênquima (Montoya-Estrada *et al.*, 2019). O aumento da multiplicação celular, seguida da colonização dos espaços intercelulares é mediado pela síntese das moléculas sinalizadoras (autoindutoras), tais como N-hexanoyl (C6-HSL) e N-heptanoyl homoserine lactone (C7-HSL) (Caires *et al.*, 2019), as quais promovem a comunicação célula-a-célula, nominada de *quorum sensing* (Nagar *et al.*, 2015). O fenômeno estimula a formação de agregados celulares (biofilme) que

desencadeia o aumento de substâncias envolvidas na patogenicidade de bactérias em geral (Damaceno & Farias, 2016; Caires, 2017).

Os sintomas causados pelo patógeno são, necrose e morte das brotações jovens, escurecimento e necrose dos ponteiros em ramos principal e lateral, cancro nas hastes, anasarca adjacente à nervura principal das folhas, que progressivamente evolui para a necrose. A doença é nominada de seca-de-ponteiros por promover a seca do ápice de ramos, seguido de desfolha. Não raro, a morte de plantas de até dois anos de idade pode ser observada no campo (Coutinho *et al.*, 2011; Arriel *et al.*, 2014; Caires *et al.*, 2019) .

## **2.2 A cultura do eucalipto**

*Eucalyptus* spp. é o gênero de árvores mais plantadas no Brasil em florestas cultivadas. Originário da Oceania, principalmente Austrália, o eucalipto pertence à família Myrtaceae e tem ocorrência principalmente no hemisfério sul (Ladiges *et al.*, 2003; Wingfield *et al.*, 2008; Pappas *et al.*, 2015). O eucalipto posicionou o Brasil como o mais produtivo do setor conforme mencionado na seção “Introdução”, além de quarto maior produtor de madeira industrial do mundo (FAO, 2019; IBA, 2019), com uma área de 7,5 milhões de ha de florestas plantadas (IBGE, 2019). O segmento tem um papel importante para a econômica nacional, pois engloba 1,3% do PIB nacional e 6,9% do PIB industrial. Os principais estados produtores são Minas Gerais (24%), São Paulo (17%), Mato Grosso do Sul (16%), Bahia (11%), Paraná (5%) e Rio Grande do Sul (5%) (IBA, 2019). No Brasil, o setor florestal gerou 3,8 milhões de empregos em 2018 (IBA, 2019), e no Rio Grande do Sul,

o setor de silvicultura gerou aproximadamente 368 mil empregos diretos e indiretos em 2017 (AGEFLOR, 2017).

Majoritariamente a produção de eucalipto no Brasil se destina à elaboração de papel e celulose (41%), com menor destinação para a lenha (30%), carvão (17%) e madeira maciça (11%) (Ferraz Filho *et al.*, 2018). Os investimentos públicos em reflorestamento na década de 60 promoveram rápida expansão das plantações de eucaliptos no Brasil (Oda *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2010). As espécies mais plantadas no país são *E. grandis* e *E. urophylla*, com uma estimativa de 80% de toda a produção envolvendo o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* (“urograndis”) (Konzen *et al.*, 2017).

Programas genéticos realizados por empresas privadas e instituições públicas têm desenvolvido genótipos resistentes a diversos patógenos (Paludzyszyn Filho & Santos, 2011; Ferreira *et al.*, 2017). No entanto, os principais genótipos do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, plantados no Brasil, não têm apresentado resistência efetiva contra os patógenos bacterianos. Murchas, manchas-foliares e secas-de-ponteiros são algumas doenças bacterianas que têm causado transtornos à eucaliptocultura (Alfenas *et al.*, 2004), causando menor rendimento e qualidade da madeira.

Notadamente, o emprego de novas matrizes clonais em programas de melhoramento genético pode ajudar no desenvolvimento de clones altamente resistentes às bactérias. No entanto, não se pode dissociar os resultados genéticos às características ecológicas, epidemiológicas e comportamentais das fitobactérias. Isso porque a resistência pode ser facilmente suplantada pelo patógeno, por condições extrínsecas (ambiente e patótipos bacterianos) ao padrão genético da planta.

### 2.3 Sobrevivência saprofítica de fitobactérias da parte aérea

As bactérias do gênero *Erwinia* estão associadas com as plantas como epifíticas, saprófitas e patogênicas (Hauben & Swings, 2005). O maior exemplo do gênero, *Erwinia amylovora*, não tem a capacidade de sobreviver em solo não-esterilizado por mais de cinco semanas após a inoculação (Hildebrand *et al.*, 2001). Porém, em restos culturais como folhas, foi notada a presença da bactéria em até cinco meses após inoculação (Sobiczewski *et al.*, 2014). Santander e Biosca (2017) avaliaram *in vitro* o efeito da temperatura nos processos metabólicos da bactéria, e após 122 dias após inoculação, em temperatura de 4 e 28 °C, foi notado que as bactérias entraram em estado viável mas não cultivável (VBNC). Na temperatura de 14 °C isso não foi observado, o que sugere que esse estado de persistência faça parte do ciclo da *E. amylovora* (Santander & Biosca, 2017), já que é possível recuperar o patógeno em estado de persistência após 30 minutos de exposição ao meio nutritivo (Santander *et al.*, 2012).

Outro gênero relevante na agricultura é o *Xanthomonas*. Este é conhecido por suas espécies que causam doenças como podridão, cancro e manchas foliares (Tonin, 2012). *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) é uma fitobactéria que ocasiona o cancro bacteriano da videira, doença importante no Vale do São Francisco. Segundo pesquisas realizadas, Xcv pode ser detectada até 80 dias em restos culturais na superfície do solo, e apenas 10 dias em restos culturais em compostagem (Silva *et al.*, 2012).

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), uma das espécies mais relevantes desse gênero, possui distribuição mundial e acomete principalmente a família Brassicaceae, importante hortícola com grande

relevância econômica e alimentar (Martins *et al.*, 2018). Essa fitobactéria pode ser encontrada principalmente no filoplano de plantas hospedeiras e restos culturais de plantas cultivadas, não sobrevivendo em solo ou rizosfera de hospedeiros alternativos por muito tempo (Marcuzzo *et al.*, 2009; Silva, 2015; Silva Júnior *et al.*, 2020). Silva (2015) detectou a sobrevivência de *Xcc* por até 70 dias no filoplano de *Raphanus raphanistrum*, 28 dias em rizosfera do mesmo, e por até 7 dias em solo não esterilizado. Silva Júnior *et al.* (2020) detectaram *Xcc* em restos culturais de couve-flor durante 255 dias.

Tal como os dois gêneros descritos acima, o gênero *Pseudomonas* também é conhecido por atacar grande gama de hospedeiros, como por exemplo, plantas de café, pepino, tomate, manga, plantas daninhas e outras. *P. cichorii* sobreviveu 115 dias em restos culturais de pepino em solo não-esterilizado, como reportado por Bazzi *et al.* (1984). Já a *P. syringae* pv. *lachrymans* sobreviveu por 90 semanas em solo irrigado com resto cultural de pepino. Entretanto, em solo seco sem resto cultural, a sobrevivência desse fitopatógeno ocorreu por apenas 8 semanas (Kritzman & Zutra, 1983). *Pseudomonas viridiflava* sobreviveu por 5,5 meses em solo não esterilizado e 8 meses em restos culturais de tomate (Yildiz *et al.*, 2004). Além disso, *P. viridiflava* conseguiu sobreviver por 4 meses em filoplano de tomate e planta daninha (*Physalis subglabrata*) (Mariano & Mccarter, 1993).

Essa habilidade de se manter presente no filoplano ocorre principalmente pela capacidade de agregação de células (biofilme) (Mariano & Mccarter, 1993). Em *P. syringae* pv. *syringae*, o biofilme produzido garante a sobrevivência do patógeno em condições de estresse, como o verão. No



inverno, a fitobactéria sai da fase saprofítica e retorna à fase patogênica causando doença em plantas de manga (Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2019).

Muitas fitobactérias apresentam a habilidade de sobreviver por um longo período na ausência do hospedeiro. Porém, outros gêneros não conseguem se estabelecer fora do hospedeiro, como por exemplo *Candidatus Liberibacter*. Dentre as espécies desse gênero '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Ca. Liberibacter americanus*' são as mais conhecidas por estar associada a doença Huanglongbing (ou Greening) (Cruz-Munoz *et al.*, 2019). As bactérias candidatas ao gênero *Liberibacter* são de natureza biotróficas, não crescendo em meio de cultura (Liefert *et al.*, 2009; Bertolini *et al.*, 2015; Orce *et al.*, 2015). Em contrapartida, *Xanthomonas* e *Pseudomonas* possuem hábito saprofítico, o que lhes conferem a capacidade de sobreviver por longos períodos em solo, restos culturais e filoplano em diversas espécies como mencionado nos parágrafos anteriores. Informações como estas não existem para a espécie *E. psidii*, pois a literatura atualmente disponível reporta apenas estudos sobre a diversidade genética do patógeno. Notadamente, estudos que elucidem a ecologia e o comportamento do patógeno podem trazer à luz o modo de vida da fitobactérias, o que permitiria o uso adequado de estratégias de manejo para mitigar a seca-de-ponteiro nas florestas de eucalipto.

## 2.4 Terminologia

### Patogenicidade

Patogenicidade é quando um microrganismo, podendo ser fungo ou bactéria, possui atributos ou fatores para parasitar outro ser vivo, o qual pode ser outro microrganismo, uma planta, insetos e animais. As bactérias

possuem fatores de patogenicidade de acordo com o tecido parasitado. Além disso, a formação de *Quorum sensing* e por sua vez biofilme em algumas espécies, é um dos fatores mais eficientes em sua patogênese (Amorim & Paschoalati, 2018).

Em adição, o sistema excretório bacteriano é um dos principais fatores de patogenicidade. Cada tipo de sistema excretório possui sua função, quando o hospedeiro é uma planta, os principais sistemas excretórios são: T1SS: responsável pelo transporte de enzimas e fitotoxinas; T2SS: proteínas, enzimas e compostos fitotóxicos; T3SS: moléculas efectoras e coratina (fitotoxina semelhante estruturalmente ao ácido jasmônico); T4SS: ssDNA e proteínas Vir; T5SS: transporte de adesinas e proteínas; T6SS: moléculas efectoras (Bedendo & Belasque, 2018; Paschoalati & Dalio, 2018).

As enzimas são de extrema relevância, dado que estas são fundamentais para a degradação dos tecidos das plantas, e assim a colonização bacteriana. As fitotoxinas por sua vez, são responsáveis por alterar os processos bioquímicos da célula do hospedeiro (Paschoalati & Dalio, 2018).

### Virulência

Virulência é de fator qualitativo, e segue os pressupostos da Teoria de Flor. A qual sugere que cada gene do patógeno, que desencadeie doença, possui um gene complementar de resistência no hospedeiro em um sistema chave-fechadura. Os quais são Avr e avr para o patógeno e R e r para o hospedeiro. Quando o hospedeiro e o patógeno possuem os genes R e Avr, ocorre a resistência. Porém quando há Avr e r, avr e R, e avr e r, não há a

resistência do hospedeiro, que por sua vez passa a apresentar a doença (Camargo, 2018).

Em síntese, um patógeno virulento é aquele que possui a habilidade de induzir doença. Quando o patógeno está em estado avirulento, este não está induzindo doença em seu hospedeiro (Camargo, 2018).

#### Agressividade

A agressividade está relacionada com o grau de severidade da doença, ou seja, é um fator quantitativo. No caso de bacterioses, é a relação de severidade *versus* tempo (Paschoalati & Dalio, 2018).

#### Viável mas não cultivável (“VBNC”) e célula em estado de Persistência

As bactérias quando submetidas a diferentes formas de estresse buscam alternativas para a sobrevivência, dentre estas estão VBNC e/ou célula Persistente (Álvarez *et al.*, 2008; Gerdes & Maisonneuve, 2012; Lewis, 2010). Muitos autores definem o estado viável mas não cultivável como um estado de dormência diferente de estado de persistência (Pinto *et al.*, 2015). Por outro lado, há vários autores que consideram que ambos os estados de dormência seriam na verdade, o mesmo estado fisiológico, morfológico e metabólico (Martins *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018).

Segundo os autores que consideram ambos os estados diferentes, as células bacterianas em VBNC entraram neste estado devido ao estresse ocasionado por baixas temperaturas, como *Vibrio vulnificus* (Kong *et al.*, 2004; Lutz *et al.*, 2013) bem como por perda de atividade da catalase dentre outros (Oliver, 2010; Santander *et al.*, 2012). E estas se diferenciariam de células

persistentes, por estas últimas serem induzidas principalmente na presença de antibióticos e não apresentarem diferença morfológica (Pinto et al., 2015).

Em outra via, os autores que defendem que ambas as células seriam iguais, demonstraram em seus estudos que ambas as células, as quais foram obtidas com procedimentos padrão de obtenção, apresentaram a mesma morfologia, taxa metabólica e expressão gênica (Ayrapetyan *et al.*, 2015; Kim et al., 2018). Segundo Kim *et al.* (2018), as células persistentes velhas (com 24 horas) apresentaram a mesma morfologia que células VBNC. Além disso, demonstrou que muitas das células consideradas VBNC estariam na verdade mortas.

#### Técnicas de detecção

Para a detecção de microrganismos, diversas técnicas são desenvolvidas frequentemente para otimizar confiabilidade de resultado, custo e tempo de obtenção de resultado. Para a detecção de fitobactérias, atualmente há várias metodologias e que são aplicáveis conforme a necessidade de estudo e realidade de cada laboratório.

As técnicas PCR (“Polymerase Chain Reaction”) e RT-PCR (“Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR”) são as técnicas mais sensíveis utilizadas. A diferença entre ambas é que PCR realiza uma análise qualitativa e RT-PCR uma análise qualitativa e quantitativa. A técnica ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) por sua vez possui baixo custo de implementação, se comparada com PCR e RT-PCR, e realiza sua detecção qualitativamente (Rezende *et al.*, 2018). Há também a utilização de kits de dois corantes fluorescentes denominados LIVE/DEAD. O corante SYTO 9E que colore as bactérias com a coloração verde, e o corante iodeto de propídio que

colore apenas as células bacterianas com a membrana celular danificada (Boulos et al., 1999; Ordax *et al.*, 2009; Ordax *et al.*, 2006).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Isolamento e preservação da fitobactéria

Amostras de ramos e folhas infectadas foram coletadas em áreas de floresta de eucalipto da empresa Celulose Riograndense, situadas nas regiões de Guaíba, Pantano Grande e Caçapava do Sul, no estado do Rio Grande do Sul. Fragmentos de 0,4-0,8 cm foram obtidos por corte e, em seguida, a superfície foi desinfestada com álcool 70% (v/v) por 30 segundos, após em hipoclorito de sódio a 1,5% (v/v) por 2 minutos e finalmente submetidos a uma tríplice lavagem em água destilada esterilizada.

Os tecidos foram macerados em água estéril e o extrato semeado por esgotamento sobre meio 523 (Kado & Heskett, 1970), em placas de Petri (90 x 15 mm). Em seguida, as placas foram incubadas a 28 °C por 24-48 h e quando do surgimento das colônias isoladas a identidade de *Erwinia psidii* CR01 foi confirmada por PCR com o uso dos *primers* específicos Ep2L (3' CCA AAA AGC TTG GTG TGG ATA 5') e Ep2R (3' AAA TTG GTG ACT CGC ACA TG 5'), com as amostras apresentando 355 bp, de acordo com o protocolo proposto por Silva *et al.* (2015). Colônias puras foram preservadas

em água destilada (Castellani, 1964) e óleo mineral (Buell & Weston, 1947) em temperatura ambiente.

### **3.2 Obtenção do mutante CR01R**

O mutante foi obtido pelo método da placa gradiente (Bryson & Szybalski, 1952), que consiste na formação de uma camada-básica por adição de 20 mL de ágar nutriente (Wright, 1933) em uma placa de Petri (90 x 15 mm), posicionada com ligeira inclinação. Após solidificação, a placa foi colocada na horizontal e adicionados mais 20 mL de meio 523, suplementado com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de rifampicina, para formar uma sobre-camada. Após solidificação, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão ( $10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) de células vivas de um isolado selvagem de *Erwinia psidii* foi distribuída sobre o meio 523. Em seguida, as placas foram incubadas a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  e quando do surgimento do mutante espontâneo uma colônia isolada foi repicada para o meio 523, em tubos de ensaio. A estabilidade do mutante foi testada por repicagens sucessivas (10 vezes) sobre meio 523 com (5 vezes) e sem antibiótico (5 vezes).

### **3.3 Curva de Crescimento bacteriano**

Suspensões de células vivas ( $10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) das estirpes *E. psidii* CR01 e CR01R (mutante) foram dispensadas (100  $\mu\text{L}$ ), separadamente, em frascos Erlenmeyers (150 mL) contendo meio 523 líquido. Os frascos foram submetidos à agitação constante sob temperatura de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . O crescimento das estirpes foi avaliado pela variação na densidade ótica (OD = 540 nm) nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 h, com cinco repetições para cada intervalo.

### 3.4 Teste de patogenicidade

Para comparar a patogenicidade da estirpe *E. psidii* CR01R em relação à *E. psidii* CR01, folhas destacadas do clone 37350 (*E. urophylla* × *E. globulus*) foram infiltradas com 100 µL de células vivas ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) das estirpes, na região do pecíolo foliar e nervura principal. O clone 37350 foi escolhido, por apresentar em condições de campo uma maior incidência da seca-de-ponteiros em comparação com outros clones (dados não mostrados). O tratamento controle [infiltração com PBS (tampão fosfato salino) (0,1M; pH=7,0)] mais às estirpes contaram com três repetições e foram acondicionados em caixas Gerbox, sobre uma malha (2 cm<sup>2</sup>) de polietileno para evitar o contato com a espuma umidificada inserida abaixo, esta que garantiria que umidade para a folha. As caixas foram dispostas em incubadora, mantendo a temperatura de 28 °C. Após 3-4 dias de inoculação, os sintomas típicos foram comparados entre as estirpes CR01 e CR01R.

### 3.5 Teste de agressividade

Para determinar a agressividade da estirpe CR01R (mutante) em relação à CR01 (selvagem), folhas destacadas do clone 37350 (*E. urophylla* × *E. globulus*) foram perfuradas na região central da nervura principal. Em seguida, uma gota [20 µL; PBS (0,1 M; pH 7,0)] de suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) foi depositada sobre o ferimento. Cada estirpe, mais o tratamento controle (infiltração com PBS) contaram com três repetições e foram adicionadas em placas de Petri (150 x 20 mm) sobre ágar-água (0,5%) (Imathiu *et al.*, 2009) com o pecíolo imerso no meio. Em intervalos de 1, 2, 3 e 4 dias a expansão das lesões foram mensuradas com uso de paquímetro.



### 3.6 Sobrevivência epifítica

Uma suspensão de inóculo ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) da CR01R foi preparada a partir de culturas desenvolvidas a 28 °C por 24 h. Em seguida, mudas dos clones 37350 (*E. urophylla* × *E. globulus*) e 32864 (*E. saligna*) com 90 dias de idade foram pulverizadas até o ponto de escorrimento e mantidas em casa-de-vegetação (28 ± 2 °C com 70% UR). Os clones foram escolhidos por apresentarem resistência (clone 32864) e suscetibilidade (clone 37350) em condições de campo. Após inoculação, em intervalos de 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 75 dias, três discos foliares com diâmetros de 1 cm (Oliveira *et al.*, 1991) foram removidos do terço médio das plantas.

Os discos foram adicionados em tubos de ensaio contendo 9 mL de PBS (0.1 M; pH 7,0; contendo 0,05% de Tween-80) e submetidos a sonicagem por ultrassom (40 kHz, 120 W) por 3 minutos (Lanna Filho *et al.*, 2013). O extrato foi diluído (fator = 1:10<sup>3</sup>) e espalhado (0,1 mL) sobre meio 523 suplementado com rifampicina (30 µg mL<sup>-1</sup>) e azoxistrobina (20 µg mL<sup>-1</sup>), em placas de Petri (90 x 15 mm). Em seguida, as placas foram incubadas a 28 °C por 24-48 h e quando do surgimento das colônias foi realizada a contagem da população bacteriana e os dados transformados em raiz cúbica do número de UFC cm<sup>-1</sup> de tecido foliar. Para cada intervalo de tempo foram utilizadas três repetições, para cada clone. O experimento teve duração de Maio até Dezembro de 2019.

### 3.7 Sobrevivência em solo

Amostras simples de solo foram coletadas aleatoriamente no Horto Florestal Cerro, em Eldorado do Sul-RS, da empresa Celulose Riograndense.

O solo de textura média (Tipo 2) apresentou as seguintes propriedades: pH 4,4 e argila em 13%. As amostras foram homogeneizadas, peneiradas (abertura = 2,00 mm) e submetidas à secagem por 3 dias em estufa a 37 °C (Hildebrand *et al.*, 2001). A população de *E. psidii* CR01R foi submetida às condições de solo esterilizado (autoclavado por três vezes por 20 min a 121 °C) e não-esterilizado. Para tal, culturas da fitobactéria crescidas a 28 °C por 24 h foram suspensas em PBS (0,1 M; pH 7,0) e dispensadas ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) nos solos até atingirem 18,5% da capacidade de campo (CC). A suspensão de células vivas da bactéria foi misturada em 50 g de solo e os copos de 100 mL foram selados com papel alumínio e mantidos sob temperatura de 28 °C.

Em intervalos de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 e 150 dias, 1 g de solo foi coletado e adicionado à 9 mL de PBS (0,1 M; pH 7,0), submetidos à agitação e seguido de repouso (30 min) para a sedimentação (Hildebrand *et al.*, 2001). O sobrenadante foi diluído (fator = 1:10<sup>3</sup>) e 10 µL espalhado sobre meio 523 suplementado com rifampicina (30 µg mL<sup>-1</sup>) e azoxistrobina (20 µg mL<sup>-1</sup>), em triplicatas de placas de Petri (90 x 15 mm). Em seguida, as placas foram incubadas a 28 °C. Quando do crescimento das colônias foi realizada a comparação com a morfologia típica de *E. psidii* e contagem da população bacteriana e os dados transformados em raiz cúbica do número de UFC g<sup>-1</sup> de solo. Não havendo o crescimento de colônias bacterianas sobre o meio, foi realizada uma Bio-PCR para cada copo, e desde feito um lavado. Com o lavado foi feita a extração de DNA, e dado seguimento à PCR, foi utilizado os *primers* específicos Ep2L (3' CCA AAA AGC TTG GTG TGG ATA 5') e Ep2R (3' AAA TTG GTG ACT CGC ACA TG 5') de acordo com o protocolo proposto

por Silva *et al.* (2015). O experimento teve duração de Maio até Dezembro de 2019.

### 3.8 Sobrevivência em restos foliares

Folhas dos clones 37350 e 32864, em completo desenvolvimento, foram coletadas no Horto Florestal Cerro, em Eldorado do Sul-RS, da empresa Celulose Riograndense. Em seguida, cortes foram realizados com um bisturi no limbo foliar e as folhas imersas em uma suspensão de células vivas ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) da *E. psidii* CR01R. As folhas foram adicionadas sobre uma tela plástica (malha = 2 cm<sup>2</sup>) e ficaram suspensas acima de uma espuma umedecida, dentro de caixas Gerbox. Uma mecha de algodão úmido foi colocado no pecíolo de cada folha e as caixas mantidas em incubadora a 28 °C sob luz fluorescente ( $40 \text{ mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ) com fotoperíodo de 12 h. Quando do surgimento dos sintomas, as folhas foram cortadas em pedaços (1,0-4,0 cm), pesadas (3 g) e envoltas em sacos (11 x 11 cm) de nylon (malha = 1 mm). Os sacos contendo os dois tipos de clones, separadamente, foram posicionados sobre a superfície dos solos esterilizado e não-esterilizado, bem como nas profundidades de 5 e 15 cm em vasos de 12 L. Foram utilizadas nove repetições para cada condição de solo e profundidades testadas.

Nos intervalos de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180 e 210 dias, uma porção de 0,2 gramas dos restos foliares em cada saco foi coletada e macerada em almofariz com 10 mL de PBS (0,1 M; pH 7,0). O extrato foi filtrado em duas camadas de gaze, diluído (fator = 1:10<sup>3</sup>) e uma alíquota de 10 µL foi espalhada sobre o meio 523 suplementado com rifampicina (30 µg mL<sup>-1</sup>) e azoxistrobina (20 µg mL<sup>-1</sup>), em triplicatas de placas de Petri (90 x 15

mm). Em seguida, as placas foram incubadas a 28 °C e quando do surgimento das colônias foi realizada a contagem da população bacteriana pelo número de UFC g<sup>-1</sup> de restos de foliares.

Quando as amostras se tornaram todas negativas para o crescimento bacteriano, foram analisadas novamente por PCR usando *primers* Ep2L e Ep2R (Silva *et al.*, 2015). A obtenção do DNA fitobacteriano foi realizada através de maceração de 0,2g de restos culturais em 10mL de PBS (0,1M; pH=7,0). Da suspensão resultante, 1,5 mL foram adicionadas em Eppendorf e fervidas por 10 minutos em 100°C, e em sequência centrifugadas 5 minutos a 5000 rpm. Do sobrenadante resultante, 2 µL foram adicionados ao seu respectivo Eppendorf contendo o mix (Master Mix e os *primers* Ep2L e Ep2R). O método de obtenção do DNA fitobacteriano foi adaptado de Llop *et al.* (1999) e Minguzzi *et al.* (2016). O experimento teve duração de Maio até Dezembro de 2019.

### **3.9 Análise estatística**

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados obtidos foram transformados em raiz cúbica, e submetidos à análise de regressão usando o *software* SigmaPlot (Systat Software Inc., 2020).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Comportamento e característica do mutante CR01R**

O mutante espontâneo CR01R apresentou estabilidade quanto à resistência à rifampicina, quando submetido às repicagens alternadas em meio 523 com a ausência e a presença do antibiótico ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). As colônias do mutante não apresentaram alterações morfológicas, em comparação com a estirpe selvagem (Figura 1). As colônias mantiveram a pigmentação esbranquiçada, superfície brilhante, bordos lisos e aspecto mucóide. Comparando o crescimento das estirpes selvagem e mutante em meio líquido, o mutante apresentou crescimento similar à estirpe selvagem (Figura 2). Notadamente, se observou que não houve interferência da mutação em fatores importantes para o crescimento da célula fitobacteriana.

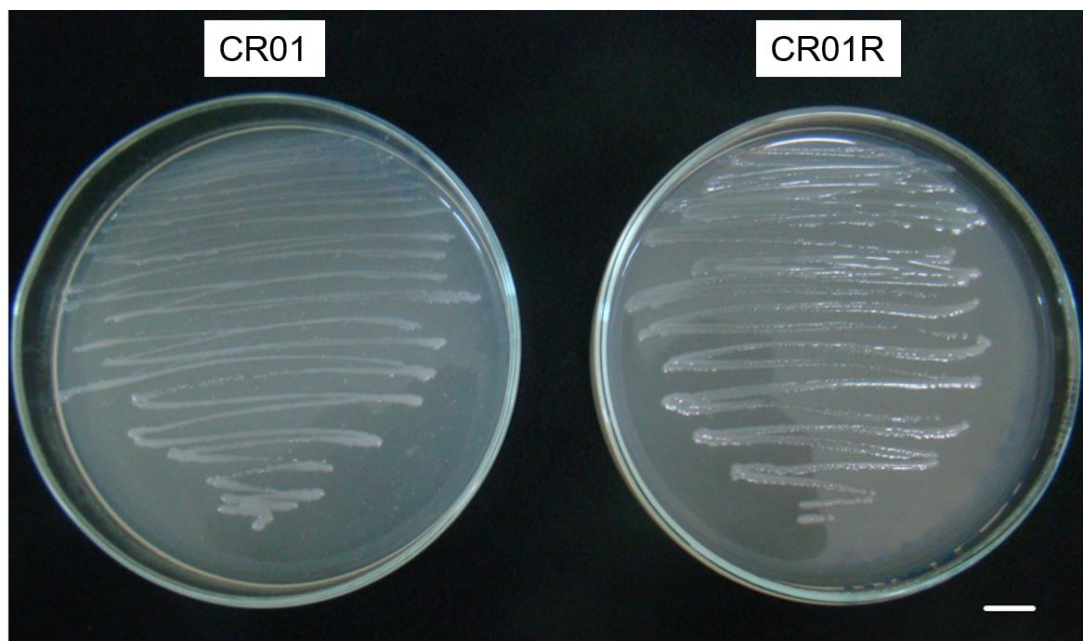


FIGURA 1. Colônias de *E. psidii* da estirpe selvagem (CR01) e mutante (CR01R) sobre meio 523. Colônias com pigmentação esbranquiçada, superfície brilhante, bordos lisos e aspecto mucoide. (Magnitude = 1 cm).

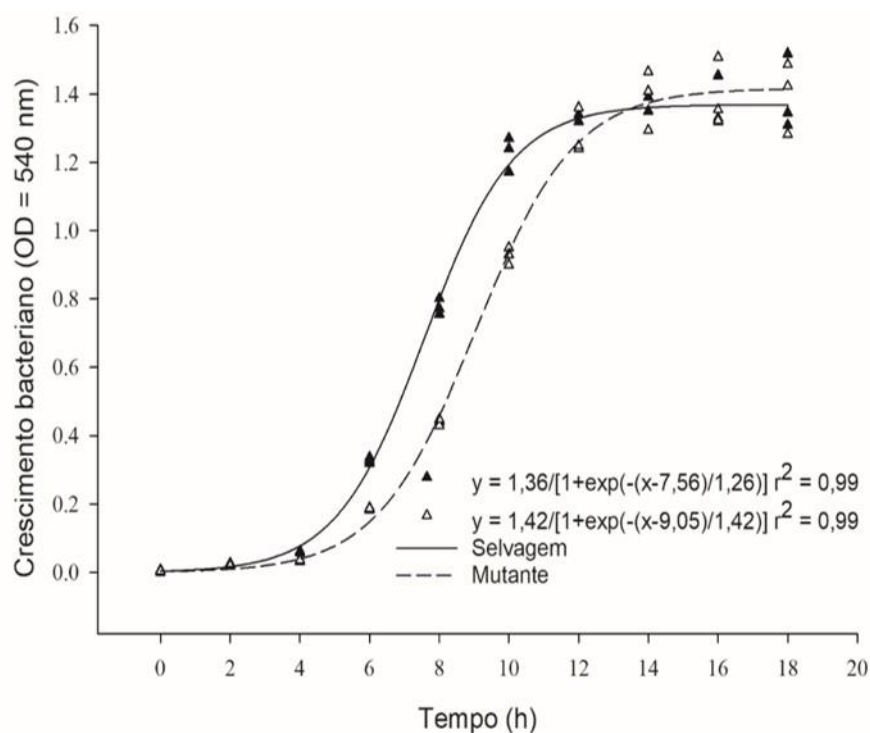


FIGURA 2. Curva de crescimento das fitobactérias *Erwinia psidii* selvagem CR01 e mutante CR01R em meio líquido 523. O triângulo cheio ( $\blacktriangle$ ) e vazio ( $\triangle$ ) representam as estirpes selvagem e mutante, respectivamente.

#### 4.2 Teste de patogenicidade e agressividade

O mutante expressou os mesmos fatores de patogenicidade ocasionados pela estirpe selvagem (Figura 3). Igualmente à estirpe selvagem, o mutante estimulou o surgimento da anasarca do limbo foliar e escurecimento da nervura central. Como esperado, o controle não apresentou qualquer sintoma de anasarca ou necrose da nervura central. Quanto à agressividade, não houve diferença na velocidade da expansão dos sintomas em relação ao tempo, para as estirpes selvagem e mutante (Figura 4).

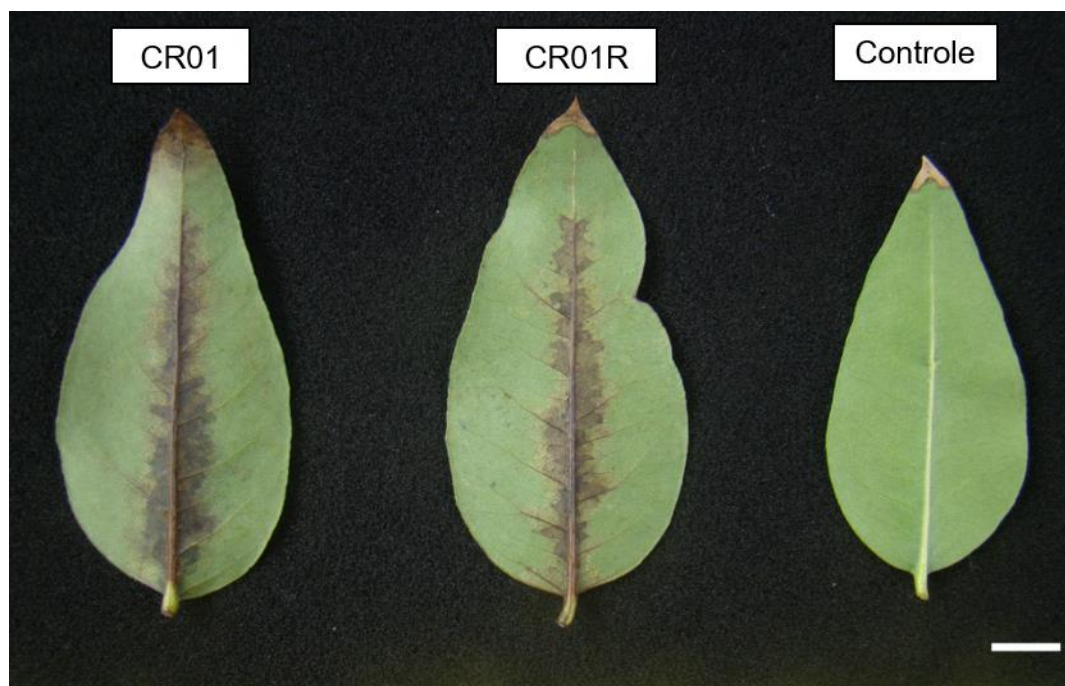


FIGURA 3. Patogenicidade da *Erwinia psidii* CR01 (selvagem) e CR01R (mutante) em folhas de *Eucalyptus saligna*. Sintomas típicos de anasarca no limbo foliar e escurecimento da nervura principal. (Magnitude = 1 cm).

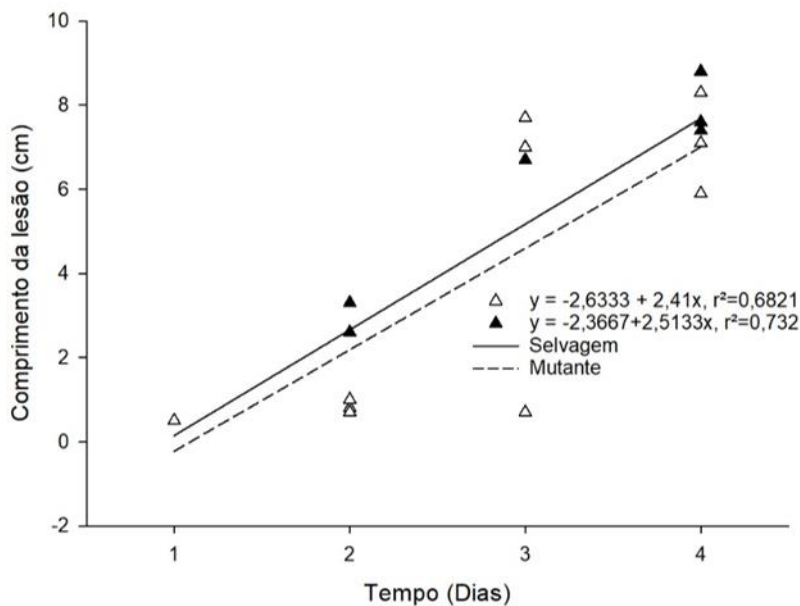


FIGURA 4. Comparação do desenvolvimento da lesão na nervura central de folhas destacadas do clone 37350 (*E. urophylla* × *E. globulus*), após inoculação das *Erwinia psidii* CR01 (—) e CR01R (---). O triângulo cheio (▲) e vazio (△) representam as estirpes selvagem e mutante, respectivamente.

#### 4.3 Sobrevivência em filoplano

Sobre o filoplano do clone 32864 a estirpe CR01R sobreviveu por 60 dias e apresentou uma população final estimada em  $4,0 \times 10^{-3}$  UFC/cm<sup>2-1</sup> de tecido foliar (Figura 5A). No clone 37350, a população da fitobactéria sobreviveu por 30 dias e apresentou uma população final de  $4,1 \times 10^{-2}$  UFC cm<sup>2-1</sup> de tecido foliar (Figura 5B). Nenhuma célula viável da estirpe CR01R foi detectada nos extratos foliares das amostras de folha, após não crescimento em meio-seletivo em 75 dias. A confirmação da ausência do patógeno se deu via PCR utilizando os *primers* específicos Ep2L/Ep2R.



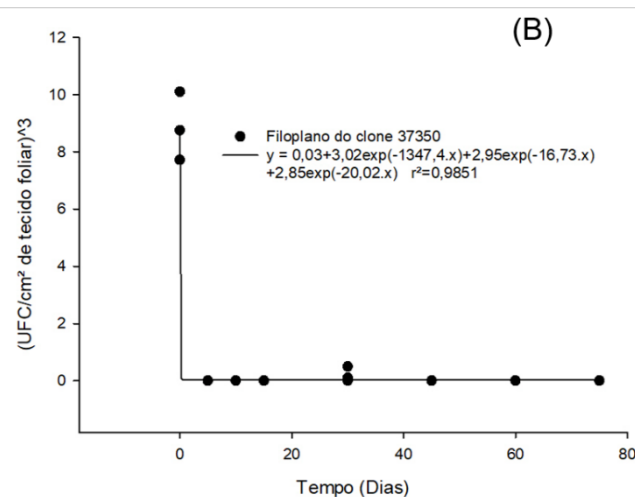
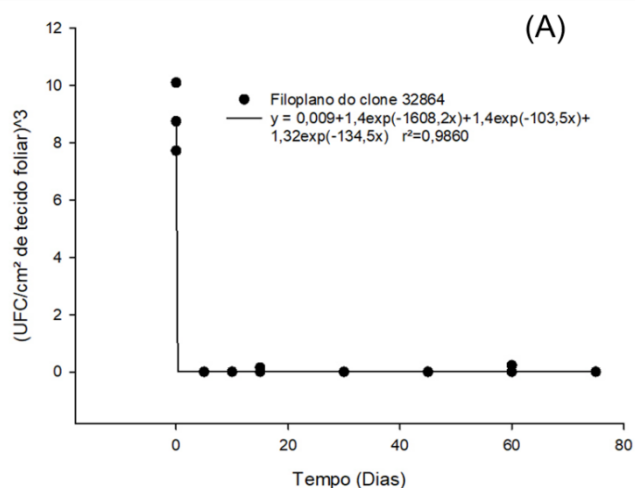


FIGURA 5. População da *Erwinia psidii* CR01R sobre o filoplano dos clones 32864 (resistente) e 37350 (suscetível). Sobrevivência por 60 dias da fitobactéria sobre o filoplano do clone 32864 (A). Sobrevivência por 30 dias da fitobacteriana sobre o filoplano do clone 37350 (B).

#### 4.4 Sobrevivência em solo

A fitobactéria sob condições de solo esterilizado sobreviveu por 120 dias, apresentando população estimada em  $1,8 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de solo (Figura 6A). Em solo não-esterilizado, a população da fitobactéria não foi detectada após os cinco dias de infestação do solo (Figura 6B). A comprovação da não existência de células da CR01R em solo esterilizado e não-esterilizado foi

confirmada mediante uma Bio-PCR, após a ausência de detecção em meio de cultura seletivo, utilizando os *primers* específicos Ep2L / Ep2R (Anexo 1).

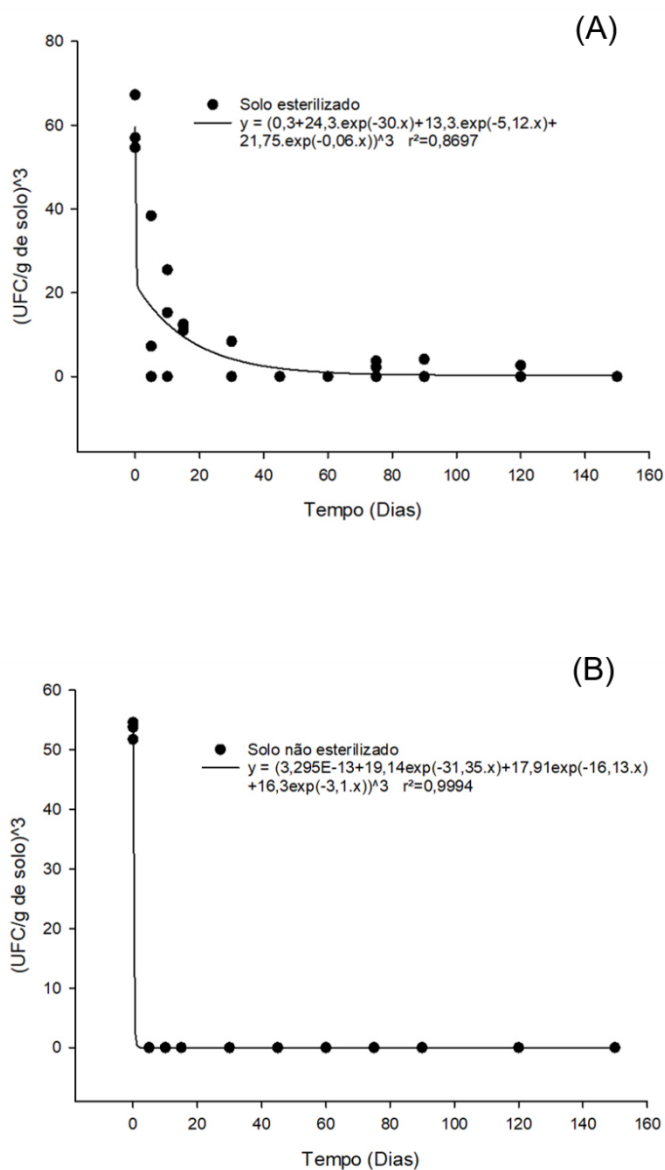


FIGURA 6. População da *Erwinia psidii* CR01R em solo esterilizado e não-esterilizado. Sobrevivência por 120 dias da estirpe CR01R em condições de solo esterilizado (A). Em condições de solo não-esterilizado a estirpe CR01R sobreviveu por apenas cinco dias (B).

#### 4.5 Sobrevivência em restos foliares

Para o clone 32864, sobre e sob o solo esterilizado, amostras de restos foliares apresentaram populações bacterianas até aos 75 dias (Figuras 7A, B

e C). Sobre o solo a população detectada foi de  $1,8 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 7A). Similar à população estimada sobre a superfície do solo, sob 5 cm de profundidade, os tecidos foliares apresentaram população estimada em  $1,8 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 7B). Sob a profundidade de 15 cm, a população bacteriana foi de  $2,9 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 7C).

Após esse período, a fitobactéria foi detectada apenas aos 120 dias, com população estimada em  $4,6 \times 10^3$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares, sobre o solo (Figura 7A). Na profundidade de 5 cm, os tecidos foliares apresentaram população bacteriana estimada em  $4,4 \times 10^3$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 7B). Sob 15 cm de solo a população bacteriana foi estimada em  $1,0 \times 10^3$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 7C). Nas avaliações posteriores não houve a detecção da fitobactéria nos restos foliares, confirmado por PCR. (Anexo 2a, b, e c).

Em solo não-esterilizado a estirpe CR01R foi detectada nos resíduos foliares do clone 32864 até aos 90 dias (Figura 7D, E e F). Sobre o solo, a população estimada foi de  $0,4 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 7D). Na profundidade 5 cm, igualmente (Figura 7E). Sob 15 cm de profundidade, os resíduos foliares apresentaram população estimada em  $1,1 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 7F). Posterior aos 90 dias, a fitobactéria foi detectada apenas aos 180 dias (Figuras 7D, E e F). Sobre o solo os restos foliares apresentaram população bacteriana estimada em  $1,8 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 7D). Sob as profundidades de solo de 5 e 15 cm, as populações estimadas nos restos foliares foram de  $9,6 \times 10^1$  e  $2,2 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares, respectivamente (Figura 7E e F). Não houve detecção da

estirpe CR01R nas avaliações posteriores, confirmada por PCR (Anexo 3a, b e c).

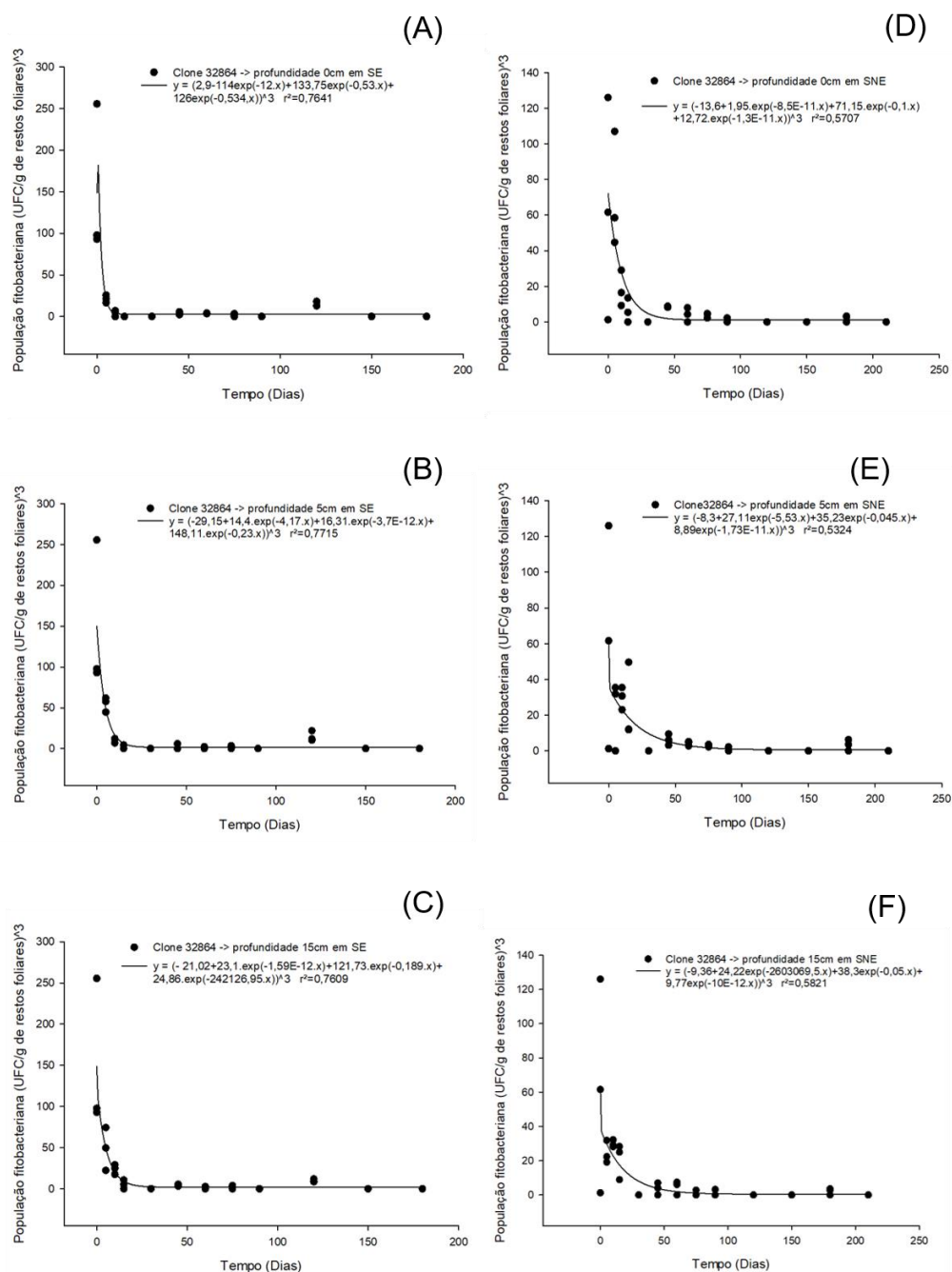


FIGURA 7. Persistência da *Erwinia psidii* CR01R em restos foliares do clone 32864 em solo esterilizado e não-esterilizado. População da estirpe CR01R em amostras de restos foliares sobre (A) e sob [5 e 15 cm (B e C) ] o solo esterilizado, bem como sobre (D) e sob [5 e 15 cm (E e F)] o solo não-esterilizado.

Resíduos foliares do clone 37350 em 0/5 cm de solo esterilizado apresentaram detecções da CR01R até aos 60 dias (Figuras 8A e B). Sobre o solo os restos foliares apresentaram população bacteriana estimada em  $1,5 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 8A). Sob uma camada de 5 cm de solo os restos foliares apresentaram população bacteriana de  $2,9 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 8B). Sob uma camada de solo de 15 cm os restos foliares apresentaram população bacteriana estimada em  $1,5 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 8C). Não houve detecção da população bacteriana sobre o solo e sob a camada de 5 cm dos 60 até os 120 dias. Sob 15 cm de solo a população bacteriana foi contínua até os 75 dias, período este que a população bacteriana foi estimada em  $0,7 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 8C). Após os 75 dias, a fitobactéria foi detectada apenas aos 120 dias como mostrado nas Figuras 9A, B e C. Na superfície do solo os restos foliares apresentaram população bacteriana estimada em  $4,2 \times 10^3$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 8A). Nas profundidades de 5 e 15 cm as populações bacterianas estimadas foram de  $1,8 \times 10^3$  e  $1,4 \times 10^3$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares, respectivamente (Figura 8B e C). As amostras de restos foliares, após os 120 dias, não apresentaram células viáveis da fitobactéria, confirmado pela PCR, com uso de *primers* específico (Anexo 2d, e e f).

Em solo não-esterilizado, a fitobactéria foi detectada ininterruptamente até os 90 dias, neste tempo, amostras de restos foliares sobre o solo apresentaram população bacteriana estimada em  $0,4 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 8D). Igual população foi encontrada em tecidos foliares enterrados a 5 cm (Figura 8E). Na profundidade de 15 cm a população

detectada foi de  $1,1 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figura 8F), semelhante ao detectado para o clone 32864 (Figura 7F). Posterior aos 90 dias, a fitobactéria foi detectada sobre o solo apenas nas amostras de tecidos foliares do clone 37350 aos 150 e 180 dias com população estimada em  $1,5 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> e  $0,7 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares respectivamente (Figura 8D). Nas profundidades de 5 e 15 cm as populações estimadas nas amostras de restos foliares foram de  $1,4 \times 10^2$  e  $1,2 \times 10^2$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares (Figuras 8E e F). Posterior aos 180 dias, as amostras foliares em todos os estratos de solo não apresentaram células viáveis da fitobactéria, confirmado por PCR, com uso de *primer* específico (Anexo 3d, e e f).

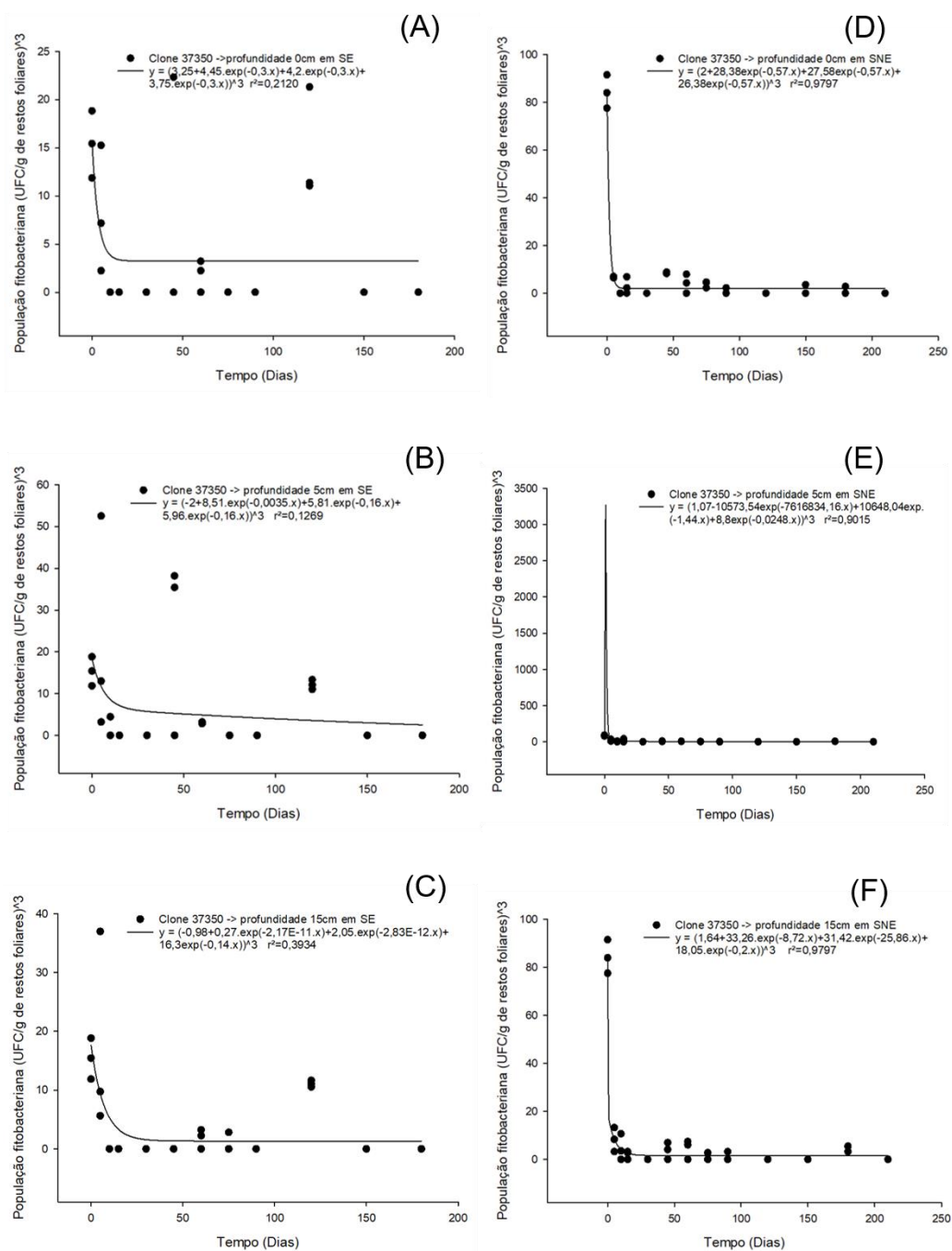


FIGURA 8. Sobrevivência da população da *Erwinia psidii* CR01R em restos foliares do clone 35370 em solo esterilizado. Declínio da população fitobacteriana em solo esterilizado nas profundidades 0cm (A), 5cm (B) e 15cm (C), e solo não esterilizado nas profundidades 0cm (D), 5cm (E) e 15cm (F).

## 5 DISCUSSÃO

A resistência de bactérias a rifampicina tem sido exaustivamente empregada como marcador para estudos de dinâmica populacional e sobrevivência em diferentes condições de ambiente (Mariano & Mccarter, 1993; Zhao *et al.*, 2002; Milling *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014; Nakahara *et al.*, 2016). Embora o método possa promover alterações biológicas que influenciem em traços ecológicos da bactéria (Andrews, 1986; Schroth *et al.*, 1991), o mutante CR01R não apresentou diferenças na taxa de crescimento, morfologia, patogenicidade e agressividade em comparação com a estirpe parental. Respostas semelhantes foram reportadas por Rott *et al.* (1994), quando o mutante resistente à rifampicina *Xanthomonas albilineans* GPE5SR apresentou a mesma taxa de crescimento, morfologia, agressividade e patogenicidade da estirpe selvagem *X. albilineans* GPE5. Outros autores também reportam os mesmos resultados deste estudo, por demonstrarem semelhanças das atividades biológicas e ecológicas entre o mutante à rifampicina e a estirpe selvagem (Mariano & Mccarter, 1993; Silva *et al.*, 2006).

A curta persistência de células cultiváveis da *Erwinia psidii* CR01R em solo não-esterilizado (Figura 6A) corrobora com outros estudos realizados com fitobactérias autóctones da parte aérea (Hildebrand *et al.*, 2001). O rápido



declínio da população fitobacteriana em solo nativo de áreas de eucalipto, pode estar relacionada à inabilidade do patógeno em competir com a flora microbiana autóctone do solo. Igualmente, Graham *et al.* (1989) reportou que a fitobactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* não sobreviveu à atividade antagônica dos microrganismos do solo de pomares de Maryland, EUA. Fitobactérias da parte aérea não conseguem competir com a microbiota antagônica nativa, podendo sobreviver poucos dias ou poucas semanas naquele ambiente (Lee, 1920; Goto *et al.*, 1978; Kritzman & Zutra, 1983; Trevors & Finnen, 1990; Hildebrand *et al.*, 2001).

Sobrevivendo um pouco mais de 10 semanas sobre o filoplano de folhas de eucalipto (Figura 5A e B), a *E. psidii* demonstrou ter baixa aptidão epifítica. Igualmente, Norelli & Brandl (2006) reportaram que células viáveis da *E. amylovora* sobreviveram entre 6 e 14 dias sobre folhas de macieira sob temperatura de 24 °C. Mariano & McCarter (1993) também reportaram que células vivas de *Pseudomonas viridiflava* não foram recuperadas após 16 semanas de exposição do patógeno sobre duas cultivares de tomate. Contrapondo aos estudos supracitados, alguns autores reportam a sobrevivência por longo período de fitobactérias (como *Xanthomonas campestris* patovar *manihotis* e *Pseudomonas viridiflava*) da parte aérea sobre a superfície foliar de culturas economicamente importante (Daniel & Boher, 1985; Mariano & McCarter, 1993). Não obstante, não seja senso comum a baixa aptidão epifítica por fitobactérias da parte aérea, a maioria dos estudos têm mostrado a incapacidade desses patógenos em sobreviver por longo período no filoplano (Henis & Bashan, 1988; Beattie & Lindow, 1994;

Norelli & Brandl, 2006; Lamichhane & Varvaro, 2013; Dutta *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2018).

Mormente, as condições oscilantes de temperatura, umidade, radiação e outras, para as quais as fitobactérias ficam expostas, tornam difíceis a sobrevivência por longo período no filoplano (Hirano & Upper, 1983; Daniel & Boher, 1985; Henis & Bashan, 1988; Beattie & Lindow, 1994; Norelli & Brandl, 2006; Dutta *et al.*, 2017) .

No tocante à sobrevivência de *E. psidii* CR01R nos tecidos foliares enterrados, a detecção em solo não esterilizado foi de até 180 dias em solos não esterilizados (Figuras 7D, 7E, 7F, 8D, 8E e 8F). A proteção física que o material vegetal proporciona à fitobactéria é possivelmente a chave para a sobrevivência por tanto tempo em ambiente (solo) desfavorável em comparação à sobrevivência direta no solo (Figura 6). Schaad & White (1974) obtiveram resultado semelhante ao comparar *Xanthomonas campestris* diretamente no solo e quando em associação à restos culturais. Os dados obtidos por eles mostraram que a *X. campestris* sobreviveu por 42 dias em solo, e por 244 dias em restos culturais de repolho. Silva Júnior *et al.* (2019) também obtiveram resultados semelhantes em que, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sobreviveu por até 24 dias em solo, e em restos culturais de couve flor por até 255 dias.

A profundidade em que os restos foliares são enterrados também interfere no tempo de sobrevivência da fitobactéria *E. psidii* CR01R. Sobre o solo não esterilizado, a detecção do patógeno foi mais frequente que nas demais profundidades. Sendo detectada a presença da fitobactéria continuamente até 90 dias ( $0,4 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares), a detecção

retornou a acontecer em 150 dias ( $1,5 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares), e novamente em 180 dias ( $0,7 \times 10^1$  UFC/g<sup>-1</sup> de restos foliares) (Figura 8D). Enquanto que nas demais profundidades, a detecção ocorreu aos 90 dias e depois somente em 180 dias (Figuras 8E e F). *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* também possui sobrevivência diferente de acordo com a profundidade, a fitobactéria sobrevive em restos culturais dispostos na superfície por até 60 dias, enquanto que nas profundidades 10 e 20cm por somente 45 dias (Sikirou & Wydra, 2004). Já *Acidovorax citrulli* Aac1Rif sobrevive por até 21 dias em resíduos de folhas e frutos de melão enterrados em profundidade 0, 5 e 10cm, em profundidade 15cm sobrevive por somente 14 dias (Alves *et al.*, 2018).

Em se tratando dos clones, as diferenças não foram notórias visualmente em restos foliares, exceto em filoplano. No qual, a fitobactéria sobreviveu por 30 dias a mais no filoplano do clone 32864 (60 dias) que no clone 37350 (30 dias).

Durante as avaliações a fitobactéria apresentou redução da detecção em restos foliares conforme redução da temperatura ambiente. Em agosto e setembro de 2019, meses durante o inverno, não houve detecção da fitobactéria *E. psidii*. Graham *et al.* (1989) obtiveram resultado semelhante com *Xanthomonas campestris* em solo de viveiros de citrus. Houve um decréscimo populacional conforme o período de inverno, e acréscimo quando as temperaturas tornaram elevadas novamente.

A dinâmica populacional de decréscimo e acréscimo é uma possível indução de estado de persistência por estresse de temperatura devido resfriamento do solo (Van Overbeek *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2018). Quando

ocorre aumento na temperatura a fitobactéria torna-se cultivável novamente (Figuras 7 e 8). O anexo 4 indica a flutuação térmica durante o período de avaliações, com temperatura média de 19,6 °C.

Essa capacidade da bactéria em não ser cultivável em condições estressantes, no caso a temperatura, é um demonstrativo da habilidade desse patógeno entrar em estado persistente. Este estado permite que a bactéria sobreviva em baixas taxas metabólicas em condições ambientais inadequadas, retornando às atividades normais quando em ambiente adequado à sobrevivência (Takacs, 1967; Jock *et al.*, 2005; Ordax *et al.*, 2010; Wood *et al.*, 2013; Santander & Biosca, 2017; Martins *et al.*, 2018). Essa estratégia, é possivelmente, a maneira que o patógeno usufrui para permanecer em uma floresta de eucaliptos durante as variações sazonais.

## 6 CONCLUSÕES

Com fundamento nos resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que:

- O mutante CR01R é semelhante à estirpe selvagem quanto ao crescimento, patogenicidade e agressividade;
- Em filoplano, *Erwinia psidii* CR01R sobrevive por 60 dias no clone 32864 e por 30 dias no clone 37350;
- *E. psidii* CR01R sobreviveu por até 120 dias no solo esterilizado e por 5 dias em solo não esterilizado;
- *E. psidii* CR01R sobrevive por até 180 dias em restos foliares em solo não esterilizado, e por até 120 dias em restos foliares em solo esterilizado.

## 7 REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO GAÚCHA DE EMPRESAS FLORESTAIS. **A indústria de base florestal no RS**: sumário executivo: setor de base florestal. Rio Grande do Sul: AGEFLOR, 2018.

ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Ed. da Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442 p.

ALVES, A. O. *et al.*. Survival of *Acidovorax citrulli* in infected melon tissues and in different edafoclimatic conditions. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 40, n. 5, p. 1-10, 2018.

ÁLVAREZ, B.; LÓPEZ, M. M.; BIOSCA, E. G. Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. **Microbiology**, Londres, v. 154, n. 11, p. 3590–3598, 2008.

AMORIM, L.; PASCHOALATI, S. F. Ciclo de relações Patógeno-hospedeiro. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. p. 46-70.

ANDREWS, J. H. How to track a microbe. *In*: FOKKEMA, N. J.; VAN DEN HENVEL, J. **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1986. p 14-34.

ARNAUD-SANTANA, E. *et al.* Longevity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infested dry bean (*Phaseolus vulgaris*) debris. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, MN , v. 75, n. 9, p. 952-953, 1991.

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

AYRAPETYAN, M.; WILLIAMS, T. C.; OLIVER, J. D. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. **Trends in Microbiology**, United Kingdom, v. 23, n. 1 p. 7–13, 2015.

BAYLIS, C. L. Enterobacteriaceae. *In*: BLACKBURN, C. **Food Spoilage Microorganisms**. Boca Raton: Woodhead Publishing, 2006. p. 624–667.

BAZZI, C.; PIAZZA, C.; MAZZUCCHI, U. Survival in the Field of *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp, Causal Agent of Lettuce Varnish Spor. **Phytopathology**, St. Paul, Minn., v. 111, n. 3-4, p. 251–258, 1984.

BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. Survival, growth, and localization of Epiphytic fitness mutants of *Pseudomonas syningae* on Leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 10, p. 3790–3798, 1994.

BEDENDO, I. P.; BELASQUE, J. Bactérias fitopatogênicas. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. p.143-160.

BERTOLINI, E. *et al.* Transmission of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in carrot seeds. **Plant Pathology**, Oxford, v. 64, n. 2, p. 276–285, 2015.

BOULOS, L. *et al.* LIVE/DEAD(®) BacLight(TM): application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 77–86, 1999.

BRYSON, V.; SZYBALSKI, W. Microbial selection. **Science**, Washington, v. 116, n. 3003, p. 45–51, 1952.

BUELL, C. B.; WESTON, W. H. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 34, n.10, p. 555-561, 1947.

CAIRES, N. P. **Interação *Erwinia psidii*-*Eucalyptus* spp.**: infecção, alterações fisiológicas e fontes de resistência. 2017. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2017.

CAIRES, N. P. *et al.* Host range of *Erwinia psidii* and genetic resistance of *Eucalyptus* and *Corymbia* species to this pathogen. **Forest Pathology**, Germany, v. 49, n. 4, p. 1-10, 2019.

CAMARGO, L.E.A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018a. p. 85-92.

CAMARGO, L.E.A. Controle genético. *In*: AMORIM, L., REZENDE, J. A. M. & BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018b. p.229-260.

CARVALHO, A. O. *et al.* Resistência de espécies, progênies e procedências de eucalyptus à ferrugem, causada por *Puccinia psidii* WINTER1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 33, n. 2, p. 139–147, 1998.

CASTELLANI, A. The “Water Cultivation” of Pathogenic Fungi. **Annales Des Societes Belges de Medecine Tropicale, de Parasitologie, et de Mycologie**, Bruxelles, v. 44, n. 2, p. 217–220, 1964.

COELHO, M. V. S.; MENDES, A. P.; MARQUES, A. S. A. **Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização**. Brasília: Embrapa, 2002. 8 p. (Comunicado Técnico, 59).

COUTINHO, T. A.; BRADY, C. L.; VAART, M. VAN DER. A new shoot and stem disease of Eucalyptus species caused by *Erwinia psidii*. **Australasian Plant Pathology**. Toowoomba, v. 40, n.1, p.55–60, 2011.

CRUZ-MUNOZ, M. *et al.* Growth parameters of *Liberibacter crescens* suggest ammonium and phosphate as essential molecules in the *Liberibacter*-plant host interface. **BMC Microbiology**, London, v. 19, n. 1, p.1-16, 2019.

DAMACENO, N. B.; FARIAS, L. R. Relação existente entre biofilmes bacterianos, *Quorum Sensing*, infecções e resistência a antibióticos: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Pesquisa Em Ciências Da Saúde**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 46–51, 2016.

DANIEL, J. F.; BOHER, B. Epiphytic phase of *Xanthomonas campestris* pathovar *manihotis* on aerial parts of cassava. **Agronomie**, Paris, v. 5, n. 2, p. 111-116, 1985.

DUTTA, B. *et al.* Epiphytic survival of *Pantoea ananatis* on *Richardia scabra* L. in Georgia. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, v. 101, n. 4, p. 613–618, 2017.

FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS **Global forest products facts and figures 2018**. [Rome]: FAO, 2019.

FERRAZ FILHO, A. C. *et al.* Thinning regimes and initial spacing for eucalyptus plantations in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 1, p. 255–265, 2018.

FERREIRA, K. C. Z.; MARINO, C. L.; FURTADO, E. L. Seleção de genótipos de eucalipto resistentes à ferrugem (*Puccinia psidii*) através de parâmetros monocíclicos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 43, n. 2, p. 103–110, 2017.

FONSECA, S. M. D. F. *et al.* **Manual prático de melhoramento genético de eucalipto**. Viçosa: Ed. UFV, 2010.



GERDES, K.; MAISONNEUVE, E. Bacterial persistence and Toxin-Antitoxin Loci. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, CA, v. 66, n. 1, p. 103–123, 2012.

GOTO, M.; OHTA, K.; OKABE, N. Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. **Annals of The Phytopathological Society of Japan**. Tsukuba, v. 41, n. 2, p. 197-201, 1978.

GRAHAM, J. H. *et al.* Population Dynamics and Survival of *Xanthomonas campestris* in Soil in Citrus Nurseries in Maryland and Argentina. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, v. 73, n. 5, p. 423–427, 1989.

GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J. A.; CAZORLA, F. M.; VICENTE, A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* associated with mango trees, a particular pathogen within the “hodgepodge” of the *Pseudomonas syringae* complex. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 10, n. 570, p. 1-20, 2019.

HAUBEN, L. *et al.* Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 21, n. 3, p. 384–397, 1998.

HAUBEN, L.; SWINGS, J. Genus XIII. *Erwinia*. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, c2005. v. 2. The proteobacteria. Part B: The gamaproteobacteria. The proteobacteria. p. 670-679.

HENIS, Y.; BASHAN, Y. Epiphytic survival of bacterial leaf pathogens. In: FOKKEMA, N. J.; VAN DEN HEUVEL, J. **Microbiology of the phyllosphere**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 252–268.

HILDEBRAND, M.; TEBBE, C. C.; GEIDER, K. Survival studies with the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in soil and in a soil-inhabiting insect. **Journal of Phytopathology**, San Diego, v. 149, n. 11-12, p. 635-639, 2001.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 21, n. 1, p. 243-269, 1983.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório 2019**. Brasília: IBA, 2019.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da extração vegetal e da Silvicultura 2018**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019.

IMATHIU, S. M. *et al.* *Fusarium langsethiae* pathogenicity and aggressiveness towards oats and wheat in wounded and unwounded in vitro detached leaf assays. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.

124, n. 1, p. 117–126, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Estações automáticas:** gráficos. Brasília: INMET, 2019. Disponível em: <[http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_auto\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf)>. Acesso em: 15 dez. 2019.

JOCK, S.; LANGLOTZ, C.; GEIDER, K. Survival and possible spread of *Erwinia amylovora* and related plant-pathogenic bacteria exposed to environmental stress conditions. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 2, p. 87–93, 2005.

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

KIM, J. H.; KANG, W. S.; YUN, S. C. Development of a model to predict the primary infection date of bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) on hot pepper. **Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 30, n. 2, p. 125–135, 2014.

KIM, J. S. *et al.* Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state. **Environmental Microbiology**, United Kingdom, v. 20, n. 6, p. 2038-2048, 2018.

KONG, I. S. *et al.* Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 50, n. 3, p. 133–142, 2004.

KONZEN, E. R. *et al.* Variação genética para variáveis de crescimento de procedências de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage e *E. Smithii* R. T. Baker do Sul do Brasil. **Cerne**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 359–366, 2017.

KRITZMAN, G.; ZUTRA, D. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in soil, plant debris, and the rhizosphere of non-host plants. **Phytoparasitica**, Dordrecht, v. 11, n. 2, p. 98-108, 1983.

LADIGES, P. Y.; UDOVICIC, F.; NELSON, G. Australian biogeographical connections and the phylogeny of large genera in the plant family Myrtaceae. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 30, n. 7, p. 989–998, 2003.

LAMICHHANE, J. R.; VARVARO, L. Epiphytic *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* can infect and cause olive knot disease on *Olea europaea* subsp. *cuspidata*. **Australasian Plant Pathology**, Toowoomba, v. 42, n. 2, p. 219-225, 2013.

LANNA FILHO, R. *et al.* Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP-marked *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato phylloplane. **Australasian Plant Pathology**, Toowoomba, v. 42, n. 6, p. 643-651, 2013.

- LEE, H. A. Behavior of citrus canker organism in the soil. **Journal of Agricultural Research**, Washington, D.C, v. 43, n. 5, p.189-206, 1920.
- LEWIS, K. Persister cells. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 64, n. 1, p. 357–372, 2010.
- LIEFTING, L. W. *et al.* “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”, associated with plants in the family Solanaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, n. 9, p. 2274-2276, 2009.
- LLOP, P. *et al.* A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 23–31, 1999.
- LUTZ, C. *et al.* Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, n. 375, p.1-15, 2013.
- MARCUZZO, L. L. Aspectos epidemiológicos de sobrevivência e de ambiente no gênero *Xanthomonas*. **Ágora: Revista de Divulgação Científica**, Concórdia, v. 16, n. 1, p.13-19, 2009.
- MARIANO, R. L. R.; MCCARTER, S. M. Epiphytic Survival of *Pseudomonas viriditlava* on Tomato and Selected Weed Species. **Microbial Ecology**, New York, v. 26, n. 1, p. 47-58, 1993.
- MARQUES, A. S. A.; SAMSON, R. Population dynamics of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* in bean, throughout the epiphytic and pathogenic phases. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 623-630, 2016.
- MARTINS, P. M. M. *et al.* Persistence in phytopathogenic bacteria: do we know enough? **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, n. 1099, p. 1-14, 2018.
- MILLING, A.; BABUJEE, L.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. 01-10, 2011.
- MINGUZZI, S. *et al.* A rapid protocol of crude RNA/DNA extraction for RT-qPCR detection and quantification of “*Candidatus Phytoplasma prunorum*.” **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2016.
- MONTOYA-ESTRADA, C. N. *et al.* Root infection and aerial colonization of eucalypt host plants by *Erwinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**, Switzerland, v. 44, n. 3, p. 251-257, 2019.
- NAGAR, V.; SINHA, V.; BANDEKAR, J. R. Diverse profiles of N-acyl Homoserine L-Lactones, biofilm, virulence genes and integrons in Food-Borne

- Aeromonas Isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 80, n. 8, p. M1861–M1870, 2015.
- NAKAHARA, H. *et al.* Biological control of the bacterial wilt of the tomato “Micro-Tom” by phenotypic conversion mutants of *Ralstonia solanacearum*. **Environmental Control in Biology**, Tokyo, v. 54, n. 3, p. 139–145, 2016.
- NORELLI, J. L.; BRANDL, M. T. Survival and growth of *Erwinia amylovora* on Apple Leaves. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 704, n. 14, p.127–132, 2006.
- ODA, S. *et al.* Melhoramento florestal. *In*: BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV, 2007. p. 123-142.
- OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S.; MUCHOVEJ, J. J. Population tendencies in young and mature coffee leaves. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 131, n. 3, p. 210–214, 1991.
- OLIVER, J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 415-425, 2010.
- ORCE, I. G. *et al.* Novel set of real-time PCR primers for simultaneous detection of Liberibacter species associated with citrus Huanglongbing. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 72, n. 3, p. 252-259, 2015.
- ORDAX, M. *et al.* A survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper : the induction of the viable but nonculturable (VBNC) state. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3482-3488, 2006.
- ORDAX, M. *et al.* Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state. **Journal of Applied Microbiology**, United Kingdom, v. 107, n. 1, p. 106–116, 2009.
- ORDAX, M. *et al.* Exopolysaccharides favor the survival of *Erwinia amylovora* under copper stress through different strategies. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 7, p. 549-555, 2010.
- PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. **Programa de melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas**: resultados e perspectivas. Colombo: Embrapa, 2011. 64 p.
- PAPPAS, M. C. R. *et al.* Genome-wide discovery and validation of Eucalyptus small RNAs reveals variable patterns of conservation and diversity across species of Myrtaceae. **BMC Genomics**, London, v. 16, n. 1113, p. 1-13, 2015.
- PASCHOALATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.;

BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. p. 390-421.

PAULIN, J. P. *Erwinia amylovora*: General Characteristics, Biochemistry and Serology. In: VANNESTE, J.L. **Fire blight**: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, Wallingford: Oxford University Press, 2000. p. 87–115.

PEREIRA, R. S. *et al.* Cost of forest insurance in the economic viability of eucalyptus plants. **Revista Arvore**, Viçosa, v. 42, n. 3, p. 1-9, 2018.

PINTO, D.; SANTOS, M. A.; CHAMBEL, L. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. **Critical Reviews in Microbiology**, Londres, v. 41, n. 1, p. 61–76, 2015.

REZENDE, J. A. M.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BEDENDO, I. P. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. p. 27-43.

RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C. F.; YAMASHIRO, T. A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 4, p. 345-350, 1987.

ROTT, P. *et al.* Population dynamics of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane plants as determined with an antibiotic-resistant mutante. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 3, p. 241-247, 1994.

SANTANDER, R. D. *et al.* In planta recovery of *Erwinia amylovora* viable but nonculturable cells. **Trees - Structure and Function**, Heidelberg, v. 26, n. 1, p. 75–82, 2012.

SANTANDER, R. D.; BIOSCA, E. G. *Erwinia amylovora* psychrotrophic adaptations: evidence of pathogenic potential and survival at temperate and low environmental temperatures. **PeerJ**, Corte Madera, CA, v. 5, n. e3931, p. 1-26, 2017.

SCHROTH, M. *et al.* Risks of releasing wild-type and genetically engineered biocontrol organisms into the ecosystem. In: TJAMOS, E. C.; PAPAIVIZAS, G. C.; COOK, R. J. (Ed.). **Biological control of plant diseases**: progress and challenges for the future. Plenum Press, c1992. (NATO ASI series. Series A, Life sciences, v. 230). p. 371-379. Trabalho publicado no Proceeding do NATO Advanced Research Workshop Held 1991, Cape Sounion, Greece.

SCHAAD, N. W.; WHITE, W. C. Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, Minn, v. 64, n. 12, p. 1518-1520, 1974.

SIKIROU, R.; WYDRA, K. Persistence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* in weeds and crop debris and identification of *Sphenostylis*

stenocarpa as a potential new host. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 9, p. 939–947, 2004.

SILVA, V. A. V.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Sobrevivência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em Meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 381-386, 2006.

SILVA, A. M. F. *et al.* SOBREVIVÊNCIA DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* EM TECIDO INFECTADO DE VIDEIRA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 757-765, 2012.

SILVA, J. C. **Sobrevivência de *xanthomonas campestris* pv. *campestris* no solo, no filoplano e na rizosfera de plantas daninhas.** 2015. Dissertação (Mestre em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, 2015.

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

SILVA JÚNIOR, T. A. F. *et al.* Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* associated with soil and cauliflower crop debris under Brazilian conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.156, n. 2, p. 399-411, 2020.

SOBICZEWSKI, P.; MIKICIŃSKI, A.; DYKI, B. Survival of *Erwinia amylovora* in Dead Apple Leaf Tissue. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1056, n. 1056, p. 71-75, 2014.

TAKACS, D. J. **Persistence of the bacterium *Erwinia carnegiana* in soil and its relationship to the establishment and survival of saguaro (*Carnegiea gigantea*) cacti.** 1967. Thesis (Masters of Science) - Faculty of the Department of Plant Pathology, University of Arizona, Tucson, 1967.

TONIN, M. F. **Caracterização taxonômica de espécies do gênero *Xanthomonas*.** 2012. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

TREVORS, J. T.; FINNEN, R. L. Introduction and recovery of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from agricultural soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 126, n. 1, p.141-143, 1990.

VAN OVERBEEK, L. S. *et al.* Ecology and epidemiology the low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, v. 94, n. 5, p. 463-469, 2004.

WINGFIELD, M. J. *et al.* Eucalypt pests and diseases: Growing threats to plantation productivity. **Southern Forests**, South Africa, v. 70, n. 2, p.139–

144, 2008.

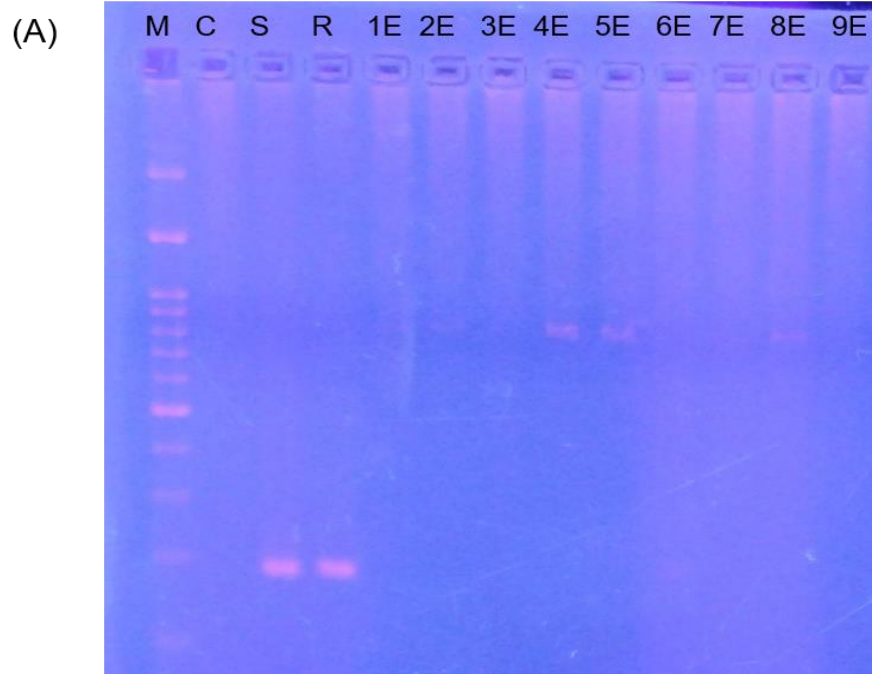
WOOD, T. K.; KNABEL, S. J.; KWAN, B. W. Bacterial persister cell formation and dormancy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 23, p. 7116-7121, 2013.

WRIGHT, H. D. The importance of adequate reduction of peptone in the preparation of media for the pneumococcus and other organisms. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, United States, v. 37, n. 2, p. 257-282, 1933.

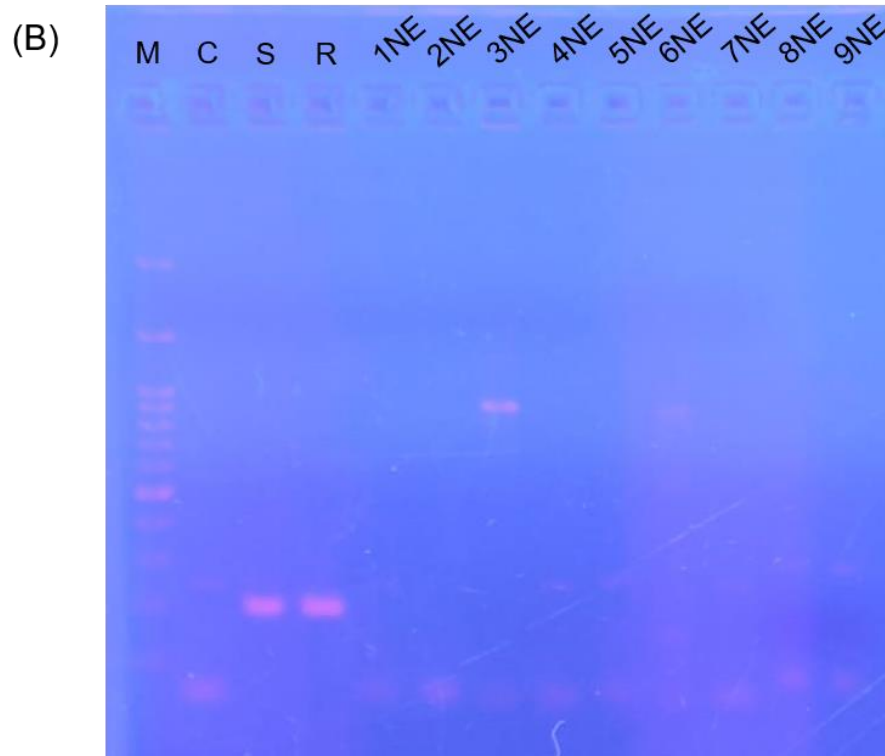
YILDIZ, H. N. *et al.* Potential Inoculum sources of tomato stem and pith necrosis caused by *Pseudomonas viridiflava* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Braunschweig, v. 111, n. 4, p. 380-387, 2004.

ZHAO, Y.; DAMICONE, J. P.; BENDER, C. L. Detection, Survival, and Sources of Inoculum for Bacterial Diseases of Leafy Crucifers in Oklahoma. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 8, p. 883–888, 2002.

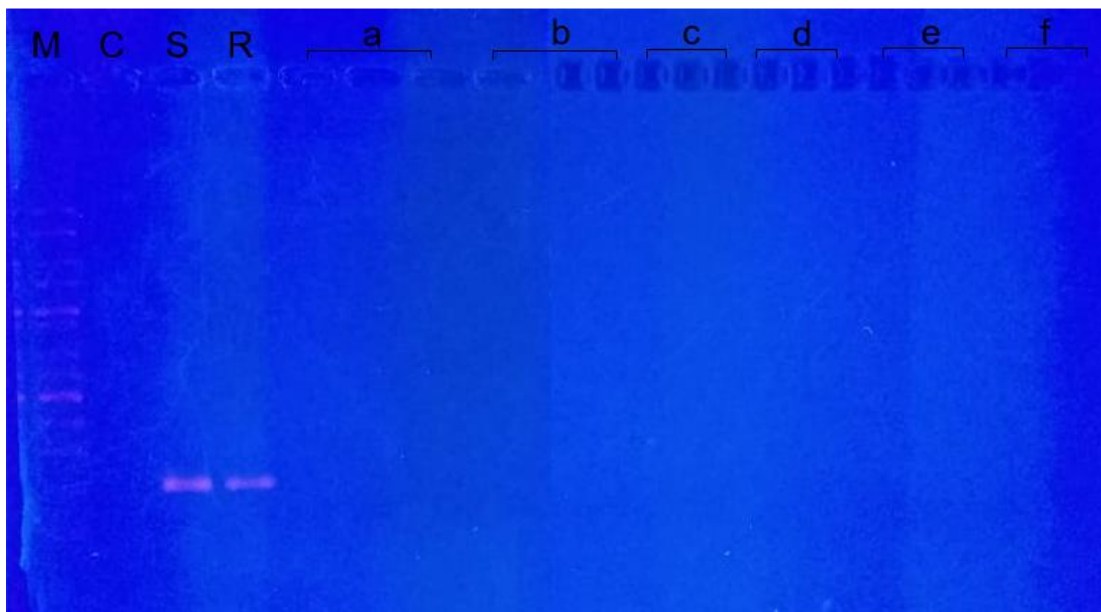
## 8 ANEXO



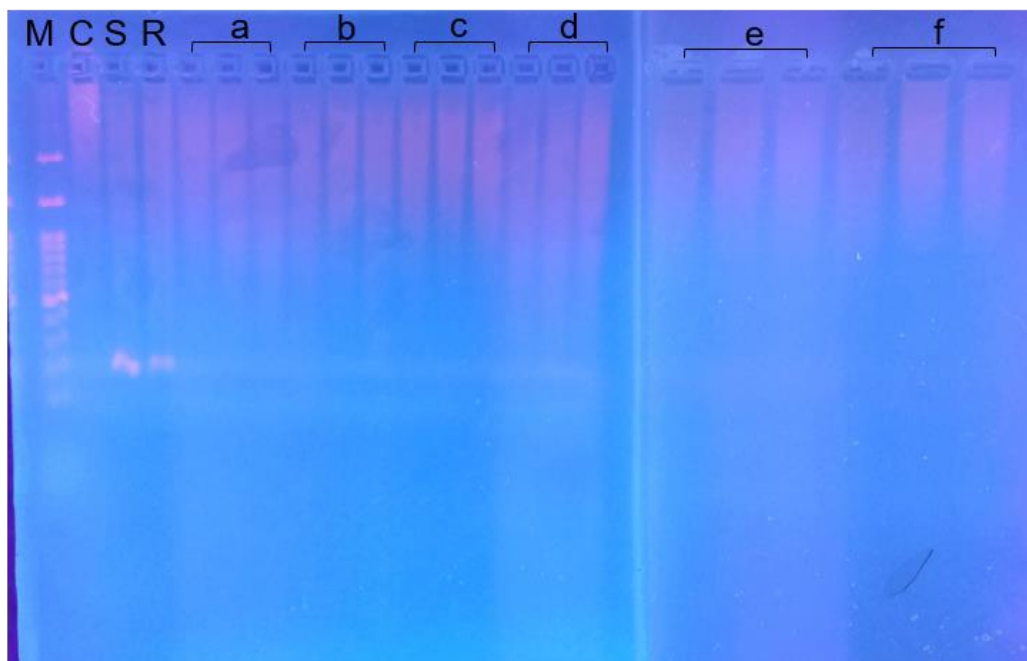




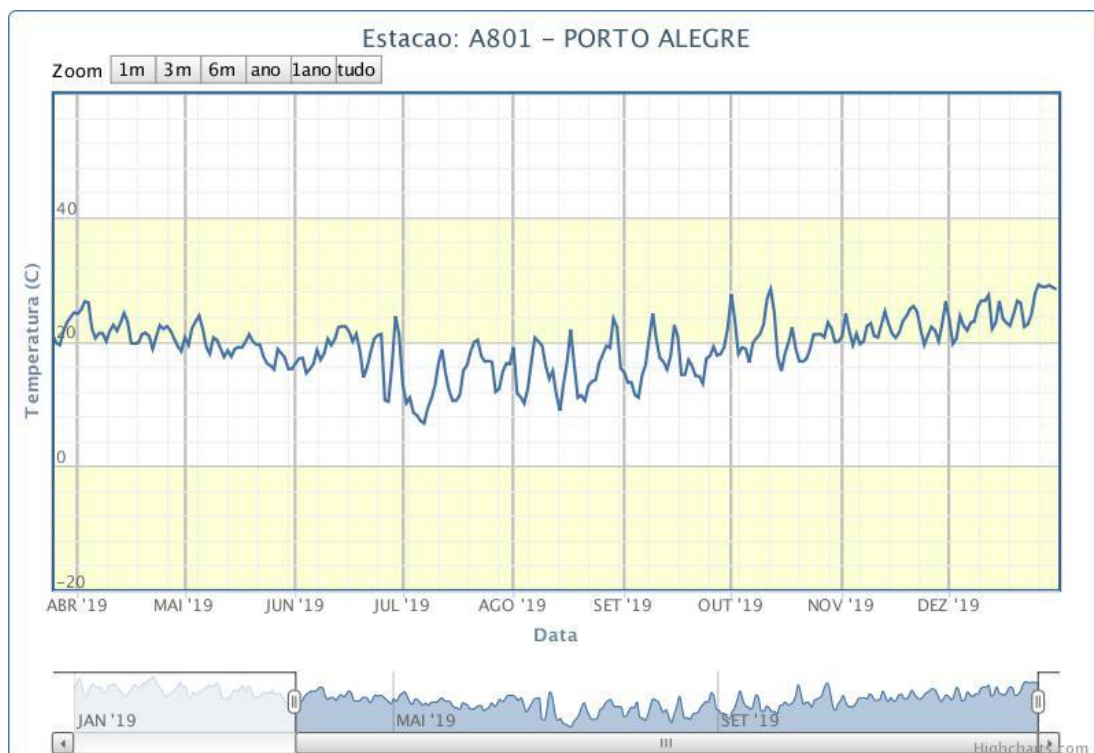
ANEXO 1. Eletroforese em gel de agarose oriunda de Bio-PCR das amostras de solo obtidas a partir de solo esterilizado (A) e não-esterilizado (B). Nos quais: M=marcador de peso molecular; C=controle negativo; S=selvagem (controle positivo); R=mutante à rifampicina (controle positivo); 1E-9E=número do copo com solo esterilizado; 1NE-9NE= número do copo com solo não esterilizado.



ANEXO 2. Eletroforese em gel de agarose oriunda de PCR das amostras de restos foliares em Solo esterilizado com os clones 32864 (a, b e c) e clone 37350 (d, e e f). Nos quais: M=marcador de peso molecular; C=controle negativo; S=selvagem (controle positivo); R=mutante à rifampicina (controle positivo); a = restos foliares do clone 32864 na profundidade 0; b = restos foliares do clone 32864 na profundidade 5; c = restos foliares do clone 32864 na profundidade 15; d = restos foliares do clone 37350 na profundidade 0; e = restos foliares do clone 37350 na profundidade 5; f = restos foliares do clone 37350 na profundidade 15.



ANEXO 3. Eletroforese em gel de agarose oriunda de PCR das amostras de restos foliares em Solo não esterilizado com os clones 32864 (a, b e c) e clone 37350 (d, e e f). Nos quais: M=marcador de peso molecular; C=controle negativo; S=selvagem (controle positivo); R=mutante à rifampicina (controle positivo); a = restos foliares do clone 32864 na profundidade 0; b = restos foliares do clone 32864 na profundidade 5; c = restos foliares do clone 32864 na profundidade 15; d = restos foliares do clone 37350 na profundidade 0; e = restos foliares do clone 37350 na profundidade 5; f = restos foliares do clone 37350 na profundidade 15.



ANEXO 4. Flutuação térmica da cidade de Porto Alegre nos períodos 04/19 a 12/19. Fonte: INMET,2019.