



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

Identificação de *Erwinia amylovora* por técnicas de ácidos nucleicos e bioquímicas

Maria da Conceição Lopes Amaro Martins Silva

Orientadores

Professor Doutor João Pedro Luz

Professor Carlos Gaspar dos Reis

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Fruticultura Integrada, realizada sob a orientação científica do Professor Coordenador, Doutor João Pedro Luz e do Professor Adjunto, Mestre Carlos Manuel Gaspar dos Reis da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Dezembro de 2013

Júri

Presidente

Doutora Maria Antonieta Piçarra Pereira

Professor Adjunto da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Vogais

Doutor João Pedro Martins da Luz

Professor Coordenador da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Mestre Carlos Manuel Gaspar dos Reis

Professor Adjunto da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Professor Adjunto da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Doutor Manuel Vicente de Freitas Martins

Professor Coordenador da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Aos meus filhos,
Rodolfo e Rodrigo

Este trabalho foi financiado por Fundos Nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto “PEst-OE/AGR/UI0681/2011”

Este trabalho foi financiado pelo Instituto Politécnico de Castelo Branco no âmbito do Programa de Apoio à Qualificação do Pessoal Não Docente.

Agradecimentos

Terminado este trabalho, manifesto o meu reconhecimento a todas as pessoas e instituições que de uma forma ou de outra contribuíram para a sua concretização.

Ao Professor Doutor João Pedro Luz que aceitou orientar este trabalho, pelo interesse, incentivo e competência, pelas sugestões e conhecimentos transmitidos, pela disponibilização de meios materiais, no âmbito do projeto “PEst-OE/AGR/UI0681/2011, para a realização da componente prática e pela ajuda na revisão do manuscrito e na redação do abstract.

Ao Professor Carlos Gaspar dos Reis que aceitou coorientar este trabalho, pela ajuda na instalação da técnica de identificação por ácidos nucleicos, pelas sugestões e ajuda na revisão do manuscrito.

À colega e amiga Lena Silva pela ajuda preciosa na instalação e leitura dos ensaios da componente prática, pelas sugestões e conhecimentos transmitidos e pelo apoio prestado nas tarefas inerentes ao Laboratório de Proteção Vegetal para que pudesse levar a cabo este trabalho.

À colega e amiga Manuela Goulão pela ajuda na instalação da técnica de identificação por ácidos nucleicos, instalação e leitura dos ensaios da componente prática, pela partilha de saber e amizade.

À colega Graça Diogo pelo apoio prestado no trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia e às colegas Conceição Vitorino e Cecília Gouveia pela dedicação manifestada no ensaio de titulação por método indireto.

À D. Fernanda Raposo pela prontidão na preparação do material de laboratório.

Ao Professor Doutor António Moitinho pelo incentivo na inscrição deste mestrado e pela disponibilização de meios materiais, através do projeto “PEst-OE/AGR/UI0681/2011, para a realização da componente prática.

Ao Professor Doutor António Ramos pela disponibilização de meios materiais, no âmbito do projeto “PEst-OE/AGR/UI0681/2011, para a realização dos ensaios laboratoriais.

À Professora Doutora Cristina Pintado pelos esclarecimentos prestados ao longo da realização da componente laboratorial.

À Dr.^a Eduarda Rodrigues pela disponibilidade e ajuda na revisão do manuscrito.

À Professora Doutora Fernanda Delgado pela amizade e carinho manifestado ao longo deste percurso e às Professoras Fátima Peres, Conceição Mesquita e Teresa Coelho pela amizade e incentivo para conclusão deste trabalho.

À Eng.^a Carmo Martins pelos esclarecimentos legislativos relativos à presença do fogo bacteriano em Portugal.

Ao Instituto Politécnico de Castelo Branco pelo apoio prestado no âmbito do Programa de Apoio à Qualificação do Pessoal não Docente.

À Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco pela disponibilidade dos meios envolvidos na realização da componente prática.

Aos meus pais pelo incentivo e carinho, especialmente à minha mãe pela sua ajuda durante a frequência do mestrado.

À minha sogra Stela Martins pelo carinho e amizade.

Ao Manuel António e aos meus filhos Rodolfo e Rodrigo, pelo amor, incentivo, compreensão e paciência que tiveram.

À memória da minha avó Antónia.

A todos o meu muito obrigado

Resumo

A bactéria *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* é o agente responsável pela doença vulgarmente designada por fogo bacteriano. A doença foi detetada pela primeira vez na Europa, em 1957, no sul de Inglaterra e desde então tem-se difundido por todo o continente europeu. Atualmente está presente em 49 países, distribuídos por todos os continentes, afetando fundamentalmente espécies da subfamília *Maloideae*, onde se incluem as pomoideas e ainda diversas espécies ornamentais ou silvestres.

Face à existência, no nosso país, de dois focos de fogo bacteriano assinalados, em 2006 e entretanto erradicados, e ao aparecimento de novos focos em 2010 e 2011, o combate e erradicação da doença é premente para que Portugal continue a gozar do estatuto de “zona protegida”. Para o efeito, considera-se fundamental a identificação e caracterização dos isolados bacterianos que estão a infetar os pomares portugueses.

Neste trabalho, foram avaliados 44 isolados obtidos, entre 2006 e 2011, de plantas sintomáticas de macieira e pereira. A identificação de *E. amylovora* foi realizada através de testes fisiológicos e bioquímicos, de PCR e de patogenicidade, de acordo com os procedimentos indicados pela EPPO e os definidos por outros autores.

Apenas 25% dos isolados evidenciaram paragem de crescimento a 36°C. Este número aumentou para 68% quando as colónias foram sujeitas a uma temperatura de 39°C. Esta constatação pode evidenciar uma adaptação da bactéria às nossas condições climáticas. A utilização do citrato de sódio, da L-ramnose e da amigdalina, verificada em alguns isolados, aponta para o facto de alguns isolados portugueses pertencerem ao grupo minoritário de estirpes que utilizam aqueles compostos.

Os isolados suspeitos de pertencerem à espécie *E. amylovora* mostraram-se pouco homogéneos no que respeita à caracterização bioquímica efetuada no sistema API 20E, dado que resultaram 21 perfis. Destes isolados, 65% mostraram ser positivos na identificação por ácidos nucleicos, com a técnica descrita por Bereswill *et al.* (1992) e 74% revelaram-se patogénicos em frutos imaturos de pera e nêspera. Somente metade dos isolados apresentou resultados coincidentes com o expectável para a bactéria *E. amylovora*.

Dos isolados estudados, 26% mostraram-se negativos para *E. amylovora*, uma vez que se revelaram, simultaneamente, negativos no teste de patogenicidade e na amplificação com os primers de Bereswill *et al.* (1992). Os isolados obtidos em 2010 e 2011, inoculados em pera e nêspera, produziram, de um modo geral, infeções mais rapidamente que os isolados obtidos entre 2006 e 2009, o que leva a presumir tratarem-se de isolados mais virulentos.

Considera-se de interesse continuar os estudos de caracterização fisiológica, bioquímica e molecular dos isolados portugueses, pois o conhecimento da bactéria *E. amylovora*, nas nossas condições, contribuirá para um melhor controlo e erradicação.

Palavras-chave: fogo bacteriano; macieira; pereira; *Malus domestica*; *Pyrus communis*; PCR.

Abstract

The bacterium *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* is the causal agent for the disease commonly known as Fire blight. The disease was first detected in Europe in 1957, in the south of England and since then has spread throughout the European continent. It is currently present in 49 countries across all continents, mainly affecting species of the Maloideae subfamily, where pome fruits and several ornamental or wild species are included.

Given the two outbreaks of fire blight in Portugal, reported in 2006 and apparently eradicated, and the new outbreaks in 2010 and 2011, control and eradication of the disease is urgent so that Portugal continues to enjoy the status of "protected area". For this purpose, it is fundamental to identify and characterise the bacterial strains that are infecting Portuguese orchards.

Forty-four isolates obtained from symptomatic pear and apple plant trees, between 2006 and 2011, were evaluated. *E. amylovora* identification was carried out by physiological and biochemical, PCR and pathogenicity tests, accordingly with the procedures set out by EPPO and the defined by other authors.

Only 25% of the isolates showed growth stop at 36°C, although this number increased to 68% when the colonies were subjected to a temperature of 39°C. This finding may show an adaptation of bacteria to our climatic conditions. The use of sodium citrate, L-rhamnose, and amygdalin by a few isolates, points to the fact that some Portuguese isolates belong to the minority group of strains that utilise these compounds.

Isolates suspected to be *E. amylovora* showed little homogeneity in the biochemical characterisation carried out on API 20E system, resulting 21 different profiles. Of these isolates, 65% showed to be positive in the identification by nucleic acids, with the technique described by Bereswill *et al.* (1992) and 74% proved to be pathogenic on immature fruits of pear or loquat. Results equal to the expected for *E. amylovora* were only shown by half of the isolates.

Twenty-six percent of the isolates showed not to be *E. amylovora*, since they were negative both in the pathogenicity testing and in the amplification with the Bereswill *et al.* (1992) primers. The isolates obtained in 2010 and 2011, inoculated in pear or loquat, produced, in general, infections faster than the isolates obtained between 2006 and 2009, leading to assume that they are more virulent isolates.

It is considered of great interest to continue the physiological, biochemical, and molecular characterisation studies of the Portuguese isolates, because knowledge of *E. amylovora* under Portuguese conditions will contribute to a better control and eradication.

Keywords: fire blight; apple tree; pear tree; *Malus domestica*; *Pyrus communis*; PCR.

Índice Geral

Agradecimentos	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
Índice Geral	xi
Índice de Figuras	xiv
Índice de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas	xvi
Publicações e comunicações	xvii
Introdução.....	1
1 Fogo bacteriano.....	2
1.1 Distribuição mundial e importância económica.....	2
1.2 Principais hospedeiros	5
1.3 Sintomatologia	5
1.4 Bioecologia	7
1.5 Meios de luta	10
1.5.1 Luta cultural	10
1.5.2 Sistemas de previsão.....	11
1.5.3 Luta química	12
1.5.4 Luta biológica	14
1.5.5 Luta biotécnica	14
1.5.6 Luta genética	15
2 <i>Erwinia amylovora</i>	15
2.1 Características culturais e bioquímicas	15
2.2 Características moleculares.....	18
2.2.1 Fatores de virulência	18
2.2.2 Suscetibilidade a antibióticos	19
2.2.3 Características genéticas.....	19

2.3	Métodos de diagnóstico e de identificação de <i>Erwinia amylovora</i>	20
2.3.1	Isolamento	21
2.3.2	Testes bioquímicos e fisiológicos	23
2.3.3	Deteção serológica	24
2.3.4	Deteção molecular	26
2.3.5	Testes de patogenicidade	27
3	Material e métodos	28
3.1	Isolados bacterianos	29
3.2	Isolamento em diferentes meios de cultura	29
3.3	Titulação por método indireto	31
3.4	Testes fisiológicos e bioquímicos	32
3.4.1	Coloração de Gram	32
3.4.2	Teste da oxidase	32
3.4.3	Crescimento em anaerobiose e mobilidade	32
3.4.4	Crescimento a 36°C e 39°C	33
3.4.5	Testes API	33
3.5	Deteção molecular por PCR	34
3.5.1	Preparação das colónias	34
3.5.2	Amplificação	34
3.5.3	Eletroforese em gel de agarose	35
3.5.4	Interpretação do resultado de PCR	35
3.6	Teste de patogenicidade	37
4	Resultados e discussão	38
4.1	Caraterísticas culturais	38
4.2	Crescimento em anaerobiose, mobilidade e crescimento a 36°C e 39°C	39
4.3	Sistemas API 20E e 50CH	41
4.4	Deteção molecular por PCR	45
4.5	Teste de patogenicidade	46
4.6	Identificação de <i>E. amylovora</i>	49
5	Conclusões	52
	Referências bibliográficas	54

Anexos	59
Anexo I. Distribuição mundial do fogo bacteriano	59
Anexo II. Hospedeiros de <i>Erwinia amylovora</i>	60
Anexo III. Suscetibilidade varietal de macieira e pereira ao fogo bacteriano.....	61
Anexo IV. Sensibilidade dos porta-enxertos de macieira e pereira ao fogo bacteriano ..	63
Anexo V. Isolamento de bactérias a partir de material vegetal infetado	64
Anexo VI. Composição dos meios de cultura e solução tampão	65
Anexo VII. Coloração de Gram	67
Anexo VIII. Teste da oxidase	68
Anexo IX. Teste API 20E	69
Anexo X. Teste API 50CH.....	70
Anexo XI. Preparação dos <i>primers</i>	71
Anexo XII. Preparação da solução tampão TAE 0,5x e do gel de agarose	72
Anexo XIII. Preparação do marcador.....	73
Anexo XIV. Preparação do brometo de etídio.....	75
Anexo XV. Conservação das peras.....	76
Anexo XVI. Teste patogenicidade em peras e nêspas	77
Anexo XVII. Resultados do PCR e concentrações amplificadas.....	78
Anexo XVIII. Resultado da inoculação de fatias de pera em dois estados de imaturidade	79
Anexo XIX. Resultado do teste API 50CH	80
Anexo XX. Resultado do teste API 20E.....	81

Índice de Figuras

Figura 1. Distribuição mundial de <i>Erwinia amylovora</i> (EPPO, 2012a).	3
Figura 2. Plantas afetadas pelo fogo bacteriano. Foto gentilmente cedida pelo Prof. João Pedro Luz.	6
Figura 3. Raminhos jovens apresentando o sintoma característico designado de “cajado de pastor”. Foto gentilmente cedida pelo Prof. João Pedro Luz.	7
Figura 4. Exsudados bacterianos. Foto gentilmente cedida pelo Eng. Bruno Fernandes.	8
Figura 5. Ciclo biológico do fogo bacteriano, causado por <i>Erwinia amylovora</i> , em macieira e pereira. (traduzido e adaptado de Johnson, 2000).	9
Figura 6. Curva de calibração para <i>Erwinia amylovora</i>	32
Figura 7. Separação eletroforética do ensaio prévio. Poços: 2, 3 e 4 - PS 0100 ($6,2 \times 10^8$, $6,2 \times 10^5$ e $6,2 \times 10^2$ ufc.mL ⁻¹); 5, 6 e 7 - CFBP 1430 ($0,3 \times 10^8$, $0,3 \times 10^5$ e $0,3 \times 10^2$ ufc.mL ⁻¹); 8, 9 e 10 - EA 0300 ($1,1 \times 10^9$, $1,1 \times 10^6$ e $1,1 \times 10^3$ ufc.mL ⁻¹); 11, 12 e 13 - EA 0410 ($5,5 \times 10^8$, $5,5 \times 10^5$ e $5,5 \times 10^2$ ufc.mL ⁻¹); 14 - controlo sem DNA; 1 e 15 - marcador de DNA de 100 bp.	36
Figura 8. Crescimento em King B (A), agar nutritivo com 5% de sacarose (B) e CCT (C).	38
Figura 9. Resultado dos testes API 20E, para o isolado EA 0310 e API 50 CH para o isolado EA 0300.	42
Figura 10. Separação eletroforética. Poços: 2 e 3 - CFBP 1430 ($2,6 \times 10^5$ e $2,6 \times 10^4$ ufc.mL ⁻¹); 4 e 5 - EA 0340 ($3,5 \times 10^5$ e $3,5 \times 10^4$ ufc.mL ⁻¹); 6 e 7 - EA 0350 ($5,7 \times 10^5$ e $5,7 \times 10^4$ ufc.mL ⁻¹); 8 e 9 - EA 0360 ($4,1 \times 10^5$ e $4,1 \times 10^4$ ufc.mL ⁻¹); 10 e 11 - EA 0370 ($1,4 \times 10^5$ e $1,4 \times 10^4$ ufc.mL ⁻¹); 12 e 13 - EA 0380 ($3,8 \times 10^5$ e $3,8 \times 10^4$ ufc.mL ⁻¹); 14 - controlo sem DNA; 1 e 15 - marcador de DNA de 100 bp.	46
Figura 11. Presença de exsudado em peras imaturas ao 4.º (A) e 7.º dia (B) após inoculação com o isolado EA 0330 e controlo positivo com a estirpe CFBP 1430 (C) e controlo negativo com PBS ao 5.º dia após inoculação (D).	48
Figura 12. Presença de exsudado em nêspersas imaturas ao 13.º dia após inoculação com o isolado EA 0120 (A, B e C), controlo positivo com a estirpe CFBP 1430 (D e E) e controlo negativo com PBS (F, G e H).	48
Figura 13. Presença de exsudado em nêspersas imaturas, ao 13.º dia após inoculação, com os isolados EA 0070, EA 0170, EA 0180 e EA 0210.	51

Índice de Tabelas

Tabela 1. Características culturais, fisiológicas e bioquímicas de <i>Erwinia amylovora</i> e produção de ácidos a partir de ácidos orgânicos (adaptado de Holt <i>et al.</i> , 1994).	17
Tabela 2. Características das colônias de <i>Erwinia amylovora</i> nos meios de cultura habitualmente usados para o isolamento (adaptado de Paulin, 2000).	18
Tabela 3. Testes de identificação nutricional e enzimática para <i>Erwinia amylovora</i> (EPPO, 2004).	23
Tabela 4. Leitura expectável para <i>Erwinia amylovora</i> nos testes API 20E e API 50CH (EPPO, 2004).	24
Tabela 5. Isolados bacterianos usados no estudo.	30
Tabela 6. Correspondência entre a absorvância a 600 nm e a concentração de <i>E. amylovora</i> . ..	31
Tabela 7. Concentrações bacterianas testadas no ensaio prévio de PCR.	36
Tabela 8. Características culturais dos isolados nos meios de cultura NSA, King B e CCT.	39
Tabela 9. Crescimento em anaerobiose, mobilidade e crescimento a 36 °C e 39 °C.	41
Tabela 10. Leitura dos sistemas de identificação API 20E e API 50CH padronizada pela EPPO para <i>Erwinia amylovora</i> e leitura da estirpe CFBP 1430 (controlo positivo).	42
Tabela 11. Leitura dos isolados nos sistemas de identificação API 20E e 50CH.	43
Tabela 12. Códigos API 20E obtidos nos isolados.	44
Tabela 13. Resultado do API 50CH para os isolados estudados.	45
Tabela 14. Resultado do teste PCR, pela metodologia convencional de Bereswill <i>et al.</i> (1992). ..	46
Tabela 15. Resultados do teste de patogenicidade em frutos imaturos.	47
Tabela 16. Amostras positivas no teste de patogenicidade, para <i>Erwinia amylovora</i> , em cada ano de isolamento.	49
Tabela 17. Resumo do resultado dos testes.	50

Lista de Abreviaturas

DGADR	Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural
DGAV	Direção-Geral de Alimentação e Veterinária
DRAPC	Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
MADRP	Ministério da Agricultura, de Desenvolvimento Rural e das Pescas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
VBNC	Viável mas não cultivável
NSA	<i>Sucrose nutrient agar</i> - Agar nutritivo com sacarose (Billing <i>et al.</i> , 1961)
MS	Meio de cultura de Miller-Schroth, 1972
CCT	Meio de cultura de Ishimaru & Klos, 1984

Publicações e comunicações

Realizadas no âmbito do projeto final de mestrado

Amaro C & Luz JP. 2012. O Fogo Bacteriano - Fire Blight. Agroforum - Revista da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, 29: 6-17.

Amaro C, Luz JP & Reis C. 2013. Identificação de isolados portugueses de *Erwinia amylovora*. II Jornada “Potencial Técnico e Científico do IPCB”, 27 de novembro, Castelo Branco.

Luz JP & Amaro C. 2011. Estudo do Fogo Bacteriano na região centro de Portugal. Seminário Fogo Bacteriano: uma abordagem mundial, 27 e 28 de outubro, Óbidos.

Luz JP & Amaro C. 2013. O Fogo Bacteriano. Vida Rural, 1785: 24-26.

Luz JP & Amaro C. 2013. O Fogo Bacteriano. Voz do Campo, 160: 16-17.

Luz JP & Silva MCA. 2012. O fogo bacteriano das pomoideas em Portugal. In Ciclo de Conferências do Conselho Técnico Científico da ESACB, Castelo Branco. (hdl.handle.net/10400.11/1400).

Introdução

A bactéria *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* é o agente responsável pela doença vulgarmente designada por fogo bacteriano (Vanneste, 2000; EPPO, 2012a) e foi a primeira bactéria descrita, em 1893 por Burrill, como agente causador de doença infecciosa nas plantas (Johnson, 2000; EPPO, 2004). Por este facto ocupa um lugar especial na história da Fitopatologia.

O fogo bacteriano já foi presenciado em cerca de 200 espécies vegetais de 40 géneros, todos pertencentes à família *Rosaceae* (Van der Zwet & Keil, 1979). Afeta, fundamentalmente a subfamília *Maloideae*, onde se incluem as pomoideas e ainda diversas espécies ornamentais ou silvestres (Palacio-Bielsa & Cambra, 2009).

O fogo bacteriano foi detetado pela primeira vez na Europa, em 1957, no sul de Inglaterra e desde então tem-se difundido por todo o continente europeu. Atualmente a doença está presente em 49 países, distribuídos pelos cinco continentes, provocando graves prejuízos económicos na produção mundial de pomoideas. Os prejuízos podem ser gerados pela diminuição da rentabilidade do pomar e pela morte das plantas, bem como pela impossibilidade de efetuar exportações para países onde a doença está ausente.

Uma vez que a severidade do ataque está fortemente relacionada com as condições climáticas, o impacto económico gerado pela doença nem sempre é fácil de quantificar. No entanto e de acordo com Earth Trampler Consulting (2005) os surtos severos conduzem ao prejuízo de milhões de dólares como consequência da diminuição da produção e da morte das árvores. De acordo com a mesma empresa, estima-se que nos EUA, 5% das quebras de produção anuais são devidas ao fogo bacteriano, correspondendo a uma diminuição de 100 milhões de kg e 35,6 milhões de dólares. O surto de fogo bacteriano ocorrido em 2000, no sudoeste do Michigan, EUA, destruiu 250.000 macieiras e afetou a produção em mais de 1.000 hectares, estimando-se um prejuízo de 9 milhões de dólares. Também Fatmi (2011) refere quebras de 55 milhões de euros, apenas durante os quatro primeiros anos da doença em Marrocos.

O fogo bacteriano é uma doença altamente contagiosa e por isso de rápida difusão. Por não existirem meios químicos eficazes para o seu controlo, o recurso a meios de diagnóstico para evitar a entrada do organismo em zonas isentas da doença ou a sua deteção precoce, permitindo a destruição do material infetado, são fundamentais para o seu combate e erradicação (DGADR *et al.*, 2011; Powney *et al.*, 2011).

A bactéria *Erwinia amylovora* está classificada como organismo de quarentena na União Europeia (Santander *et al.*, 2012) e Portugal detém o estatuto de “zona protegida”. Este reconhecimento é obtido como resultado dos exames oficiais anuais, efetuados no âmbito do programa nacional de prospeção deste organismo (DGADR *et al.*, 2011).

Face à existência no nosso país, de dois focos de fogo bacteriano assinalados em 2006 e entretanto erradicados, e ao aparecimento de novos focos em 2010 e 2011, o combate e

erradicação da doença é premente para que Portugal continue a gozar do estatuto de “Zona protegida”. Para o efeito, considera-se fundamental a identificação e caracterização dos isolados bacterianos que estão a infetar os pomares portugueses.

O aparecimento do fogo bacteriano em Portugal constitui uma ameaça para a nossa fruticultura, com particular destaque para as cultivares nacionais de pera Rocha e maçã Bravo de Esmolfe. Até ao início deste trabalho, dispunha-se de escassa informação sobre as características dos isolados portugueses de *E. amylovora*. Consideramos que o seu estudo pode proporcionar dados úteis para a dispersão da doença e, conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento e aplicação de métodos para a sua erradicação ou controlo.

O objetivo deste trabalho prende-se com a caracterização de uma coleção de isolados portugueses de *E. amylovora* e a sua comparação com o isolado de referência CFBP 1430. Este objetivo assenta nos seguintes pontos: revisão bibliográfica sobre o fogo bacteriano e os aspetos fenotípicos e genotípicos da bactéria *E. amylovora*; confirmação da identificação presumível da coleção de isolados de *E. amylovora* e determinação do seu poder patogénico; caracterização fenotípica dos isolados através de utilização de diferentes meios de cultura, testes bioquímicos e fisiológicos; identificação genotípica dos isolados por meio da técnica de identificação por ácidos nucleicos.

1 Fogo bacteriano

1.1 Distribuição mundial e importância económica

O fogo bacteriano foi descrito, pela primeira vez, em 1780, no estado de Nova York e, posteriormente, estendeu-se às zonas do Canadá, aos outros estados da zona atlântica, assim como à costa do Pacífico. A doença foi detetada em 1920 na Nova Zelândia, em 1957 no sul de Inglaterra, em 1966 nos Países Baixos e em 1960 no Egito (Bereswill *et al.*, 1992; Palacio-Bielsa & Cambra, 2009; Montesinos, 2011). Desde então, estendeu-se por quase toda a Europa, afetando países de norte a sul do continente. Em Espanha, foi detetada pela primeira vez no País Basco, na província de Guipúscoa em 1995, a 10 km da fronteira com a França (Balduque *et al.*, 1996; Palacio-Bielsa & Cambra, 2009; Montesino, 2011). Novos focos foram surgindo e de 1995 a 2011 foi identificada em Navarra, Catalunha, Aragão, Castela e Leão, Madrid, Cantábria, Extremadura e, recentemente, em Alicante e Andaluzia. De acordo com os dados da EPP0 e referidos por Palacio-Bielsa *et al.* (2009), os países mais recentemente afetados (de 2005 a 2007) foram a Bielorrússia, a Letónia, a Síria e Marrocos. Neste último, a doença surgiu em 2006, em Meknès num pomar de pereira, macieira e marmeleiro (Fatmi, 2011). Em 2007, surgiram cinco novos pomares com plantas infetadas mas ainda no mesmo condado. No ano seguinte, a doença expandiu-se a cinco novos condados, afetando 60 pomares. Estima-se que a área afetada pela doença, nestes dois primeiros anos, tenha sido de 620 ha. O arranque de 53,5 ha de área afetada

não impediu a propagação da doença e em 2010, o fogo bacteriano já tinha atingido todas as principais zonas de produção de pomeioideas (Fatmi, 2011; Yaich *et al.*, 2011).

No início de 2012, a lista dos países que manifestam a presença do fogo bacteriano ascendeu a 49, distribuídos por todos os continentes (Figura 1 e Anexo I). Em 2011, registou-se o aparecimento da doença na Argélia e apesar do primeiro foco ter sido detetado em 2005, a Lituânia foi referenciada, pela EPPO, apenas em 2010 (EPPO, 2012a). A doença pode estar presente em outros países, mas ainda não foi observada ou notificada (Luz, 2011).

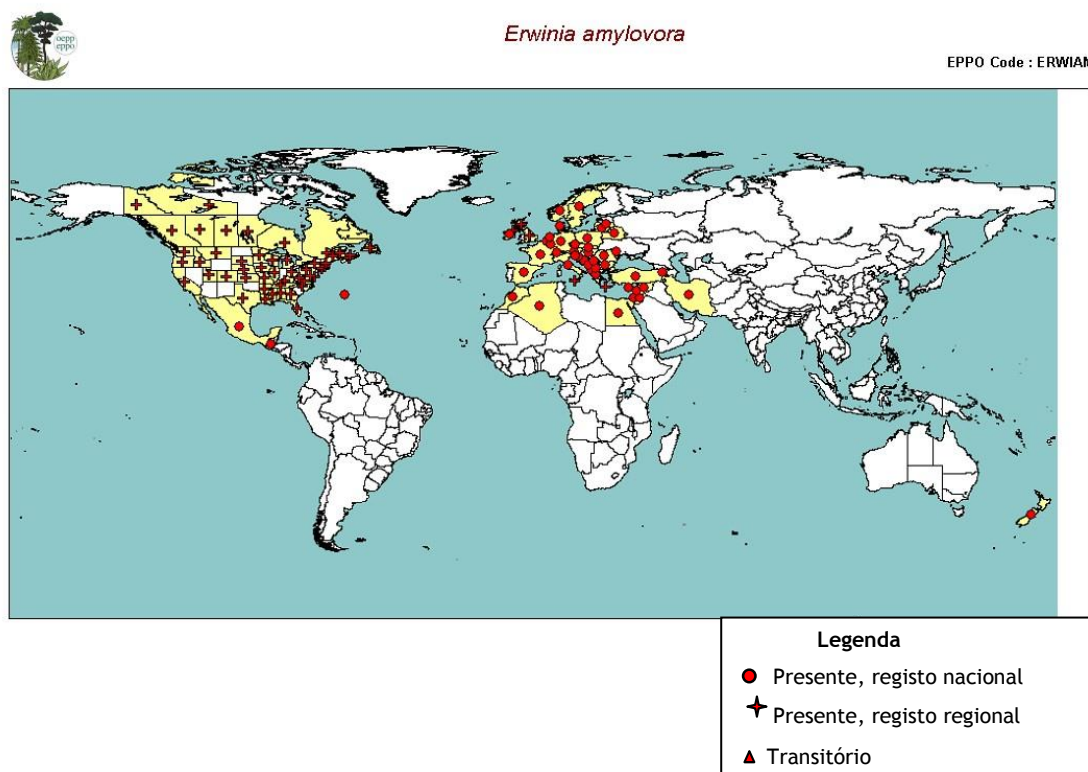


Figura 1. Distribuição mundial de *Erwinia amylovora* (EPPO, 2012a).

Constata-se que a doença é consideravelmente mais grave em regiões quentes e húmidas do que nas mais frias e/ou secas (Bonn & Van der Zwet, 2000), o que pode evidenciar o alto risco de perigosidade em Portugal (Luz, 2011).

De acordo com Palacio-Bielsa & Cambra (2009), o impacto económico provocado pelo fogo bacteriano deve-se, fundamentalmente, ao facto de afetar espécies de grande interesse comercial, nomeadamente pereira, macieira, nespereira, marmeleiro e várias espécies ornamentais, de ser altamente contagioso e por isso de rápida expansão e ainda ao facto de não existirem métodos de combate eficazes.

Quando as condições climáticas são favoráveis e as variedades muito sensíveis, a doença progride rapidamente, provocando uma quebra na produção das árvores e, conseqüentemente, uma diminuição da rentabilidade do pomar (Palacio-Bielsa & Cambra, 2009; DGADR, 2011). Na Suíça, as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do fogo bacteriano ocorridas em 2000 e 2007, associadas à utilização de cultivares sensíveis em grande parte dos pomares de

macieira, foram responsáveis por uma quebra acentuada na produção de maçã para sidra e consequentemente no produto transformado (Silvestri & Egger, 2011).

O fogo bacteriano tem também consequências negativas para o setor viveirista de espécies fruteiras e ornamentais, já que afeta a produção e proíbe a exportação para países onde não foi declarada a doença (Hale *et al.*, 1996).

De acordo com Fatmi (2011), estima-se que em Marrocos, desde o aparecimento da doença em 2006 até 2010, cerca de 2000 ha de pomares, fundamentalmente de pereira e marmeleiro, foram arrancados e as plantas incineradas, provocando quebras de rendimento de 55 milhões de euros.

Uma vez que, em muitos países, o fogo bacteriano é provavelmente a doença mais grave que afeta a pereira e a macieira, representa uma enorme ameaça para a produção e para a indústria destas espécies (EPPO, 2004).

Portugal é reconhecido, ao nível da comunidade europeia, como “zona protegida” para o fogo bacteriano. No entanto e face à existência de dois focos de fogo bacteriano assinalados, na primavera de 2006, em pomares de pereiras e macieiras situados na Póvoa da Atalaia e em Vale de Prazeres, no concelho do Fundão, cujos primeiros isolamentos foram realizados na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco (Luz & Amaro, 2011), foi emitida a Circular n.º 2/DSF/2006 de 10 de agosto e a Portaria n.º 908/2006 de 4 de setembro que estabelece medidas adicionais e de emergência temporária de proteção fitossanitária destinadas à erradicação, no território nacional, da bactéria *Erwinia amylovora*. De acordo com informação disponibilizada pelo MADRP, através do Boletim Técnico de junho de 2010, desde o aparecimento daqueles primeiros focos e até 2010 não existiram novas notícias confirmadas de focos de fogo bacteriano (Cruz, 2010). Contudo, neste mesmo ano são referenciados novos focos de fogo bacteriano em alguns concelhos da zona do Oeste, designadamente em Alcobaça, Bombarral, Caldas da Rainha e Torres Vedras (Serra & Sousa, 2011). No ano seguinte, surgem novos focos em alguns concelhos do Oeste, na zona Centro (Guarda e Viseu) e no Alentejo (Alandroal e Ferreira do Alentejo). O aparecimento dos novos focos, conduziu à publicação da Portaria n.º 287/2011, de 31 de outubro, que estabelece medidas adicionais de proteção fitossanitária destinadas ao controlo, no território nacional, da bactéria de quarentena *E. amylovora*, com vista à sua erradicação e, quando esta não for possível, à sua contenção. O aparecimento e a dispersão da doença no território nacional levaram ainda à publicação do Manual de Boas Práticas para o Controlo do Fogo Bacteriano - *Erwinia amylovora* (DGADR *et al.*, 2011). A 30 de março de 2012 foram publicadas recomendações da Assembleia da República ao Governo para adoção de um programa nacional de erradicação do fogo bacteriano em Portugal, para a apresentação de um plano nacional para o controlo da doença e para a avaliação de fontes de financiamento para ressarcir os agricultores e viveiristas de prejuízos sofridos (Recomendações da Assembleia da República n.º 32/2012 e n.º 34/2012, D.R., 1.ª série, n.º 57 de 20 de março). A DGAV publicou, em abril de 2012, o Plano de Ação Nacional para o Controlo do Fogo Bacteriano.

Apesar da deteção dos novos focos, a EPPO classifica o nosso país como manifestando ausência de fogo bacteriano, pelo que Portugal continua a gozar do estatuto de Zona Protegida (EPPO, 2012a). Para que este estatuto não seja retirado é fundamental o combate e erradicação da doença. A bactéria é oficialmente considerada erradicada da zona contaminada se, no âmbito

das prospeções oficiais efetuadas nessa zona, pelo menos duas vezes por ano, entre a primavera e o outono, não for detetada a sua presença ou os seus sintomas, durante dois ciclos vegetativos (Portaria n.º 287/2011, de 31 de outubro).

1.2 Principais hospedeiros

O fogo bacteriano possui como hospedeiros naturais espécies da família *Rosaceae*. A maioria das espécies afetadas pela doença pertence à subfamília *Maloideae* onde se incluem as pomoideas: pereira, macieira e marmeleiro que pertencem, respetivamente aos géneros *Pyrus*, *Malus* e *Cydonia*, a nespereira [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] e diversas espécies ornamentais ou silvestres dos géneros *Crataegus*, *Cotoneaster*, *Pyracantha*, *Sorbus*, *Chaenomeles* e *Stranvaesia* (Ordax, 2008; Palacio-Bielsa & Cambra, 2009). Pertencentes às restantes subfamílias assinalam-se o género *Rubus* (*Rosoideae*) e a espécie *Prunus salicina* Lindl. (*Amygdaloideae*). Na subfamília *Spiraeoideae* foram descritas algumas espécies sensíveis mas apenas através de inoculações experimentais (Van der Zwet & Keil, 1979; Momol & Aldwinckle, 2000). Os hospedeiros principais e secundários, identificados pela EPPO (2012a), encontram-se enumerados no Anexo II.

Em Portugal, a doença foi identificada, até ao final de 2011, em pereira (*Pyrus communis* L.), macieira (*Malus domestica* Borkh.) e marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) (DGADR *et al.*, 2011).

1.3 Sintomatologia

Os sintomas de fogo bacteriano, na maioria dos hospedeiros mais comuns (pereira, macieira, marmeleiro, nespereira, cotoneaster, espinheiro e pircanta) são muito similares e facilmente reconhecidos (EPPO, s/d). A designação de fogo bacteriano deve-se aos sintomas mais caraterísticos apresentados pelas plantas, nomeadamente o aspeto acastanhado dos ramos, flores e folhas, assemelhando-se este aspeto ao da queima provocada pelo fogo (Figura 2) (Santander *et al.*, 2012).

A infeção pode iniciar-se em plantas de qualquer idade, incluindo as plantas jovens de viveiro (Montesinos & López, 2000). Os primeiros sintomas aparecem no início da primavera, com tempo húmido e quente, durante a floração ou, mais precocemente, no momento do abrolhamento (Palacio-Bielsa & Cambra, 2009). Nas plantas de pereira e de macieira, os botões florais começam a murchar até mudarem da cor castanha para preta, e por vezes escorrem gotas viscosas de exsudado bacteriano que contém grande número de células bacterianas (Montesinos & López, 2000).



Figura 2. Plantas afetadas pelo fogo bacteriano. Foto gentilmente cedida pelo Prof. João Pedro Luz.

Quando as condições são favoráveis, a bactéria avança de forma sistêmica e a infecção progride rapidamente alcançando as folhas, ramos secundários e principais, tronco e inclusive raízes (Vanneste & Eden-Green 2000). A murchidão nos raminhos jovens leva à perda de rigidez dos tecidos e estes curvam-se de forma característica. Esta aparência toma a designação de cajado de pastor ou aspeto de bordão (Figura 3) (Ordax, 2008; Cruz, 2011).

Nas folhas, o sintoma inicia-se com uma necrose na nervura principal e posteriormente aparecem manchas necróticas distribuídas irregularmente pela superfície do limbo. A necrose vai avançando até as folhas ficarem castanhas na macieira e castanhas escuras ou pretas na pereira, podendo, no entanto, ficar agarradas à árvore durante muito tempo (EPPO, s/d).

Os frutos apresentam zonas infetadas com aspeto oleoso ou de gotas de água. Posteriormente adquirem um tom castanho que progride para preto e muitas vezes, apresentam gotas pegajosas de exsudado bacteriano. Também os frutos permanecem agarrados à árvore durante muito tempo.

Lesões características castanho-avermelhadas são encontradas muitas vezes na zona dos tecidos subcorticais. Na casca dos ramos, pernasas, ou mesmo do tronco desenvolvem-se cancos de cor castanha a negra. O colo da planta e as raízes podem também ser afetados pela bactéria, provocando rapidamente a morte da planta (Johnson, 2000; Aldwinckle, 2011).

Em condições de humidade elevada, aparecem exsudados bacterianos, esbranquiçados ou castanho-avermelhados, em todos os órgãos da planta (Figura 4) (Melgarejo *et al.*, 2010). Estes exsudados contém milhões de bactérias pelo que são importantes fatores de dispersão da doença (Cambra *et al.*, 2002). No que respeita à temperatura, Johnson (2000) refere que a temperatura ótima para o desenvolvimento da bactéria é de 27°C, no entanto a divisão celular pode ocorrer entre os 5°C e os 31°C, o que corresponde a um amplo intervalo de temperatura.



Figura 3. Raminhos jovens apresentando o sintoma característico designado de “cajado de pastor”. Foto gentilmente cedida pelo Prof. João Pedro Luz.

1.4 Bioecologia

Embora o ciclo da bactéria ainda não seja bem conhecido, sabe-se que ela pode sobreviver, durante períodos variáveis de tempo, como endófito ou epífita, dependendo dos fatores climáticos (Thomson, 2000). O desenvolvimento dos sintomas de fogo bacteriano está associado ao desenvolvimento vegetativo da planta hospedeira, ou seja, o ciclo da doença inicia-se na primavera com a produção de inóculo primário e a infecção das flores, continua durante o verão com a infecção de raminhos e frutos, e termina no princípio do outono com a formação de cancrios (Figura 5). A bactéria permanece latente durante o período de repouso vegetativo da planta hospedeira (Palacio-Bielsa & Cambra, 2009).

No início da primavera, quando as condições climáticas são favoráveis, ocorre a multiplicação da bactéria e forma-se o inóculo primário. Este vai dar origem às primeiras infecções do período vegetativo, surgindo a infecção primária. Estas células podem ter origem nos exsudados dos cancrios que se formaram no ano anterior (Aldwinckle, 2011) ou em bactérias que permanecem nos tecidos das plantas (Van der Zwet *et al.*, 1988, cit. Palacio-Bielsa *et al.*, 2009). É consensual para diversos autores, que os cancrios formados no final do ciclo vegetativo anterior são os principais responsáveis pela produção de inóculo primário. As bactérias não hibernam nos tecidos necrosados dos cancrios mas sim nos tecidos adjacentes que aparentam estar sãos.



Figura 4. Exsudados bacterianos. Foto gentilmente cedida pelo Eng. Bruno Fernandes.

As bactérias que se multiplicam no início da primavera podem ser disseminadas a curta distância pela chuva, vento, insetos, máquinas ou objetos de poda (Melgarejo, 2010), assim como a longa distância através do transporte de material vegetal infetado e aves migratórias. Após atingir os tecidos do potencial hospedeiro, nomeadamente as flores e os jovens raminhos, e em condições de elevada humidade, a bactéria penetra nos tecidos através das aberturas naturais como estomas e feridas provocadas pela queda das pétalas ou por feridas causadas por diversos agentes externos, nomeadamente feridas provocadas pelo granizo, picaduras de insetos e poda, por exemplo. Quando as condições climáticas são favoráveis e o hospedeiro apresenta sensibilidade, a bactéria multiplica-se rapidamente e a infeção avança no sentido descendente invadindo pedúnculos, ramos, raminhos jovens ou frutos imaturos. Os tecidos afetados, que inicialmente parecem humedecidos, tornam-se avermelhados ou acastanhados e acabam por necrosar (Thomson, 2000; Ordax, 2008; Palacio-Bielsa & Cambra, 2009; Montesinos, 2011).

Depois de originadas as infeções primárias, produz-se grande quantidade de inóculo secundário. As principais fontes de inóculo secundário são os exsudados formados nos rebentos, folhas, frutos ou ramos e podem ser produzidos durante a primavera, verão e outono. As infeções secundárias são habitualmente mais numerosas do que as infeções primárias e podem causar maiores prejuízos nas plantas. O inóculo secundário pode ser disseminado pelos agentes bióticos e abióticos atrás mencionados (Thomson, 2000; Ordax, 2008; Palacio-Bielsa & Cambra, 2009).

Com a chegada do outono, inicia-se a paragem do ciclo vegetativo. A multiplicação da bactéria diminui ou cessa e instala-se nos tecidos lenhificados produzindo então os cancrios nos ramos e nos troncos, acompanhados da necrose dos tecidos. No início do inverno, a bactéria para o seu crescimento e fica alojada nos cancrios dos ramos e troncos, podendo originar novas infeções na primavera seguinte (Cambra *et al.*, 2002; Ordax, 2008; Palacio-Bielsa & Cambra, 2009).

Os ladrões que emergem da raiz e do tronco sendo muito sensíveis às infeções bacterianas, são importantes veículos de transmissão da bactéria ao tronco e ao sistema radicular provocando rapidamente a morte da planta (Evans *et al.*, 2008; Aldwinckle, 2011).

De acordo com Cambra *et al.* (2002), a principal via de dispersão da doença a longa distância é a introdução de material vegetal contaminado, nomeadamente através da plantação de fruteiras e plantas ornamentais, assim como a utilização de material vegetal para enxertia, proveniente de zonas afetadas pelo fogo bacteriano. Uma vez instalado o primeiro foco numa nova zona, os insetos, especialmente os polinizadores, a chuva, o vento, a rega por aspersão, os instrumentos de poda e outros utensílios, a maquinaria e até o próprio agricultor, disseminam a bactéria com facilidade entre árvores e parcelas próximas.

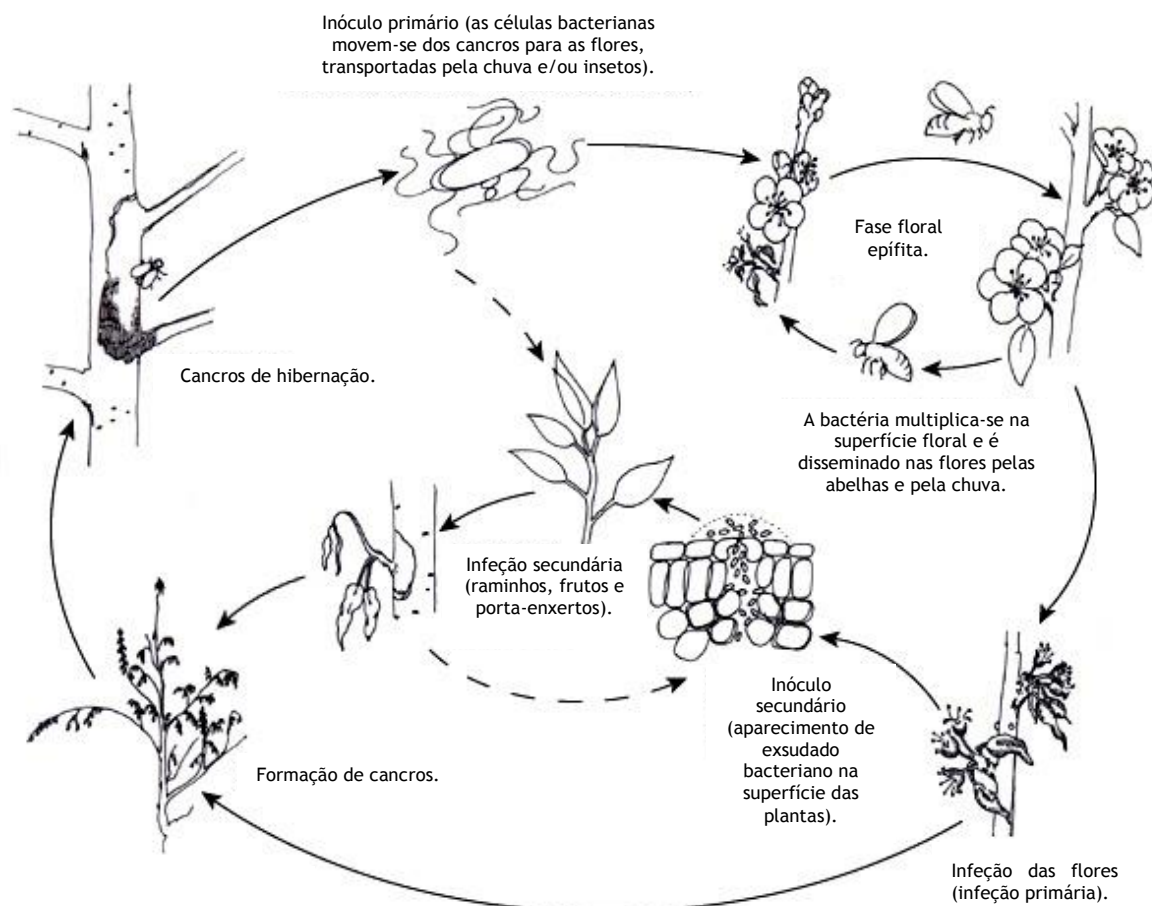


Figura 5. Ciclo biológico do fogo bacteriano, causado por *Erwinia amylovora*, em macieira e pereira. (traduzido e adaptado de Johnson, 2000).

A formação de cancos está dependente da espécie hospedeira, da cultivar, das condições ambientais e da idade e estado nutricional da planta. As árvores jovens e vigorosas são mais suscetíveis ao fogo bacteriano do que as mais velhas ou com menores crescimentos. Assim, as árvores adubadas com excesso de fertilizantes azotados crescem mais rapidamente e tornam-se mais suscetíveis às infecções face às que têm um balanço nutricional mais equilibrado. A taxa de formação e de expansão dos cancos também pode ser atribuída a elevados teores de água no solo. Este excesso pode ser devido a regas excessivas ou frequentes ou ainda à má drenagem dos solos (Johnson, 2000).

1.5 Meios de luta

Uma vez que não existem meios de luta totalmente eficazes contra o fogo bacteriano, o seu combate deve ser efetuado com base numa estratégia integrada que assenta não só, em medidas que visam reduzir o inóculo, mas também evitar o estabelecimento da bactéria no hospedeiro, e ainda diminuir a suscetibilidade deste à infeção (Cambra *et al.*, 2002; Norelli *et al.*, 2003).

Durante o último século, as estratégias de luta focalizaram-se na utilização de tratamentos antimicrobianos e cúpricos com o propósito de prevenir a infeção ou reduzir o inóculo. Nos últimos anos, têm sido realizados estudos no sentido de aumentar a resistência dos hospedeiros através de meios químicos e genéticos (Norelli *et al.*, 2003).

A estratégia integrada de combate consiste em utilizar todas as ferramentas disponíveis e que incluem tanto os sistemas de previsão (predição) de risco como as medidas de luta baseadas na prevenção e na convivência com a doença (Montesinos *et al.*, 2009; Montesinos, 2011).

1.5.1 Luta cultural

A adoção de medidas preventivas para evitar a introdução da doença torna-se indispensável. Uma destas medidas consiste na utilização de material vegetal isento da bactéria. Assim, não podem ser introduzidas plantas ou qualquer material vegetal (para enxertia ou porta-enxertos) proveniente de zonas ou países onde a doença está presente, salvo se dispuserem de todas as garantias sanitárias. Como consequência, a aquisição de plantas que são potenciais hospedeiras da doença, deve ser efetuada em viveiros autorizados e as plantas devem fazer-se acompanhar do respetivo passaporte fitossanitário com a menção ZP:b2 (Zona Protegida para o organismo *Erwinia amylovora*) (DRAPC, 2012b). Caso sejam efetuadas plantações com material proveniente de países afetados pela doença, mesmo sendo as plantas acompanhadas pelo passaporte fitossanitário ZP:b2, devem realizar-se inspeções periódicas durante a primavera, verão e outono. Esta necessidade prende-se com o facto de poderem ter sido introduzidas plantas assintomáticas portadoras de bactérias endófitas de *Erwinia amylovora* ou em que estas estejam presentes num nível abaixo do limite de deteção das técnicas utilizadas na despistagem da doença.

Também o transporte de frutos maduros acarreta riscos, embora baixos, de disseminação de *E. amylovora*. Os estudos de Ordax *et al.* (2009), em frutos maduros de maçã, demonstraram que a bactéria pode adotar o estado “viável mas não cultivável” (VBNC), durante pelo menos 35 dias, em condições de stresse semelhantes às utilizadas no transporte dos frutos para comercialização. Por este facto, a importação de frutos provenientes de zonas infetadas também não deve ser descurada.

A colaboração dos agricultores nas inspeções regulares é fundamental. A observação de qualquer sintoma suspeito deve ser comunicado de imediato às entidades oficiais para que sejam tomadas as medidas de erradicação dos focos iniciais da doença. Só a deteção precoce do fogo bacteriano permite adotar, rapidamente, as medidas de erradicação necessárias e impedir que a doença se instale (Cambra *et al.*, 2002; Montesinos, 2011).

Devem ser tomadas em consideração medidas de caráter agronómico, especialmente, nas zonas onde a doença já se instalou.

Algumas medidas eficazes para minimizar os surtos de fogo bacteriano são a não utilização de cultivares e porta-enxertos sensíveis ou muito sensíveis (Anexos III e IV) nas novas plantações (Wilcox, 1994; Steiner, 2000; Ordax, 2008) e a não plantação de espécies ornamentais hospedeiras de *E. amylovora* junto de pomares (Evans *et al.*, 2008; Ordax, 2008). As podas drásticas devem ser evitadas porque estimulam a rebentação excessiva e os crescimentos jovens são mais sensíveis à instalação do inóculo (Wilcox, 1994). Durante o período de repouso vegetativo devem ser removidos todos os tecidos afetados incluindo os cancrios (Evans *et al.*, 2008). Também ao longo do ciclo vegetativo devem ser retirados todos os órgãos da planta que apresentem sintomas da doença (Steiner, 2000). O período crítico corresponde à época de floração primaveril, no entanto deve ser dada atenção similar às florações tardias (Evans *et al.*, 2008; Ordax, 2008). Os ramos ladrões, sendo muito sensíveis à doença, são veículos importantes para a formação de cancrios no tronco e nos porta-enxertos pelo que devem ser retirados (Aldwinckle, 2011). De acordo com Montesinos (2011), a poda deverá ser realizada durante o período de repouso vegetativo. Durante o ciclo vegetativo a poda em verde deverá ser evitada, só sendo aconselhável a poda fitossanitária durante este período. O material proveniente da poda de árvores contaminadas deve ser queimado no próprio local para evitar a propagação do inóculo. Em situação de infeção generalizada por toda a planta, esta deve ser arrancada e queimada (Fatmi, 2011). Para obviar a propagação da doença, o material de poda deve ser desinfetado entre cada corte, com uma solução alcoólica ou de hipoclorito de sódio, especialmente durante o período de atividade vegetativa das plantas (Steiner, 2000; Evans *et al.*, 2008). As fertilizações devem ser equilibradas, especialmente a azotada, pois o excesso de azoto promove a rebentação jovem que é mais suscetível ao fogo bacteriano (Johnson, 2000; Evans *et al.*, 2008). A expansão dos cancrios bacterianos também pode ser incrementada por elevados teores de humidade no solo, quer devido a regas excessivas ou frequentes, quer devido à má drenagem do solo (Johnson, 2000). Outra medida para evitar a dispersão da bactéria prende-se com o combate aos insetos vetores como afídios, cigarrinhas e psilas (Wilcox, 1994; Johnson, 2000; Evans *et al.*, 2008).

1.5.2 Sistemas de previsão

A informação disponibilizada pelos sistemas de previsão de risco de fogo bacteriano, contribui para a realização de tratamentos nos momentos mais oportunos, isto é, quando os riscos de desenvolvimento da doença são mais elevados (Billing, 2000), para programar as datas para as inspeções, colheita de amostras e de poda (Johnson, 2000) e ainda delimitar as áreas com maiores riscos de contágio (Montesinos *et al.*, 2009). De facto, o risco de infeção não é uniforme ao longo do ciclo cultural, pois depende, fundamentalmente, da combinação dos seguintes fatores: da quantidade de inóculo e da virulência do agente patogénico, da sensibilidade do

hospedeiro e das condições climáticas, nomeadamente da temperatura e disponibilidade de água, quer seja proveniente da chuva ou orvalho (Montesinos *et al.*, 2009).

Os primeiros modelos de previsão que surgiram eram mais simples do que os atuais, pois previam o risco de infeção em função do limiar térmico de 18°C (modelos de Powell y Mills) ou entre 14,5°C e 16,5°C (modelo de Thomson) durante a floração, conjuntamente com a humidade relativa elevada ou chuva (Billing, 2000; Montesinos *et al.*, 2009). Posteriormente, foram desenvolvidos modelos mais complexos que, para além dos parâmetros climáticos, incluem a atividade dos insetos como agentes dispersores da doença. Salienta-se o Sistema de Billing Original (BOS), o Sistema de Billing Corrigido (*Revised*) (BRS) e o Sistema de Billing Integrado (BIS95 e BIS98), em que a partir dos parâmetros climáticos de temperatura e humidade e dados fenológicos, permitem determinar, não só o início das infeções, como também o período de incubação e, conseqüentemente, o momento de aparecimento dos sintomas (Billing, 2000). O modelo Parefeu integrou o potencial de risco associado às condições climáticas ao potencial de inóculo. Este é obtido através dos dados históricos do local (Montesinos *et al.*, 2009).

Atualmente, os modelos de previsão mais utilizados são os designados por Maryblyt e Cougarblight (Carter, 2010).

O modelo Maryblyt foi o primeiro modelo totalmente informatizado. A partir de dados relativos a temperaturas máximas e mínimas diárias, chuva ou orvalho, tipo de fruteira e dados fenológicos, são calculados os graus-dia (GD) e os graus-hora (GH). Entram em funcionamento três subsistemas com diferentes limiares, a partir dos quais se determina a percentagem de flores suscetíveis de serem infetadas, a percentagem de flores infetadas pela bactéria e o desenvolvimento dos sintomas depois de iniciadas as infeções. A evolução dos sintomas em ramos e cancos também pode ser determinada por este modelo. O modelo Maryblyt permite então determinar os momentos de infeção e de desenvolvimento das várias fases da doença, pressupondo, no entanto, a existência do inóculo na zona em causa (Montesinos, 2011).

O modelo Cougarblight prevê o risco de infeção bacteriana mas não o seu desenvolvimento não determinando assim o aparecimento dos sintomas. O modelo baseia-se no pressuposto de que a bactéria sobrevive nas flores, durante três a cinco dias. Utiliza na sua função os valores de temperatura, precipitação e humidade para o período de floração. Este modelo introduz ainda diferentes níveis para o potencial de inóculo. Com base nos valores de temperatura obtêm-se os valores de graus-dia (GD) e os graus-hora (GH) dos últimos quatro dias (96 horas). Caso ocorra chuva ou humidade elevada num período superior a três horas, em função destes parâmetros climáticos e do potencial de inóculo, estabelece-se o risco de infeção classificando-o em baixo, moderado, alto e extremo (Montesinos *et al.*, 2009).

1.5.3 Luta química

A luta química, como medida de contenção do desenvolvimento bacteriano, consiste na aplicação de produtos de carácter bacteriostático ou bactericida (cobre e antibióticos) e outros que estimulam os mecanismos de defesa das plantas (Ordax, 2008). Dado que se dispõe de um número muito limitado destes produtos, a aplicação mostra-se, geralmente, pouco eficaz

(Montesinos *et al.*, 2009). Para além disso, a maioria dos produtos disponíveis mostra uma débil penetração nos tecidos vegetais, não atuando a nível sistémico, pelo que apenas podem evitar o estabelecimento e penetração da bactéria na planta (Donat, 2004).

Os produtos cúpricos baseiam-se na libertação controlada do ião cobre (Montesinos, 2011). Os exsudados bacterianos contêm compostos capazes de solubilizar o cobre, causando a morte celular ou a inibição de algumas atividades biológicas na célula, no entanto não deverão ser usados após a ponta verde uma vez que podem provocar sintomas de fitotoxicidade prejudicando folhas e frutos (Psallidas & Tsiantos, 2000; Ordax, 2008; DGADR *et al.*, 2011). Os estudos de Ordax *et al.* (2006) mostram que o cobre pode induzir o estado “viável mas não cultivável” (VBNC) da bactéria. Este estado pode ser uma estratégia de sobrevivência do organismo face às condições adversas provocadas pela presença do cobre. Quando as condições adversas desaparecem, as células VBNC podem multiplicar-se, podendo infetar de novo o hospedeiro.

Os antibióticos são os produtos que têm apresentado melhores resultados no combate químico ao fogo bacteriano, especialmente a estreptomicina (Psallidas & Tsiantos, 2000). No entanto, a sua utilização está proibida na União Europeia, consequência da possibilidade de transferência de resistências a bactérias patogénicas que infetam o homem e os animais (Psallidas & Tsiantos, 2000; Ordax, 2008). Na Suíça, onde o agente patogénico é considerado como não podendo ser erradicado, a utilização da estreptomicina é autorizada para o combate ao fogo bacteriano em situações pontuais (Holliger, 2012). Nos EUA, onde a aplicação de antibióticos é permitida e a estreptomicina apresenta problemas de resistência, os estudos com antibióticos alternativos a esta substância continuam a ser realizados (Agaskaveg *et al.*, 2011).

Existem outro tipo de compostos químicos que, não apresentando ação inibitória direta sobre a bactéria, possuem atividade contra o fogo bacteriano. Salienta-se o fosetil-alumínio e a prohexadiona-cálcio (Montesinos *et al.*, 2009). O fosetil-alumínio tem demonstrado bons resultados em determinadas concentrações e condições, mas os resultados de campo têm mostrado alguma falta de consistência (Ordax, 2008). A prohexadiona-cálcio é um regulador de crescimento utilizado para controlar o vigor em plantas de macieira e pereira e apresenta uma eficácia moderada no combate ao fogo bacteriano (Montesinos *et al.*, 2009). A prohexadiona-cálcio não tem atividade antimicrobiana contra *Erwinia amylovora*, no entanto, ao reduzir o vigor das plantas através das giberelinas de síntese, aumenta a resistência do hospedeiro à doença (Norelli *et al.*, 2003). Aplicações de prohexadiona-cálcio em árvores jovens, com 2 a 5 anos de idade, poderá trazer inconvenientes graves porque pode comprometer o desenvolvimento das plantas e consequentemente a instalação do pomar (Norelli *et al.*, 2003; Ordax, 2008).

Em Portugal, não existem produtos fitofarmacêuticos autorizados para combate à doença (DGADR *et al.*, 2011). Contudo, foram recentemente concedidas autorizações de uso, ao abrigo do artigo n.º 51 do Regulamento (CE) n.º 1107/2009, “Usos Menores”, aos produtos com base em prohexadiona-cálcio e fosetil-alumínio. Os produtos cúpricos (oxicloreto de cobre), homologados e autorizados para as pomoideas, também podem ser aplicados para redução do inóculo, ao abrigo do mesmo Regulamento (DGADR, 2012; DRAPC, 2012a).

1.5.4 Luta biológica

Os métodos de luta biológica são complementares aos métodos de luta química e baseiam-se no uso de bactérias antagonistas ou competidores de *Erwinia amylovora* (Johnson & Stockwell, 2000). A maioria destas bactérias são associadas a plantas, como *Pantoea agglomerans* (Ewing & Fife) Gavini *et al.* [=*E. herbicola* (Löhnis) Dye] ou *Pseudomonas fluorescens* (Flügge) Migula e ainda *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (Donat, 2004; Bonaterra *et al.*, 2007; Montesinos *et al.*, 2009). A aplicação destes microrganismos mostra-se mais eficaz durante a floração uma vez que a sua atividade se baseia em impedir a infeção e colonização das flores por *E. amylovora*. No entanto, a sua eficácia está muito dependente das condições ambientais (Bonaterra *et al.*, 2007). Quando as condições são favoráveis, vários microrganismos podem colonizar pereiras, macieiras e outras plantas hospedeiras e diminuir o inóculo de *E. amylovora*, mas se as condições não são as ideais, não atingem a concentração necessária para exercerem a luta biológica expectável. Um acentuado declínio na população de muitos agentes de luta biológica, já foi observado em ensaios de campo quando as condições ambientais são desfavoráveis. Esta situação pode ser devida ao facto de a superfície foliar ser transitoriamente inadequada para o crescimento bacteriano, devido às mudanças bruscas de disponibilidades de água, temperatura, radiação UV e nutrientes, a que estão sujeitas. Tem-se procurado resolver estes problemas, designadamente, através da utilização de procedimentos de osmo Adaptação e formulações adequadas para o produto, assim como com o recurso à utilização de misturas de estirpes com efeito sinérgico. Em Portugal, foi concedida autorização extraordinária, para a utilização do fungo *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud, estirpes DSM 14940 e DSM 14941, para ser aplicado durante a floração (Nunes & Martins, 2012; Selectis, s/d) e autorização, ao abrigo do reconhecimento mútuo, para a utilização de *B. subtilis* na luta contra o fogo bacteriano (DGADR, 2012).

1.5.5 Luta biotécnica

A nível da luta biotécnica, têm sido testados metabolitos produzidos por microrganismos antagonistas de *E. amylovora*, extratos de plantas ou péptidos antimicrobianos (Montesinos *et al.*, 2009). Babosa *et al.* (2007) descreveram péptidos antimicrobianos sintéticos (undecapéptidos lineares) que possuem eficácia semelhante à da estreptomicina na luta contra o fogo bacteriano, em condições de ambiente controlado. Em Portugal, foi concedida autorização extraordinária para a utilização do produto à base de um polissacárido (laminarina), para ser aplicado desde o botão verde até à queda das pétalas (Nunes & Martins, 2012; Selectis, s/d).

Também têm sido realizados estudos de termoterapia em material vegetal destinado à propagação vegetativa (Montesinos *et al.*, 2009). Em plantas sujeitas a 45°C durante 1 hora, diminui significativamente a população bacteriana não sendo afetado o abrolhamento do material vegetal. Temperaturas de 45°C durante 70 minutos ou 50°C durante 50 minutos são suficientes para destruir as culturas bacterianas, apesar de terem sido notadas algumas variações entre isolados (Paulin, 2000). Contudo, a termoterapia continua a ter um carácter experimental, pois carece de mais estudos sobre o efeito da temperatura na viabilidade do material vegetal.

1.5.6 Luta genética

O melhoramento genético para o fogo bacteriano iniciou-se com a procura de cultivares naturalmente resistentes à doença, no entanto observou-se que, a suscetibilidade não é apenas conferida pelo genótipo mas também pelas condições ambientais e pelas práticas culturais (Ordax, 2008). Uma vez que tem sido impossível obter cultivares com genes resistentes à doença pelo método tradicional, a engenharia genética parece ser uma alternativa atrativa nesta matéria (Norelli & Aldwinckle, 2000).

Face à crescente severidade de fogo bacteriano em macieiras instaladas em porta-enxertos M9 e M26, tornou-se prioritário o desenvolvimento de estudos para obtenção de porta-enxertos resistentes ao fogo bacteriano (Norelli *et al.*, 2003). Estes estudos conduziram à obtenção, pela Universidade de Cornell (EUA), dos porta-enxertos Geneva resistentes à doença. De acordo com Aldwinckle (2011), os porta-enxertos Geneva, para além de mostrarem resistência ao fogo bacteriano, conferem uma eficiência produtiva cumulativa igual ou superior ao M9, especialmente o Geneva 41 e o Geneva 935.

2 *Erwinia amylovora*

2.1 Características culturais e bioquímicas

O género *Erwinia*, designação atribuída em memória do fitopatologista Erwin F. Smith (Campbell, 1983), foi inicialmente criado para agrupar as enterobactérias associadas às plantas que são bacilos Gram-negativos, móveis e não formadores de esporos (López *et al.*, 2009). Esta definição levou a um agrupamento artificial dos microrganismos em três grupos: o grupo *amylovora* para os organismos que causavam emurchecimento e necroses; o grupo *carotovora* para os causadores de podridões radiculares e o grupo *herbicola* para as bactérias saprófitas (Paulin, 2000). Esta heterogeneidade de espécies conduziu a várias reclassificações do género *Erwinia*. Com os avanços das técnicas moleculares, as espécies do género *Erwinia*, tendo por base a comparação da sequência do DNA ribossómico 16S, foram agrupadas em quatro grupos filogenéticos (Paulin, 2000; Ordax, 2008; López *et al.*, 2009). De acordo com os mesmos autores, o grupo I representa as verdadeiras erwinias e compreende as espécies *E. amylovora*, *E. persicina* Hao *et al.*, *E. psidii* Rodrigues Neto *et al.*, *E. rhapontici* (Millard) Burkholder e *E. tracheiphila* (Smith) Bergey *et al.* que provocam murchidão e necroses nas plantas ou podem ser epífitas. O grupo II inclui as espécies que provocam podridões num grande leque de hospedeiros devido à sua atividade pectolítica e inclui as espécies do género *Pectobacterium* como *P. cacticida* (Alcorn *et al.*) Hauben *et al.*, *P. carotovorum* (Jones) Waldee, *P. chrysanthemi* (Burkholder *et al.*) Brenner *et al.* [atualmente *Dickeya chrysanthemi* (Burkholder *et al.*) Samson *et al.*] e *P. cypripedii* (Hori) Hauben *et al.* O grupo III inclui várias espécies que provocam cancrios e exsudados em plantas lenhosas, englobando as espécies do género *Brenneria* como *B. alni* (Surico *et al.*) Hauben *et al.*,

B. nigrifluens (Wilson *et al.*) Hauben *et al.*, *B. paradisiaca* (Fernandez-Borrero & Lopez-Duque) Hauben *et al.* [atualmente *Dickeya paradisiaca* (Fernandez-Borrero & Lopez-Duque) Samson *et al.*], *B. quercina* (Hildebrand & Schroth) Hauben *et al.*, *B. rubrifaciens* (Wilson *et al.*) Hauben *et al.* e *B. salicis* (Day) Hauben *et al.* Finalmente, o grupo IV abarca espécies saprófitas ou patogênicas que são frequentemente oportunistas de plantas, animais ou do homem e contém a espécie *Pantoea agglomerans* (Ewing & Fife) Gavini *et al.*, *P. ananatis* (Serrano) Mergaert *et al.* e *P. stewartii* (Smith) Mergaert *et al.*

As células de *E. amylovora* têm aproximadamente 0,3 µm x 1-3 µm, são anaeróbias facultativas e estão rodeadas de uma cápsula visível ao microscópio ótico (Paulin, 2000). São móveis por meio de dois a sete flagelos peritriciais. A mobilidade celular é mais intensa quando o pH do meio varia de 6 a 9 e quando as células crescem a temperaturas entre os 18-25°C decrescendo fortemente quando as temperaturas se elevam para valores acima dos 30°C (Raymundo & Ries, 1980a). A mobilidade da bactéria está associada a uma quimiotaxia específica, que depende das condições de temperatura e de pH, indicando Raymundo & Ries (1980b) os valores ótimos de 20-28°C para a temperatura e 6-8 para o pH. A mobilidade celular facilita as infecções na superfície da planta, no entanto as células perdem a mobilidade quando atingem o apoplasto. Simultaneamente, aumenta a atividade dos genes que provocam patogenicidade (genes *hrp*) na planta (Cesbron *et al.*, 2006) existindo uma relação inversa entre a mobilidade e a virulência.

A *E. amylovora* possui uma cápsula de exopolissacarídeos composta por galactose, glucose, manose e ácido urónico (Paulin, 2000; López *et al.*, 2009) que poderão estar relacionados com a patogenicidade (Donat, 2004). A fração lipídica dos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa é similar à das restantes *Enterobacteriaceae*, ao contrário da fração de hidratos de carbono que apresenta algumas diferenças (Ray *et al.*, 1986). Podem ocorrer pequenas diferenças entre isolados patogênicos e não patogênicos de *E. amylovora*.

A *E. amylovora* apresenta uma série de características, quer culturais quer fisiológicas, que permitem diferenciá-la de outras espécies de *Erwinia* (Paulin, 2000). Dessas características destaca-se o crescimento anaeróbio débil, a formação de colônias levaniformes quando cultivadas em agar nutritivo com sacarose, a ausência de crescimento a 36°C, a produção de substâncias redutoras da sacarose, a produção de ácidos a partir de compostos orgânicos (ribose, trealose, arabinose, sorbitol, frutose, glucose, galactose e sacarose), a utilização de citrato, lactato e formato, mas não de tartarato, galacturonato e malonato. A *E. amylovora* requer ácido nicotínico para crescimento em meio mínimo. Uma vez que esta exigência não é comum a todas as espécies de *Erwinia*, foi proposto este teste bioquímico para a sua caracterização (Holt *et al.*, 1994).

Na Tabela 1 apresentam-se as características culturais, fisiológicas e bioquímicas de *E. amylovora* referidas por Holt *et al.* (1994).

Kim *et al.* (1999) descreveram uma nova espécie, *E. pyrifoliae* Kim *et al.*, que causa necroses e sintomas similares ao fogo bacteriano, em pereira japonesa (nashi), mas apresenta características diferentes de *E. amylovora* quer sob o ponto de vista genotípico quer fenotípico. Em abril de 1999, em Espanha foi isolada uma bactéria que provocava sintomas, nas plantas, semelhantes aos provocados por *E. amylovora*, nomeadamente nos botões florais, no entanto

estes não progrediam para outras partes da planta. A bactéria foi isolada em pomares de pereira e uma vez que apresentava características diferentes de *E. amylovora*, Roselló *et al.* (2006) e López *et al.* (2011) propuseram classificar esta bactéria como pertencente a uma nova espécie atribuindo-lhe a designação de *E. piriflorinigrans* López *et al.*

Tabela 1. Características culturais, fisiológicas e bioquímicas de *Erwinia amylovora* e produção de ácidos a partir de ácidos orgânicos (adaptado de Holt *et al.*, 1994).

Caraterísticas		Produção de ácido a partir de compostos orgânicos	
Mobilidade	+	D-adonitol	-
Crescimento anaeróbio	débil	L-arabinose	débil
Produção de pigmentos	-	Celobiose	-
Produção de levana	+	Dextrina	-
Crescimento a 36°C	-	Dulcitol	-
H ₂ S a partir de cisteína	-	Esculina	-
Substâncias redutoras da sacarose	+	Frutose	+
Produção de acetoina	+	D-galactose	+
Produção de urease	-	D-glucose	+
Degradação de pectato	-	α-metil-D-glucósido	-
Oxidação de gluconato	-	Glicerol	-
Gás a partir de D-glucose	-	Mio-inositol	-
Hidrólise da caseína	-	Inulina	-
Liquefação da gelatina	+	Lactose	-
Fenilalanina desaminase	-	Maltose	-
Produção de indol	-	D-manitol	-
Redução de nitratos	-	D-manose	-
		Melicitose	-
		Melibiose	-
		Rafinose	-
		L-ramnose	-
		Ribose	+
		Salicina	-
		D-sorbitol	débil
		Amido	-
		Sacarose	+
		Trealose	+
		D-xilose	-

+: positivo para ≥ 80% dos isolados; -: positivo para ≤ 20 % dos isolados; débil: positivo para 21 a 79 % dos isolados estudados.

A morfologia das colónias de *E. amylovora* depende da composição do meio de cultura bem como das condições de crescimento. Os meios de cultura mais utilizados para o isolamento e diagnóstico do fogo bacteriano são: King B, NSA, MS, CCT e MM₂Cu (Paulin, 2000). Na Tabela 2 descrevem-se as características culturais que as colónias apresentam em cada um destes meios de cultura. Por vezes podem-se observar, em certos meios de cultura, colónias típicas e atípicas do mesmo isolamento, sendo cada tipo capaz de dar lugar ao outro. Esta variabilidade de morfologia das colónias pode obter-se, tanto através do isolamento direto proveniente das lesões, como a partir de suspensões bacterianas provenientes de um dos tipos de colónia. Este fenómeno não parece estar relacionado com diferenças fisiológicas ou patogénicas.

No que se refere às propriedades serológicas, Ordax (2008) refere ter sido demonstrado que *E. amylovora* possui vários determinantes antigénicos: o LPS, com e sem cadeia lateral; o antígeno termoestável GAI, polissacárido comum a todas as bactérias do grupo *amylovora*; o antígeno TV, provavelmente pertencente aos exopolissacáridos capsulares e presente apenas em isolados patogénicos e ainda o antígeno GAJ detetado no material mucoso extracelular em culturas puras.

De acordo com López *et al.* (2009), não foi encontrada relação entre as características serológicas e a patogenicidade. Os estudos com anticorpos monoclonais demonstraram existir uma elevada homogeneidade serológica de *E. amylovora*.

Tabela 2. Características das colónias de *Erwinia amylovora* nos meios de cultura habitualmente usados para o isolamento (adaptado de Paulin, 2000).

Meio de cultura	Tipo de meio	Morfologia da colónia	Referência
NSA	Não seletivo	Circular, domada, mucoide e de cor creme	Billing <i>et al.</i> (1961)
King B	Não seletivo	Circular, mucoide e de cor esbranquiçada	King <i>et al.</i> (1954)
CCT	Semisseletivo	Circular, domada com bordo brilhante e de cor violeta claro	Ishimaru & Klos (1984)
MS	Semisseletivo	Circular, domada e de cor vermelho-alaranjado	Miller & Schroth (1972)
MM ₂ Cu	Semisseletivo	Circular, mucoide e amarela	Bereswill <i>et al.</i> (1998)

2.2 Características moleculares

2.2.1 Fatores de virulência

Os estudos efetuados em *Erwinia amylovora*, respeitantes à sua patogenicidade, permitiram identificar quatro fatores essenciais:

- genes *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*);
- genes *dsp* (*disease specific protein*);
- sideróforos, pertencentes à classe das deferoxaminas (DFO);
- polissacáridos extracelulares ou exopolissacáridos (EPS).

Os genes *hrp* agrupam-se numa região cromossómica de 40 kb que parece ser uma ilha de patogenicidade (López *et al.*, 2009). Os estudos dos genes *hrp* indicam que eles codificam três tipos diferentes de proteínas conforme a sua função: reguladora, secretora e excretora. As proteínas reguladoras, onde se destaca o fator de transcrição *hrpL*, controlam a expressão dos outros genes *hrp*, em resposta a fatores ambientais (Cabrefiga, 2004). As proteínas secretoras são componentes estruturais de um sistema de secreção tipo III, que transporta proteínas para o exterior da célula bacteriana e as injeta nas células vegetais (Kim *et al.*, 2000). As proteínas excretadas são transportadas para o exterior da célula bacteriana através da estrutura atrás mencionada. Destas proteínas, destaca-se a harpina (*hrpN*) que pode induzir resistência sistémica às plantas contra o agente patogénico, induzir repelência a insetos e promover o

crescimento das plantas, o que abre a possibilidade de utilizar a harpina em agricultura (Kim *et al.*, 2000).

Os genes *dsp* são necessários para o aparecimento dos sintomas da doença mas não para a reação de hipersensibilidade (HR) (Bogdanove *et al.*, 2000).

A *E. amylovora* produz sideróforos pertencentes à classe das deferoxaminas (DFO). Estes compostos são agentes quelantes e transportadores de ferro que permitem ao agente patogénico superar as condições de baixas concentrações deste elemento no hospedeiro. Por outro lado, atuam também sobre os compostos oxigenados muito reativos e tóxicos que se formam durante a fase inicial da infeção (Expert *et al.*, 2000).

A *E. amylovora* produz três tipos de exopolissacáridos (EPS): amilovorana, levana e glucana, este último minoritário e pouco estudado (Ordax, 2008). Os EPS, formando a cápsula, protegem a célula bacteriana das reações defensivas da planta (López *et al.*, 2009), são essenciais para a patogenicidade, pois realizam uma série de funções chave fundamentais no início da infeção e na disseminação do fogo bacteriano. O papel fundamental dos EPS na patogenicidade de *E. amylovora* foi comprovado pela observação de mutantes. Os mutantes que são incapazes de sintetizar amilovorana não são patogénicos e os que não produzem levana são afetados na virulência (Geider, 2000). O EPS mais estudado é a amilovorana e parece estar implicado na reação de hipersensibilidade induzida pela harpina (Cabrefiga, 2004).

A virulência da bactéria não pode ser apenas explicada pelos níveis de virulência da expressão genética pois existem interações específicas entre o genótipo do hospedeiro estudado (macieira) e diferentes estirpes de *E. amylovora* (Wang *et al.*, 2010).

2.2.2 Suscetibilidade a antibióticos

Geralmente, a *Erwinia amylovora* é suscetível aos antibióticos (López *et al.*, 2009), sendo a estreptomicina o antibiótico mais utilizado no combate à doença. A estreptomicina é um aminoglicósido que, unindo-se ao ribossoma bacteriano, impede a síntese de proteínas (Donat, 2004). Contudo, fruto das aplicações sucessivas deste antibiótico, têm surgido isolados bacterianos resistentes à estreptomicina em todos os países onde a sua aplicação é permitida (Jones & Schnabel, 2000). A resistência da bactéria aos antibióticos é devida a mutações cromossómicas que alteram a afinidade dos ribossomas à estreptomicina ou à aquisição de plasmídeos que codificam a síntese de enzimas capazes de inativar o efeito do antibiótico.

2.2.3 Características genéticas

Numerosos estudos têm mostrado existir uma grande homogeneidade entre os isolados de *Erwinia amylovora* no que respeita aos hospedeiros, diversidade genética e patogenicidade. No entanto, têm sido detetadas pequenas diferenças na virulência, morfologia e serologia das bactérias, relacionadas com a origem das colónias (Cabrefiga, 2004). Os estudos recentes,

baseados nas técnicas moleculares, têm revelado alguma heterogeneidade nas características moleculares que permitem distinguir vários grupos (López *et al.*, 2009).

Em *E. amylovora* têm sido descritos vários plasmídeos de tamanho variável que oscilam entre os 60 kb e os 3 kb. Contudo, o mais frequente é o plasmídeo pEA29 de 29 kb que parece estar relacionado com a patogenicidade da bactéria e com a biossíntese de tiamina (Donat, 2004). Aos plasmídeos de 8,7 kb e 34 kb tem sido atribuída a resistência à estreptomicina e ao plasmídeo de 2,8 kb a resistência à ampicilina (Llop *et al.*, 2011). Posteriormente foi descoberto um novo plasmídeo, com 65,8 kb, designado por pEI70. Este plasmídeo foi identificado em isolados bacterianos de vários países europeus mas não em isolados bacterianos de outros continentes. Uma vez que, nos isolados bacterianos provenientes da América do Norte não foi detetado o plasmídeo pEI70, tal leva os autores a crer que este plasmídeo terá sido introduzido em *E. amylovora* apenas quando a doença surgiu no continente europeu. O plasmídeo pEI70 parece fornecer algumas características que compensam a falta do pEA29, pois as estirpes que contêm o pEI70 têm o mesmo nível de agressividade que as estirpes que contêm o pEA29.

Atualmente já foi sequenciado o genoma da estirpe americana Ea273 (ATCC 49946), com 3,8 Mb (Sebahia *et al.*, 2010). Também o genoma da estirpe CFBP 1430, de origem europeia, foi sequenciado e comparado com o da estirpe Ea273, assim como com o genoma das espécies *E. pyrifoliae* e *E. tasmaniensis* (Smits *et al.*, 2010). Espera-se que o conhecimento do genoma da bactéria contribua, num futuro próximo, para a obtenção de estratégias mais eficazes de combate ao fogo bacteriano.

2.3 Métodos de diagnóstico e de identificação de *Erwinia amylovora*

O diagnóstico do fogo bacteriano envolve, não só o reconhecimento dos sintomas característicos da doença, mas também o isolamento da bactéria e a sua identificação. Tal necessidade prende-se com o facto de os sintomas causados por *Erwinia amylovora* se confundirem, em alguns casos, com os sintomas provocados por outras doenças, nomeadamente os ocasionados pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall ou ainda com alterações fisiológicas da planta hospedeira (Ordax, 2008). Por este facto, o diagnóstico realizado em laboratório é fundamental, uma vez que, a partir do isolamento e da cultura pura da bactéria, se pode efetuar a sua identificação através das características morfológicas, bioquímicas, serológicas, moleculares e patogénicas. O diagnóstico de *E. amylovora* é pois um método integrado (López *et al.*, 2009). Se a identificação precoce do agente causal de doença no pomar é de extrema importância para o combate à doença, a deteção em material vegetal sem sintomas (plantas assintomáticas) não é menos relevante, já que estas plantas não apresentando os sintomas da doença, podem albergar a bactéria. Estas plantas assintomáticas podem disseminar a doença logo que estejam reunidas as condições ideais entre planta - agente patogénico - ambiente. Uma vez que *E. amylovora* é considerado um organismo de quarentena pela legislação da União Europeia e pela Organização Europeia e Mediterrânica de Proteção de Plantas (EPPO), são exigidas uma série de medidas

fitossanitárias, nomeadamente análises a plantas com sintomas e plantas assintomáticas (López *et al.*, 2009).

2.3.1 Isolamento

A norma PM 7/20 publicada pela EPPO (2004) regulamenta o protocolo de diagnóstico para os organismos de quarentena onde se inclui a bactéria responsável pelo fogo bacteriano, *Erwinia amylovora*. Esta norma tem como base os estudos realizados em laboratórios de vários países europeus, no âmbito do Projeto da Comissão da União Europeia - DIAGPRO, designado por SMT 4-CT98-2252.

De acordo com o SMT PROJECT (2004), as amostras para diagnosticar o fogo bacteriano em plantas com sintomas, devem ser obtidas, preferencialmente de flores, rebentos jovens, folhas, frutos (com necroses e exsudado sempre que tal seja possível) ou de tecido subcortical dos cancos dos ramos ou dos troncos. As amostras devem ser processadas com a maior brevidade possível e até ao processamento devem ser conservadas entre 4-8°C. As amostras ainda poderão ser guardadas no frio após o processamento para eventuais verificações, mas durante poucas semanas.

Do material vegetal afetado devem ser retirados pedaços da zona de transição entre os tecidos sãos e os tecidos necrosados ou dos tecidos recentemente infetados. Estes devem ser macerados, preferencialmente, em tampão antioxidante (Gorris *et al.*, 1996). No entanto, também pode ser usado tampão fosfatado salino (PBS) ou água destilada esterilizada. Quando se trata de exsudados, estes devem ser colocados diretamente no tampão ou na água destilada esterilizada.

Apesar de a bactéria crescer nos meios de cultura indicados no ponto 2.1, a norma PM 7/20 aconselha a inoculação nos meios não seletivos King B (King *et al.*, 1954) e no agar nutritivo com sacarose a 5% (NSA) (Billing *et al.*, 1961) e no meio semisseletivo CCT (Ishimaru & Klos, 1984). É aconselhável o uso dos três meios sólidos para garantir uma maior fiabilidade dos resultados, já que, dependendo do número e do tipo de inóculo da amostra, a bactéria poderá crescer com maior facilidade num ou noutro meio de cultura (Paulin 2000).

De acordo com o SMT PROJECT (EPPO, s/d), a suspensão obtida do material macerado (suspensão-mãe) deve ser semeada nos três meios de cultura referidos, pipetando 50 µL em cada placa. Devem ser preparadas diluições 1:10 e 1:100, a partir da suspensão-mãe e pipetadas também 50 µL de cada diluição para os três meios de cultura. As placas são incubadas a 25°C durante 48 a 72 h e a leitura final deve ser realizada às 72 h ou às 96 h.

No meio de cultura King B, o crescimento das colónias de *E. amylovora* é rápido e as colónias são brancas, circulares, mucoides e com diâmetro de 2-5 mm após 24-48 h de incubação (Ordax, 2008). Este meio permite diferenciar as colónias de *E. amylovora* das de *Pseudomonas syringae*, pois as últimas produzem um pigmento fluorescente visível sob luz ultravioleta às 48 h (Lelliott & Stead, 1987). No meio de cultura NSA, a bactéria apresenta colónias esbranquiçadas, circulares, mucoides, tipicamente domadas e de 3-5 mm de diâmetro após 48 h de incubação e

atingindo os 5-7 mm nas 24 h posteriores (Lelliott & Stead, 1987). O aspeto domado deve-se à produção de levana a partir da sacarose presente no meio. Inicialmente as colónias são semitransparentes a translúcidas mas após 48-72 h passam a semiopacas. As colónias mais velhas poderão colapsar, provavelmente devido à produção de levana pela bactéria. Apesar de, caracteristicamente, as colónias de *E. amylovora* produzirem levana, poderão ocasionalmente ser isoladas bactérias que não a produzam. No meio CCT, que contém como fontes de carbono sacarose a 10% e sorbitol a 1%, a seletividade é conseguida pelo tergitol aniónico, nitrato de tálio, cicloheximida e cristal de violeta (Ishimaru & Klos, 1984). O crescimento das colónias é mais lento, aparecendo cerca de 48 h após a sementeira. As colónias, após 72 h apresentam uma cor violácea pálida de superfície lisa e bordo brilhante, são circulares, mucosas, domadas, com cerca de 2-6 mm de diâmetro. Apesar do meio CCT mostrar um bom nível de seletividade, outras bactérias podem também crescer como *Pseudomonas* spp. e *Pantoea agglomerans*. No entanto, e uma vez que o seu crescimento é ligeiramente inibido, mostram uma morfologia colonial diferente (EPPO, s/d; Ishimaru & Klos, 1984).

Existem outros meios de cultura semisseletivos que, apesar de não serem recomendados pela EPPO, podem ser usados para o crescimento de *E. amylovora*. Um destes meios é o meio MS (Miller & Schroth, 1972) onde as colónias de *E. amylovora* são vermelho-alaranjadas como resultado da fermentação do sorbitol a 1 % em presença do indicador azul de bromotimol, enquanto as colónias de *Pseudomonas* spp. são de cor azul (Ordax, 2008). Este meio apresenta como inconvenientes o elevado custo, a difícil preparação e a curta duração de armazenamento (Donat, 2004). Também o meio semisseletivo MM₂Cu (Bereswill *et al.*, 1998) permite a cultura de *E. amylovora*. Neste meio, a bactéria forma colónias mucoides de cor amarelo característico, devido à presença do cobre, o que permite a sua diferenciação das colónias de outras bactérias. As colónias típicas de *E. amylovora* neste meio de cultura são visíveis 3-4 dias após a sementeira. Ordax (2008) estudou o comportamento de *E. amylovora* no meio de cultura, designado por RESC (*Recovery of E. amylovora Stressed Cells*). Este meio de cultura, baseado no meio King B com adição de 1,5 mM de CuSO₄, permite a recuperação da bactéria, depois de ter sido sujeita a condições de stresse, em cerca de 48 h. Tal situação é atribuída ao facto de o cobre ser um micronutriente essencial para o incremento dos exopolissacáridos de *E. amylovora*, contribuindo para a sua recuperação em meio sólido quando a bactéria é sujeita a situações de stresse. Após 48 h de incubação a 26 °C, as colónias de *E. amylovora* cultivadas em meio RESC, têm uma cor amarelada, são circulares, domadas e mucoides, com 2,5 a 4,5 mm de diâmetro. O autor salienta ainda que o aspeto mucoide é visível logo após as 24-36 h de incubação.

Depois de obtidas as culturas puras de colónias com morfologia típica de *E. amylovora*, realizam-se testes bioquímicos, fisiológicos, serológicos e moleculares e avalia-se o poder patogénico. A identificação das colónias é realizada a partir dos resultados daqueles testes (López *et al.*, 2009).

2.3.2 Testes bioquímicos e fisiológicos

Os testes bioquímicos e fisiológicos são os primeiros testes a realizar com a finalidade de confirmar a identidade das culturas puras dos isolados com morfologia de colónias de *Erwinia amylovora*.

De acordo com a norma PM 7/20 (EPPO, 2004), o resultado dos testes nutricionais e enzimáticos da bactéria *Erwinia amylovora* será conforme o descrito na Tabela 3. A identificação bioquímica pode ser completada com as galerias comerciais API (bioMérieux). Estas galerias são sistemas miniaturizados que permitem, entre outras, avaliar 20 reações bioquímicas (API 20E), a utilização de 50 hidratos de carbono e derivados (API 50CH) ou a produção de 19 enzimas (API ZYM).

A galeria API 20E é inoculada de acordo com as instruções do fabricante e incubada a 25-26°C. A leitura é efetuada após 24 e 48 h sendo a leitura expectável às 48 h conforme mencionado na Tabela 4 (EPPO, 2004). No que se refere à galeria API 50 CH, de acordo com a mesma norma, é preparada uma suspensão em PBS com DO=1,0 e 1 mL desta suspensão, adicionada a 20 mL de meio Ayers. A inoculação da galeria é realizada conforme as instruções do fabricante. A incubação é efetuada a 25-26°C em condições de anaerobiose e a leitura é realizada às 24, 48 e 72 h. A condição de anaerobiose é conseguida através da colocação de parafina líquida esterilizada na cúpula dos tubos. A utilização dos diferentes hidratos de carbono é indicada pelo aparecimento da cor amarela no alvéolo respetivo.

Tabela 3. Testes de identificação nutricional e enzimática para *Erwinia amylovora* (EPPO, 2004).

Teste	Resultado expectável
Produção de levana	+
Produção de pigmentos fluorescentes em King B (sob luz UV)	-
Teste da oxidação/fermentação (O/F)	O+/F+
Teste da oxidase	-
Redução dos nitratos	-
Utilização do citrato	+
Crescimento a 39°C	-
Liquefação da gelatina	+
Produção de urease	-
Produção de indol	-
Redução da sacarose	+
Produção de acetoina	+

Também pode ser usado o sistema automático BIOLOG para identificação de *E. amylovora*. Este sistema baseia-se na utilização de 95 fontes de carbono numa só microplaca (EPPO, 2004).

O perfil de ácidos gordos também pode ser usado para a identificação de *E. amylovora* (EPPO, s/d), dada a homogeneidade existente entre os perfis das colónias desta bactéria (Paulin, 2000). No entanto, López *et al.* (2009) referem que esta técnica poderá conduzir a falsos resultados positivos dado que outras espécies de *Erwinia* isoladas do mesmo hospedeiro poderão ter perfis muito próximos do perfil de *E. amylovora*.

Tabela 4. Leitura expectável para *Erwinia amylovora* nos testes API 20E e API 50CH (EPPO, 2004).

Teste - API 20E	Reação (48 h)	Teste - API 50CH	Reação (72 h)
ONPG	Variável	L-arabinose	+
ADH	- (ou + fraco)	Ribose	+
LDC	-	D-xilose	Variável
ODC	-	Galactose	Variável (normalmente +)
CIT	-	D-glucose	+
SH ₂	-	D-frutose	+
URE	-	D-manose	Variável
TDA	-	Manitol	+
IND	-	Sorbitol	+
VP	+ (ou variável)	N-acetilglucosamina	+
GEL	Variável	Melibiose	Variável
GLU	+	Sacarose	+
MAN	Variável	Trealose	+
INO	Variável	B-gentiobiose	+
SOR	Variável		
RHA	-		
SAC	+		
MEL	- (ou + fraco)		
AMY	-		
ARA	+ (alguns -)		

2.3.3 Detecção serológica

Os métodos serológicos são usados para confirmar o diagnóstico de *Erwinia amylovora*, uma vez que se trata de uma bactéria homogénea sob o ponto de vista serológico (Paulin, 2000).

O método mais usado em laboratório é a técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Apresenta como vantagem o facto de poder ser aplicada em culturas puras da bactéria ou diretamente no material vegetal. Sendo um processo rápido e automático, permite processar um elevado número de amostras (Donat, 2004).

Quando se usam anticorpos policlonais, os métodos serológicos podem apresentar reações cruzadas com outras bactérias presentes nas amostras. Este condicionalismo poderá ser ultrapassado com a utilização de anticorpos monoclonais específicos (López *et al.*, 2009) ou a utilização de culturas puras.

O método DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich-ELISA*), que utiliza anticorpos policlonais, garante uma sensibilidade para concentrações de 10^6 ufc.mL⁻¹, já o método DASI-ELISA (*Double Antibody Sandwich Indirect-ELISA*), utilizando anticorpos monoclonais específicos, apresenta sensibilidade para 10^5 ufc.mL⁻¹. Atualmente, o método mais sensível e específico para a detecção de *E. amylovora* em amostras vegetais, designa-se por DASI-ELISA-enriquecimento. Este método baseia-se no enriquecimento prévio das amostras em meios líquidos de King B ou CCT e seguidamente na imunodeteção através de DASI-ELISA, utilizando anticorpos monoclonais específicos para *E. amylovora*. O DASI-ELISA-enriquecimento permite a detecção da bactéria em amostras com concentrações na ordem do 10 a 10^2 ufc.mL⁻¹ (Ordax, 2008). Existe também outra técnica, bastante sensível para detetar a presença da bactéria em condições de campo, designada por imunopressão-ELISA. Baseia-se na realização de uma impressão da amostra vegetal numa membrana de nitrocelulose e na posterior análise serológica com anticorpos monoclonais específicos (Donat, 2004). De acordo com López *et al.* (2009), esta técnica só é recomendável para análises rápidas de plantas com sintomas que carecem de confirmação.

A técnica serológica designada por imunofluorescência (IF) é usada com menos frequência que a técnica ELISA, na detecção e identificação da *E. amylovora*. Tal situação prende-se com o facto de os anticorpos comercializáveis terem uma fraca especificidade para a bactéria, o que favorece o aparecimento de falsos positivos devido a reações cruzadas (Ordax, 2008). A técnica IF baseia-se na visualização ao microscópio ótico, com epi-iluminação ultravioleta, das células especificamente marcadas. As células bacterianas observadas são de cor verde, caso se use como marcador dos anticorpos, o isotiocianato de fluoresceína ou de cor vermelha, caso se use a rodamina (Donat, 2004). Esta técnica é mais subjetiva que a técnica ELISA, contudo é usada em alguns laboratórios como técnica rápida, para uma primeira análise, pois apresenta uma sensibilidade relativamente elevada para concentrações de 10^3 a 10^4 ufc.mL⁻¹ (Ordax, 2008).

Recentemente, foi desenvolvido um novo método de diagnóstico serológico denominado AgriStrip que se baseia no princípio da imunocromatografia de fluxo lateral. O método está baseado na utilização de anticorpos policlonais sendo usado, fundamentalmente, no diagnóstico de rotina em material vegetal que apresenta sinais de doença (EUPHRESCO, 2009).

Um outro método serológico usado na identificação de *E. amylovora* é o teste de aglutinação. Este baseia-se na elevada homogeneidade dos antigénios termoestáveis (lipopolissacáridos, LPS) da bactéria (Donat, 2004), requer um antissoro de elevada especificidade praticamente não diluído e só deve ser usado em culturas bacterianas puras (López *et al.*, 2009). Na reação positiva, a aglutinação com o antissoro pode ser vista a olho nu, mas requer uma elevada concentração bacteriana uma vez que esta técnica tem baixa sensibilidade (Donat, 2004).

Os testes serológicos, referidos pela norma PM 7/20 (EPPO, 2004) e relatados com mais detalhe no SMT PROJECT (EPPO, s/d), para a detecção de *E. amylovora* a partir diretamente do material vegetal são os testes de imunofluorescência (IF), imunopressão-ELISA e DASI-ELISA com enriquecimento prévio. Sempre que a bactéria seja isolada e obtida a sua cultura pura é

aconselhável o uso dos testes de aglutinação, imunofluorescência (IF), DAS-ELISA e ELISA indireto com a utilização de anticorpos específicos monoclonais.

2.3.4 Detecção molecular

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é a técnica molecular mais utilizada no diagnóstico e na identificação de *Erwinia amylovora*. Esta técnica baseia-se na amplificação *in vitro* de material genético específico (DNA), utilizando a reação em cadeia pela polimerase e tal como os métodos serológicos, pode ser aplicada em culturas puras da bactéria ou diretamente em material vegetal (López *et al.*, 2009).

Sempre que a amostra é efetuada diretamente a partir de material vegetal deve ser realizada a extração de DNA para evitar a presença de elementos que inibam a reação enzimática da amplificação (Llop *et al.*, 1999). Apesar de existirem vários protocolos para a extração do DNA de material vegetal e uma gama variada de *kits* comerciais para esta finalidade, apenas o protocolo de extração com isopropanol proposto por Llop *et al.* (1999) é validado pelo SMT PROJECT (EPPO, s/d; EPPO, 2004). A reação em cadeia pela polimerase também pode ser aplicada em culturas puras e nesta circunstância torna-se desnecessário proceder à extração de DNA (EPPO, 2004). Salientam-se os trabalhos realizados por Kokosková *et al.* (2007) em que a extração de DNA das amostras vegetais foi efetuada com o recurso ao Dneasy Plant Mini Kit (Quiagen) e a amplificação do DNA das culturas puras foi realizada diretamente a partir de suspensões bacterianas.

Os métodos mais utilizados para a deteção de *E. amylovora*, mediante amplificação génica utilizando o PCR convencional, baseiam-se na sequência do plasmídeo pEA29 com amplificação a 900 bp (Bereswill *et al.*, 1992), podendo ocorrer variações entre os 900 e 1100 bp (EPPO, 2004). McManus *et al.* (1995) desenvolveram uma variante da técnica, designada *nested*-PCR, que utiliza dois pares de iniciadores (*primers*), um externo e outro interno. Esta técnica permite detetar a presença da bactéria em baixas concentrações, cerca de 20 ufc.mL⁻¹ em extratos vegetais, chegando a 1 ufc.mL⁻¹ quando se trata de deteção em culturas puras. Esta metodologia apresenta como inconveniente o elevado risco de contaminação devido às duas etapas de amplificação. Na tentativa de ultrapassar este inconveniente surgiu uma nova metodologia, que consiste na realização das duas amplificações num único microtubo (Llop *et al.*, 2000), designada *nested*-PCR. Com a metodologia padronizada por McManus *et al.* (1995) obtém-se uma amplificação a 844 bp e com a de Llop *et al.* (2000), a 391 bp (Powney *et al.*, 2011).

As três metodologias baseiam-se no uso de *primers* das sequências plasmídicas do pEA29, que se pensava ser característico de todos os isolados de *E. amylovora*. No entanto, de acordo com Llop *et al.* (2006) existem isolados patogénicos de *E. amylovora* que não apresentam aquele plasmídeo, apresentando em sua substituição um plasmídeo com cerca de 70 bp. Para ultrapassar este problema é possível recorrer a outros protocolos que não se baseiam no plasmídeo pEA29. De entre estes, salientamos o protocolo que se baseia na sequência do gene cromossómico *amsB* que codifica uma enzima implicada na síntese da amilovorana (Bereswill *et al.*, 1995), amplificando-se para *E. amylovora* na zona dos 1600 bp (Powney *et al.*, 2011). Outras

sequências cromossômicas utilizadas são as do gene RNA r16S, com amplificação a 1500 bp (Bereswill *et al.*, 1995) e a do gene RNA r23S, com amplificação a 565 bp (Maes *et al.*, 1996, cit. Donat, 2004). Os protocolos preconizados por Jones & Geider (2001) e Mohammadi *et al.* (2009) baseiam-se na sequência do gene cromossômico *ams*, com amplificações a 519 bp e 600 bp, respectivamente (Powney *et al.*, 2011). O DNA cromossômico avaliado no protocolo desenvolvido por Taylor *et al.* (2001) é amplificado a 187 bp.

Powney *et al.* (2011) avaliaram sete protocolos de detecção molecular (Bereswill *et al.*, 1992 e 1995; McManus *et al.*, 1995; Llop *et al.*, 2000; Jones & Geider, 2001; Taylor *et al.*, 2001; Mohammadi *et al.*, 2009) e constataram que apenas o protocolo preconizado por Taylor *et al.* (2001) foi específico para todas as estirpes de *E. amylovora* estudadas.

Recentemente foi desenvolvida a técnica de PCR em tempo real (rt-PCR) também baseada na sequenciação do plasmídeo pEA29. No âmbito do projeto ERWINDECT (EUPHRESCO, 2009) foram desenvolvidos novos protocolos usando sequências cromossômicas (*ams* e ITS - *internal transcribed spacer*) com o objetivo de evitar falsos negativos por ausência daquele plasmídeo (Pirc *et al.*, 2009). A técnica de PCR em tempo real apresenta como grande vantagem a rapidez de execução, observando-se os resultados à medida que ocorre a amplificação.

Uma vez que a técnica de PCR (convencional e em tempo real), oferece vantagens relativamente a outros testes de diagnóstico, ao longo dos últimos anos, muitos foram os protocolos desenvolvidos (Palacio-Bielsa *et al.*, 2009). No âmbito do projeto ERWINDECT (EUPHRESCO, 2009) foram analisados os protocolos de PCR convencional de Llop *et al.* (2000), Taylor *et al.* (2001), Stöger *et al.* (2006) e Obradovic *et al.* (2007). Todos os protocolos foram validados no teste interlaboratorial para as condições testadas.

2.3.5 Testes de patogenicidade

Depois de obtidas as culturas puras da bactéria, podem ser realizados testes de hipersensibilidade e testes de patogenicidade. Ambos têm como objetivo avaliar a capacidade patogénica da bactéria em condições controladas.

Nos testes de hipersensibilidade, a suspensão bacteriana é infiltrada em folhas de tabaco e caso produza uma reação de hipersensibilidade (HR), o teste é considerado positivo (Lelliott & Stead, 1987). As bactérias saprófitas não induzem aquela reação pelo que, os testes de hipersensibilidade são uma metodologia fácil e rápida para diferenciar os organismos saprófitas dos organismos patogénicos (Braun-Kiewnick & Sands, 2001). No entanto, a prova definitiva, incluindo para resultados positivos de hipersensibilidade, é o teste de patogenicidade (López *et al.*, 2009). O teste de patogenicidade para *Erwinia amylovora* pode ser efetuado em frutos imaturos de várias espécies suscetíveis, sementes, flores, folhas e ramos jovens de espécies sensíveis, com a finalidade de reproduzir os sintomas do fogo bacteriano e verificar o poder patogénico dos isolados. Quando nas suspensões de inoculação está presente a bactéria, é produzido um exsudado bacteriano, entre o 3.º e o 8.º dia após inoculação (Jones & Geider 2001).

Frequentemente, no teste de patogenicidade são usados frutos imaturos de pera, com 5-8 cm de comprimento (Lelliott & Stead, 1987) ou de 3-5 cm de diâmetro (Donat *et al.*, 2005). A inoculação pode ser realizada em frutos inteiros ou em fatias de 1 cm de espessura (Lelliott & Stead, 1987) com 10 µL de suspensão bacteriana com 10⁹ ufc.mL⁻¹ em PBS (EPPO, s/d) De acordo com o padronizado pela mesma norma, os frutos são sujeitos a uma temperatura de 25°C durante 7 dias. O teste positivo evidencia-se pelo aparecimento, no fruto, de uma coloração acastanhada em redor da zona de inoculação e pelo aparecimento de um exsudado bacteriano. Jones & Geider (2001) referem a possibilidade de utilizar suspensões bacterianas com concentrações entre 10⁴ e 10⁸ ufc.mL⁻¹, podendo as concentrações mais elevadas, originar falsos positivos. Estudos efetuados por Donat *et al.* (2005), com concentrações de 10⁵, 10⁷ e 10⁹, não apresentaram diferenças significativas. A inoculação é realizada em frutos sãos, sem manchas, feridas ou lesões, previamente mergulhados numa solução de hipoclorito de sódio e 2 vezes em água destilada esterilizada durante 5 minutos (Donat *et al.*, 2005). Os frutos desinfetados e embalados individualmente podem ser conservados durante vários meses à temperatura de 2-5°C (Lelliott & Stead, 1987).

De acordo com Jones & Geider (2001), podem também ser usados frutos imaturos de maçã e com López *et al.* (2009) de nêspera, pêsego e damasco. Independentemente da espécie, os melhores resultados de inoculação são obtidos quando os frutos têm um diâmetro superior a 1 cm e metade do diâmetro final (López *et al.*, 2009).

Também o outro material vegetal a usar para a inoculação deverá ser muito jovem, uma vez que a resistência às infeções é incrementada com a idade do órgão. Pode ser usado material proveniente de cultivares sensíveis de pereira, macieira ou nespereira, bem como das espécies ornamentais dos géneros *Crataegus*, *Cotoneaster* e *Pyracantha* (EPPO, s/d; Lelliott & Stead, 1987).

Os testes de hipersensibilidade e patogenicidade para estudos de isolados requerem a utilização de controlos positivos e negativos. O controlo positivo é inoculado com uma suspensão bacteriana de *E. amylovora* conhecida e o controlo negativo inoculado com o diluente usado na preparação das suspensões bacterianas em estudo (Lelliott & Stead, 1987; Braun-Kiewnick & Sands, 2001; EPPO, 2004; López *et al.*, 2009). As bactérias que crescem nas amostras positivas podem ser reisoladas para confirmação da sua identidade (Jones & Geider 2001).

3 Material e métodos

A componente experimental do trabalho decorreu nos Laboratórios de Proteção Vegetal e de Biologia da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco. As colónias selecionadas para o estudo foram isoladas no Laboratório de Proteção Vegetal a partir de material que apresentava sintomatologia característica da presença de fogo bacteriano, exceto três colónias que foram rececionadas em placa de Petri e obtidas de material vegetal onde se suspeitava a presença de *Erwinia amylovora*.

A identificação de *Erwinia amylovora* por técnicas de ácidos nucleicos e bioquímicas foi efetuada de acordo o procedimento indicado pela EPPO para diagnosticar o organismo de quarentena - *Erwinia amylovora* (EPPO, 2004).

3.1 Isolados bacterianos

No estudo foram avaliados 44 isolados, sendo 19 de pereira e 25 de macieira. Das culturas estudadas, 27 foram isoladas entre 2006 e 2010 e até à data do estudo estiveram conservadas no frio, em solução de Ringer ($\frac{1}{4}$ de força) ou crioconservadas em glicerol a 50% (Tabela 5). As restantes culturas (17) foram isoladas a partir de material que chegou ao Laboratório de Proteção Vegetal em 2011. Uma vez que os ramos de pereira apresentavam bastante exsudado bacteriano, isolaram-se colónias a partir deste material e também das necroses dos ramos jovens. Já os ramos de macieira rececionados, não apresentando exsudado, estavam acompanhados de frutos lesionados. Em alguns casos, as lesões eram completas (frutos necrosados) e outros apresentavam lesões parciais (frutos seminecrosados). Procurou-se isolar colónias a partir das necroses dos ramos jovens, no entanto, a purificação destas colónias mostrou-se difícil, ao contrário da purificação das colónias provenientes dos frutos, que se mostrou muito mais fácil. Por este facto, e uma vez que já tinham sido obtidas culturas puras a partir dos frutos, abandonou-se o isolamento das colónias provenientes das lesões dos ramos.

Ao longo do estudo foi usado como controlo positivo a estirpe de *Erwinia amylovora* CFBP 1430, isolado em França em 1972 de *Crataegus monogyna* Jacq. (CFBP, 2012). Esta estirpe tem sido usada, por diversos autores, em estudos de natureza idêntica (Donat, 2004; Cabrefiga, 2004; Ordax, 2008; EUPHRESCO, 2009; Smits *et al.*, 2010; Ivanovic *et al.*, 2012) uma vez que o seu uso é aconselhado pela EPPO (2004).

Na validação da técnica de ácidos nucleicos (PCR) foi usado um isolado de *Pseudomonas syringae*, que funcionou como controlo negativo.

3.2 Isolamento em diferentes meios de cultura

O isolamento das bactérias foi efetuado a partir do material vegetal que apresentava sintomatologia típica de fogo bacteriano, conforme descrito no Anexo V. Pedacos da zona de transição entre os tecidos necrosados e os aparentemente sãos, da região subcortical dos ramos jovens, foram retirados e macerados em PBS (Anexo VI). Foram igualmente macerados pedacos de frutos sempre que a amostra continha estes órgãos. Os exsudados, sempre que estavam presentes no material amostrado, foram colocados em suspensão, separadamente. Cada uma das suspensões foi semeada em agar nutritivo com sacarose a 5% (NSA) (Anexo VI). Em cada placa foi colocada uma gota ou 50 μ L da suspensão bacteriana. A incubação decorreu entre os 22°C e os 25°C.

Tabela 5. Isolados bacterianos usados no estudo.

Referência	Hospedeiro		Material isolado	Local	Ano de isolamento	
	Espécie	Cultivar				
EA 0010	Macieira	Bravo de Esmolfe	Ramo	Fundão - Povia da Atalaia	2006	
EA 0020						
EA 0030						
EA 0040	Pereira	Rocha				
EA 0050						
EA 0060						
EA 0070	Macieira	Bravo de Esmolfe		Exsudado		Fundão - Vale de Prazeres
EA 0080						
EA 0090						
EA 0100						
EA 0110						
EA 0120						
EA 0130	Macieira	Desconhecida	Ramo	Viseu	2007	
EA 0140						
EA 0150						
EA 0160	Macieira	Desconhecida	Desconhecido (1)	Viseu	2008	
EA 0170						
EA 0180						
EA 0190	Macieira	Golden Rendres	Ramo	Viseu	2009	
EA 0200						
EA 0210						
EA 0220						
EA 0230	Pereira	Rocha	Exsudado	Oeste	2010	
EA 0240						
EA 0250		Passe Crassane	Ramo			
EA 0260						
EA 0270						
EA 0280	Pereira	Rocha	Exsudado	Oeste	2011	
EA 0290						
EA 0300						
EA 0310						
EA 0320						
EA 0330			Ramo			
EA 0340						
EA 0350						
EA 0360						
EA 0370						
EA 0380	Macieira	Royal Gala	Fruto necrosado	Cova da Beira	2006	
EA 0390						
EA 0400						
EA 0410						
EA 0420			Fruto semi-necrosado			
EA 0430						
EA 0440						
PS 0100	Cerejeira	Desconhecida	Ramo	Cova da Beira	2006	
CFBP 1430	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.		Desconhecido	França	1972	

(1) Bactérias isoladas pela UTAD e rececionadas em placa de Petri.

Conforme Yaich *et al.* (2011) as colônias características foram selecionadas e repicadas para novas placas. Todas as colônias características foram semeadas em King B (Anexo VI) e observada a produção ou não do pigmento fluorescente visível sob luz ultravioleta. Quando este pigmento não era produzido e as colônias apresentavam características típicas, foram semeadas em CCT (Anexo VI).

As colônias conservadas a baixas temperaturas foram recuperadas adicionando 0,1 mL da suspensão de conservação em 1 mL de caldo nutritivo (Anexo VI). A suspensão foi incubada a 25°C durante 24 a 36 horas. Findo este tempo, 1 µL da suspensão bacteriana de cada isolado foi semeado, em duplicado, em placa de NSA e colocado a incubar a 25°C durante 48 horas.

3.3 Titulação por método indireto

A curva de calibração para *Erwinia amylovora* foi determinada experimentalmente no espectrofotômetro, JASCO 7800, UV/vis de duplo feixe. A leitura foi efetuada a 600 nm e as suspensões bacterianas preparadas em PBS (Anexo VI). Powney *et al.* (2011), Llop *et al.* (2011) e Santander *et al.* (2012) ajustaram, espectrofotometricamente, as suspensões bacterianas de *E. amylovora* a 600 nm.

Foi preparada uma suspensão-mãe bastante concentrada, com turvação superior à turvação 5 da escala de McFarland e a partir desta, foram preparadas catorze diluições de concentração $1/5$, relativamente às anteriores. Num ensaio anterior, verificou-se que as diluições de 0,1 implicavam descidas muito bruscas no valor da absorvância, originando um número de pontos insuficiente para definir a curva de calibração.

Das catorze diluições preparadas, o equipamento somente detetou valores de absorvância para as quatro primeiras. Assim, a curva de calibração foi obtida através da leitura da absorvância da suspensão-mãe e das quatro primeiras diluições.

A partir da 3.^a diluição procedeu-se à sementeira em placas de agar nutritivo (Anexo VI, com 0,1 mL das suspensões bacterianas, em cada placa. A sementeira foi realizada em duplicado. A contagem bacteriana foi possível numa placa da 10.^a diluição e numa da 11.^a diluição, com 37 e 7 colônias, respetivamente. Pudemos então apurar as correspondências entre as absorvâncias lidas no equipamento e as respetivas concentrações bacterianas (Tabela 6).

Tabela 6. Correspondência entre a absorvância a 600 nm e a concentração de *E. amylovora*.

Absorvância a 600 nm	Concentração bacteriana (ufc.mL ⁻¹)
2,168	3,5 x 10 ⁹
0,741	0,7 x 10 ⁹
0,162	1,4 x 10 ⁸
0,027	2,8 x 10 ⁷
0,002	0,6 x 10 ⁷

Apresenta-se na Figura 6 a curva de calibração. A reta obtida $y = 0,6 \times 10^{-9}x + 0,1$, apresenta um coeficiente de correlação de 0,989775.

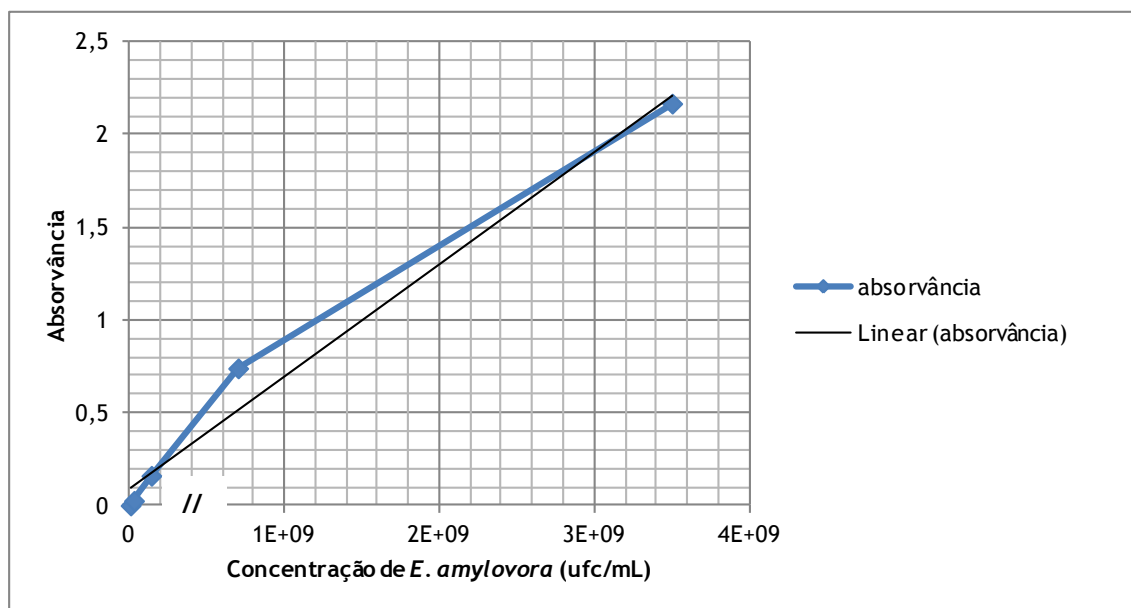


Figura 6. Curva de calibração para *Erwinia amylovora*.

3.4 Testes fisiológicos e bioquímicos

3.4.1 Coloração de Gram

Erwinia amylovora é uma bactéria Gram negativa em forma de bacilo. Para confirmação, foi efetuado um esfregaço de cada isolado bacteriano e corado de acordo com o descrito no Anexo VII.

3.4.2 Teste da oxidase

As *Enterobacteriaceae* são oxidase negativa e podem ser diferenciadas de outros bacilos Gram negativos através deste teste. A prova é considerada positiva quando na mistura do reagente com a massa bacteriana se desenvolve a cor azul arroxeada escura em cerca de 10 segundos. Na reação negativa não há desenvolvimento de cor. O teste da oxidase foi efetuado conforme descrito no Anexo VIII.

3.4.3 Crescimento em anaerobiose e mobilidade

O teste de crescimento em anaerobiose foi realizado em tubo contendo o meio semissólido de King B e fazendo uma picada, a meio do referido tubo, com o isolado a testar. Ao meio de cultura foi somente adicionado 3 g/L de agar, de forma a obter um meio semissólido de King B.

Os tubos inoculados foram incubados a 25°C e a última leitura foi efetuada ao 7.º dia após a inoculação. Sempre que ocorria crescimento em anaerobiose era possível também avaliar a mobilidade. Quando não se verificou crescimento em anaerobiose, ou a mobilidade não era evidente, esta foi confirmada numa preparação a fresco, em gota pendente e observada ao microscópio. Os isolados que apresentaram ausência de crescimento em anaerobiose no meio semissólido de King B, foram inoculados, em duplicado, em NSA e as placas colocadas em jarra de anaerobiose, a fim de confirmar a ausência de crescimento em condições de escassez de oxigénio e o duplicado colocado em condições de aerobiose. A incubação foi efetuada a 25°C e a leitura realizada ao 3.º dia após a inoculação.

3.4.4 Crescimento a 36°C e 39°C

De acordo com Holt *et al.* (1994) e Paulin (2000), a bactéria *E. amylovora* não cresce a temperaturas superiores a 36°C, no entanto, a EPPO (2004) refere uma temperatura mais elevada para a paragem do crescimento bacteriano (39°C). Por este facto, foi testado o crescimento dos isolados em estudo, para aqueles dois valores de temperatura. Também Yaich *et al.* (2011) testaram o crescimento de isolados marroquinos para estes dois valores de temperatura. O crescimento foi avaliado aos 3.º e 5.º dias após a inoculação em NSA.

3.4.5 Testes API

O sistema API 20E consiste em tiras de plástico de 20 galerias, cada uma delas contendo diferentes fontes de carbono e azoto. As galerias são inoculadas com uma solução salina contendo a bactéria em estudo e a reação obtida determina a capacidade metabólica da bactéria a cada um dos testes. O resultado obtido permite, por vezes, identificar o género e a espécie da bactéria inoculada pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Para a inoculação do API 20E cultivaram-se as bactérias em agar nutritivo (Anexo VI), a 22°C-25°C, durante 48 horas. A inoculação das galerias foi efetuada conforme descrito no Anexo IX e padronizado pela empresa bioMérieux. Seguidamente procedeu-se à incubação das galerias a 25-26°C e a leitura foi efetuada às 24 e 48 h, conforme padronizado pela EPPO para a *Erwinia amylovora*.

O sistema API 50CH consiste em 5 tiras de plástico de 10 galerias cada. Cada uma destas contém diferentes fontes de carbono e permite pesquisar a fermentação de vários substratos (heterósidos, poliálcoois e ácidos urónicos).

Para a inoculação do API 50CH cultivaram-se as bactérias em agar nutritivo (Anexo VI), a 22-25°C, durante 48 horas. A inoculação das galerias foi efetuada de acordo com a metodologia descrita para as *Enterobacteriaceae*, padronizado pela empresa bioMérieux e descrito no Anexo X. Seguidamente procedeu-se à incubação das galerias a 25°C e a leitura foi efetuada às 24, 48 e 72 h, conforme padronizado pela EPPO para *E. amylovora*. Durante o período de incubação, ocorre a fermentação que se traduz por uma alteração de cor na galeria, devido à produção de ácido em anaerobiose, revelado pela indicação de pH do meio escolhido. O primeiro tubo das

galerias, sem fonte de carbono, serve de controlo negativo. A condição de anaerobiose foi conseguida através da colocação de parafina líquida esterilizada na cúpula dos tubos.

3.5 Detecção molecular por PCR

3.5.1 Preparação das colónias

Cada isolado foi semeado em King B, em duplicado. A partir das colónias desenvolvidas foi preparada uma suspensão bacteriana (10^8 ufc.mL⁻¹) em água esterilizada ultra pura.

Pela curva de calibração previamente calculada para *Erwinia amylovora*, 10^8 ufc.mL⁻¹ corresponde aproximadamente à absorvância de 0,16. Esta concentração foi conseguida suspendendo cerca de 5 colónias em 500 µL de água ultra pura. A partir desta suspensão-mãe prepararam-se quatro diluições, retirando 50 µL da suspensão anterior e adicionando-a a 450 µL de água esterilizada ultra pura.

Para confirmação da concentração bacteriana, semeou-se 0,1 mL/placa das três últimas diluições (10^5 , 10^6 e 10^7), em duplicado, em agar nutritivo.

3.5.2 Amplificação

Para a amplificação usou-se a metodologia de validação convencional ou PCR simples, utilizando-se os *primers* e as condições descritas por Bereswill *et al.* (1992) e padronizadas pela EPPO (2004). A sequência de *primers* usada foi a seguinte:

- *Primer A*: 5' CGG TTT TTA ACG CTG GG 3';
- *Primer B*: 5' GGG CAA ATA CTC GGA TT 3'.

Uma vez que os *primers* são comercializados liofilizados existe a necessidade de os reconstituir. A sua preparação foi efetuada conforme indicado no Anexo XI.

De acordo com a EPPO (2004), utilizou-se o Ready Mix Red Taq com cloreto de magnésio, da Sigma (ref.^a R2523). Este *mix* é constituído por 20 mM Tris-HCl, pH 8,3, com 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,002% gelatina, 0,4 mM mistura de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, TTP), estabilizadores e 0,06 U/µL de Taq DNA Polymerase.

Segundo Bereswill *et al.* (1992), quando a lise bacteriana é realizada na presença de Tween 20, as bandas específicas a 900 bp são mais intensas. Por este facto, adicionou-se 0,5 µL de Tween 20 para que a sua concentração, na mistura final (50 µL), seja de 1% (v/v).

A mistura PCR foi preparada em microtubo de 1,5 mL, no gelo, de acordo com o seguinte:

Primer A - 2,5 µL (concentração de 25 pmol)	} × (n + 1) n = número de reações a testar 1 - volume adicional para compensar perdas
Primer B - 2,5 µL (concentração de 25 pmol)	
Ready Mix Red Taq - 25 µL	
Água ultra pura - 14,5 µL	
Tween 20 - 0,5 µL	

Seguidamente foram distribuídos 45 μL desta mistura em microtubos de 200 μL .

Em cada um destes tubos foram adicionados 5 μL da suspensão bacteriana que se pretendia amplificar. Num dos microtubos substituiu-se a adição de suspensão bacteriana por 5 μL de água ultra pura que serviu como controlo negativo ou branco.

Num outro microtubo adicionou-se 5 μL da suspensão de *Erwinia amylovora* CFBP 1430, que funcionou como controlo positivo.

O volume final em cada microtubo foi de 50 μL . Os microtubos com as amostras foram colocados no termociclador (Biometria, Tgradiente) e submetidos a um processo de desnaturação inicial a 93°C durante 2 minutos seguido de 37 ciclos a 93°C durante 1 minuto para a desnaturação, 52°C durante 2 minutos para a ligação do *primer* e 72°C durante 2 minutos para a amplificação. A etapa final a 72°C, durante 10 minutos, finalizou a reação.

3.5.3 Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose foi preparado a 1,5% em tampão TAE a 0,5X, conforme descrito no Anexo XII.

Procedeu-se ao carregamento dos poços colocando, no primeiro e último poços do gel, 5 μL de marcador de DNA de 100 bp, preparado conforme indicado no Anexo XIII.

Nos restantes poços colocaram-se 20 μL de cada produto de PCR. Na amplificação do controlo positivo foi usada a estirpe CFBP 1430 de *Erwinia amylovora*. Incluiu-se no carregamento do gel uma amostra sem DNA, usada como controlo negativo ou branco.

O controlo positivo e os isolados em estudo foram amplificados para duas concentrações diferentes, geralmente 10^4 e 10^5 ufc.mL⁻¹, que constituíram o duplicado da amostra. Essas concentrações foram determinadas após um pequeno teste explicado em 3.5.4.

Tendo o Ready Mix Red Taq já tampão de carregamento (*loading buffer*), não foi necessário adicioná-lo às amostras, antes do carregamento dos poços.

A separação eletroforética foi realizada numa tina de eletroforese (Bio-Rad Wide mini sugbcell GT), com tampão TAE 0,5x, durante cerca de 85 minutos a 90 V.

Findo este tempo, o gel foi colocado num banho com uma solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), preparado conforme indicado no Anexo XIV, durante 20 a 30 minutos.

A amplificação do DNA foi visualizada por transiluminação UV e fotografada com câmara digital (Kodak DC 290).

3.5.4 Interpretação do resultado de PCR

O teste de PCR é negativo se a amplificação específica de *Erwinia amylovora* de tamanho expectável não for detetada na amostra mas for detetada no controlo positivo. O teste de PCR é positivo se a amplificação específica de *E. amylovora* do tamanho expectável é detetado nas amostras, desde que não existam amplificações no controlo negativo.

De acordo com Bereswill *et al.* (1992) a banda específica para *E. amylovora* é visível a 900 bp, no entanto e de acordo com a EPPO (2004), podem ocorrer algumas variações entre os 900 - 1100 bp.

Com o objetivo de verificar a eficácia do teste PCR e determinar a concentração da suspensão bacteriana em que a separação eletroforética é mais evidente, foi efetuado um ensaio prévio. Neste ensaio, amplificaram-se três concentrações de DNA da estirpe de *E. amylovora* CFBP 1430, dos isolados EA 0300 e EA 0410 e do isolado de *Pseudomonas syringae* (PS 0100), usado também como controlo negativo. As concentrações foram testadas conforme indicado na Tabela 7.

Tabela 7. Concentrações bacterianas testadas no ensaio prévio de PCR.

Referência		Concentração da suspensão-mãe (ufc.mL ⁻¹)	Concentração da 3. ^a diluição (ufc.mL ⁻¹)	Concentração da 6. ^a diluição (ufc.mL ⁻¹)
CFBP 1430	controlo positivo	0,3x10 ⁸	0,3x10 ⁵	0,3x10 ²
PS 0100	controlo negativo	6,2x10 ⁸	6,2x10 ⁵	6,2x10 ²
EA 0300	colónia suspeita	1,1x10 ⁹	1,1x10 ⁶	1,1x10 ³
EA 0410	colónia suspeita	5,5x10 ⁸	5,5x10 ⁵	5,5x10 ²

Na Figura 7 pode observar-se a visualização da separação eletroforética obtida no ensaio prévio de PCR.

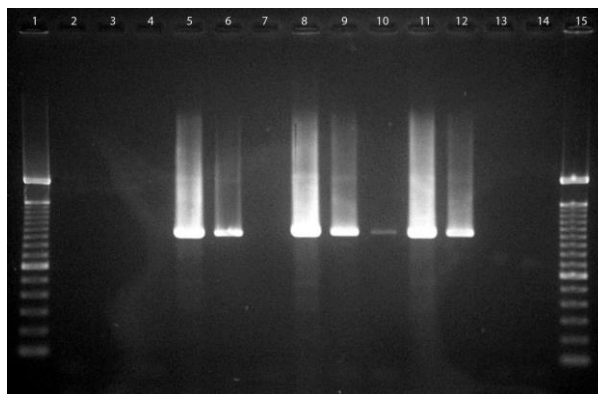


Figura 7. Separação eletroforética do ensaio prévio. Poços: 2, 3 e 4 - PS 0100 (6,2x10⁸, 6,2x10⁵ e 6,2x10² ufc.mL⁻¹); 5, 6 e 7 - CFBP 1430 (0,3x10⁸, 0,3x10⁵ e 0,3x10² ufc.mL⁻¹); 8, 9 e 10 - EA 0300 (1,1x10⁹, 1,1x10⁶ e 1,1x10³ ufc.mL⁻¹); 11, 12 e 13 - EA 0410 (5,5x10⁸, 5,5x10⁵ e 5,5x10² ufc.mL⁻¹); 14 - controlo sem DNA; 1 e 15 - marcador de DNA de 100 bp.

Foram observadas bandas nos isolados de *E. amylovora* CFBP 1430, EA 0300 e EA 0410, não tendo havido amplificações nos controlos negativos (*P. syringae* e branco). Assim foi possível continuar o PCR utilizando esta metodologia. Pode-se constatar que não foi visualizada qualquer banda na concentração de 10² ufc.mL⁻¹, embora tenha sido possível visualizar, de forma ténue, a banda na concentração de 10³ ufc.mL⁻¹. Nas concentrações mais elevadas (10⁸ e 10⁹ ufc.mL⁻¹) obtiveram-se bandas demasiado intensas. A melhor visualização foi observada nas concentrações 10⁵ - 10⁶ ufc.mL⁻¹. Por este facto, definiu-se que as concentrações das suspensões bacterianas a amplificar deveriam ser da ordem de 10⁴ e 10⁵ ufc.mL⁻¹, o que corresponde às diluições 10⁻³ e 10⁻⁴ ufc.mL⁻¹, preparadas a partir da suspensão-mãe de concentração 10⁸ ufc.mL⁻¹.

3.6 Teste de patogenicidade

Nos testes de patogenicidade foram usadas peras imaturas de variedades sensíveis ao fogo bacteriano, das cultivares Williams e Williams rouge. Os frutos imaturos apresentavam um tamanho compreendido entre 5 e 8 cm de comprimento longitudinal e 3 a 5 cm de diâmetro.

As peras imaturas, usadas no teste de patogenicidade, foram desinfetadas segundo o procedimento referido no Anexo XV e conservadas no frio até ao momento da realização dos testes.

O teste de patogenicidade foi efetuado conforme descrito no Anexo XVI e cada fatia de pera foi inoculada, em duplicado, com uma suspensão bacteriana de cerca de 10^9 ufc.mL⁻¹. Foram usadas 2 fatias de pera por isolado, pelo que a inoculação de cada isolado foi efetuada em quadruplicado.

A concentração de 10^9 ufc.mL⁻¹ foi conseguida através da adição de cerca de 6 a 7 µl de colónia a 5 mL de PBS. Como se pode verificar através da curva de calibração determinada para *Erwinia amylovora*, aquela concentração bacteriana corresponde a uma absorvância de 0,700 a 600 nm. A turvação obtida é similar à turvação 3 da escala de McFarland.

Às suspensões bacterianas com concentrações de 10^5 e 10^7 ufc.mL⁻¹ correspondem as absorvâncias de 0,100 e 0,106 a 600 nm, respetivamente. Tais absorvâncias são demasiado baixas para serem lidas diretamente no espectrofotómetro UV/vis, só podendo ser conseguidas através de diluições. Apesar destas concentrações também serem indicadas na bibliografia, entendeu-se inocular as fatias de pera apenas com a concentração de 10^9 ufc.mL⁻¹, tendo por base os resultados obtidos por Donat *et al.* (2005) que não registaram diferenças significativas entre as inoculações com as três concentrações bacterianas.

Dado que o número de peras imaturas obtidas no primeiro ano não foi suficiente para realizar o teste de patogenicidade em todos os isolados, foram recolhidos frutos imaturos no ano seguinte. Os testes realizados com as peras recolhidas no segundo ano não foram conclusivos uma vez que se obtiveram crescimentos bacterianos no controlo negativo. Depois de despistada a possibilidade de contaminação laboratorial, suspeitou-se que a contaminação dos frutos tivesse ocorrido ainda no pomar. De facto, na primavera seguinte algumas plantas apresentaram sintomatologia típica de fogo bacteriano.

A inexistência de peras imaturas sãs levou à necessidade de efetuar os restantes testes de patogenicidade em nêspers imaturas. Donat (2004), para além de evidenciar aparecimento de exsudados bacterianos em peras imaturas, também observou aparecimento de exsudados em nêspers e damascos imaturos.

Os frutos inoculados foram colocados sobre papel de filtro humedecido com água destilada esterilizada e incubados a 25°C em placa de Petri ou em frasco.

A EPPO (2004) padroniza a incubação dos frutos a 25°C e leitura durante 7 dias, para frutos imaturos e durante 15 dias para inoculações efetuadas em folhas ou rebentos. Santander

et al. (2012) prolongou a leitura do teste em frutos imaturos quando estes foram inoculados com bactérias no estado viável mas não cultivável (VBNC). Palomo *et al.* (s/d) também sugere o prolongamento das observações aos 15 dias.

O teste de patogenicidade realizado em fatias de peras imaturas decorreu durante 7 dias, no entanto, o teste realizado em nêspersas imaturas foi prolongado para 13-14 dias. A inoculação em nêspersas imaturas foi efetuada em triplicado.

Para além da inoculação em nêspersas inteiras, também foram inoculados alguns isolados, em fatias de nêspersas para avaliar possíveis diferenças no tempo de aparecimento dos exsudados bacterianos.

4 Resultados e discussão

4.1 Caraterísticas culturais

As colónias isoladas em 2010 e 2011 (isolados EA 0230 a EA 0440) apresentaram maior semelhança com as caraterísticas culturais da estirpe CFBP 1430 de *Erwinia amylovora*, para os meios de cultura King B, agar nutritivo com 5% de sacarose (NSA) e CCT. Nomeadamente, colónias domadas em NSA e CCT, de cor creme em NSA e violeta claro em CCT. As colónias cultivadas em King B apresentaram tamanho menor e uma coloração esbranquiçada (Figura 8 e Tabela 8). Caraterísticas semelhantes foram observadas em isolados obtidos em Espanha (Donat *et al.*, 2005) e em isolados obtidos em Marrocos (Yaich *et al.*, 2011).

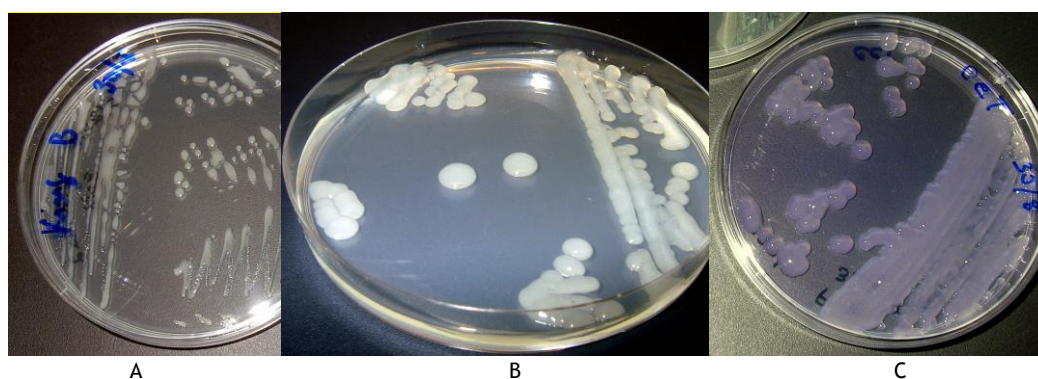


Figura 8. Crescimento em King B (A), agar nutritivo com 5% de sacarose (B) e CCT (C).

As colónias isoladas em 2006 (isolados EA 0010 a EA 0130) mostraram-se, de um modo geral, pouco caraterísticas no que respeita à cor e/ou à produção de levana (Tabela 8).

As colónias isoladas entre 2007 e 2009 (isolados EA 0150 a EA 220) apresentaram-se menos domadas do que o esperado, especialmente em CCT. Também Donat *et al.* (2005) referem a presença de colónias atípicas relativamente à produção de levana, situação já observada por Bereswill *et al.* (1997). Os mesmos autores referem ainda que uma das colónias produtora de levana no momento do isolamento perdeu a capacidade de a produzir depois de recuperada após

criopreservação a -80°C . Paulin (2000) menciona que podem aparecer colônias típicas e atípicas do mesmo isolamento, sendo cada tipo de colônia capaz de dar lugar ao outro.

Apenas o isolado EA 0140 produziu pigmento fluorescente visível sob luz ultravioleta em meio de King B. Apesar de esta evidência indicar não se tratar de um isolado de *E. amylovora*, entendeu-se mantê-lo no estudo.

Tabela 8. Características culturais dos isolados nos meios de cultura NSA, King B e CCT.

Referência	Tipicidade das colônias em NSA, King B e CCT	Referência	Tipicidade das colônias em NSA, King B e CCT
EA 0010	pouco caraterística	EA 0230	muito caraterística
EA 0020	pouco caraterística	EA 0240	muito caraterística
EA 0030	caraterística	EA 0250	muito caraterística
EA 0040	pouco caraterística	EA 0260	muito caraterística
EA 0050	pouco caraterística	EA 0270	muito caraterística
EA 0060	pouco caraterística	EA 0280	muito caraterística
EA 0070	pouco caraterística	EA 0290	muito caraterística
EA 0080	pouco caraterística	EA 0300	muito caraterística
EA 0090	pouco caraterística	EA 0310	muito caraterística
EA 0100	pouco caraterística	EA 0320	muito caraterística
EA 0110	pouco caraterística	EA 0330	muito caraterística
EA 0120	caraterística	EA 0340	muito caraterística
EA 0130	caraterística	EA 0350	muito caraterística
EA 0140	fluorescente em King B	EA 0360	muito caraterística
EA 0150	caraterística	EA 0370	muito caraterística
EA 0160	caraterística	EA 0380	muito caraterística
EA 0170	pouco caraterística	EA 0390	muito caraterística
EA 0180	pouco caraterística	EA 0400	muito caraterística
EA 0190	caraterística	EA 0410	muito caraterística
EA 0200	caraterística	EA 0420	muito caraterística
EA 0210	caraterística	EA 0430	muito caraterística
EA 0220	caraterística	EA 0440	muito caraterística

4.2 Crescimento em anaerobiose, mobilidade e crescimento a 36°C e 39°C

Em todos os esfregaços foram observados bacilos Gram negativos e todos os isolados responderam negativamente ao teste da oxidase.

As bactérias isoladas entre 2006 e 2009 (isolados EA 0010 a EA 0220) revelaram-se anaeróbias facultativas em meio semissólido de King B, à exceção dos isolados EA 0120 e EA 0200 (Tabela 9). Salientamos o crescimento débil, em condições de anaerobiose, apresentado pelos isolados, situação descrita pelos autores para *Erwinia amylovora* (Holt *et al.* 1994; Paulin, 2000). Contrariamente, dos 22 isolados obtidos em 2010 e 2011 (isolados EA 0230 a EA 0440), 18 não apresentaram crescimento naquelas condições. Os isolados que não cresceram nos tubos com o

meio semissólido de King B, confirmaram a mesma evidência no teste realizado em jarra de anaerobiose. Todos os isolados cresceram no duplicado das placas colocadas em condições de aerobiose, o que demonstrou que a ausência de crescimento se deveu estritamente às condições de anaerobiose a que foram sujeitos. Por outro lado, a ausência de crescimento dos isolados bacterianos no teste realizado em jarra de anaerobiose comprovou que a ausência de crescimento no meio semissólido de King B não foi devido à insuficiência de cultura ao longo da picada mas devido à ausência de oxigénio. No entanto, esta situação não permite afirmar tratem-se de isolados aeróbios estritos, uma vez que estes isolados fermentaram os hidratos de carbono no sistema API 50CH, em condições de anaerobiose. Parece-nos que a ausência de crescimento em condições de anaerobiose se prende com as condições a que as bactérias foram sujeitas durante o ensaio.

Salientamos que a estirpe CFBP 1430 de *E. amylovora*, usada como controlo positivo, cresceu debilmente, em ambos os ambientes.

Foi avaliada a mobilidade dos isolados que cresceram em condições de anaerobiose no meio semissólido de King B (Tabela 9). Uma vez que o crescimento em anaerobiose é débil, o estudo da mobilidade por esta metodologia não se mostrou muito eficaz. Por este facto, a mobilidade foi confirmada numa preparação a fresco em gota pendente. Todos os isolados apresentaram mobilidade mediante esta metodologia, conforme descrito por Raymundo & Ries (1980a) para *E. amylovora*.

No que se refere ao crescimento a 36°C verifica-se que os isolados obtidos entre 2006 e 2009 (isolados EA 0010 a EA 0220) apresentavam crescimento 36 horas após inoculação das placas, sendo que os isolados obtidos em 2007 (isolados EA 0140 e EA 0150), 2008 (isolados EA 0160 a EA 0180) e 2009 (isolados EA 0190 a EA 0220) não apresentaram crescimento a 39°C, exceto o isolado EA 0170 (Tabela 9). Alguns isolados obtidos em 2010 e 2011 (isolados EA 0230 a EA 0440) manifestaram um crescimento fraco a 36°C, cinco dias após inoculação, no entanto todas as bactérias isoladas neste período mostraram paragem de crescimento a 39°C. O isolado CFBP 1430 apresentou paragem de crescimento a 36°C.

Parece-nos de salientar que, de acordo com Holt *et al.* (1994), a bactéria cessa o seu crescimento a 36°C, no entanto, dez anos mais tarde e fruto de ensaios interlaboratoriais, a EPPO (2004) refere 39°C para a paragem do crescimento bacteriano. De realçar que durante este período a bactéria se disseminou por zonas do mediterrâneo, nomeadamente para Espanha, onde os valores de temperatura são bastante mais elevados que os verificados no centro da Europa. Tal situação pode levar a presumir que a bactéria se tenha adaptado às novas condições ambientais, passando a suportar temperaturas mais elevadas. Também poderemos deduzir que a alteração de 36°C para 39°C se pode dever à variabilidade existente entre os isolados, no que respeita à temperatura, para a qual ocorre paragem de crescimento bacteriano. De referir ainda que, no nosso estudo, as bactérias que cresceram a 39°C, foram isoladas de material vegetal proveniente da região quente do interior do país e as que pararam o crescimento a 36°C foram isoladas a partir de material infetado do litoral centro, onde são registadas temperaturas mais amenas.

Tabela 9. Crescimento em anaerobiose, mobilidade e crescimento a 36°C e 39°C.

Referência	crescimento em anaerobiose		Mobilidade (2)	Crescimento a 36°C		Crescimento a 39°C	
	3.º	7.º (1)		3.º	5.º	3.º	5.º
EA 0010	+	±	+	+		+	
EA 0020	+	±	+	+		+	
EA 0030	+	±	+	+		+	
EA 0040	+	±	+	+		+	
EA 0050	+	+ R	+	+		+	
EA 0060	+	±	+	+		+	
EA 0070	+	+ R	+	+		+	
EA 0080	+	+ R	+	+		+	
EA 0090	+	+ R	+	+		+	
EA 0100	+	+ R	+	+		+	
EA 0110	+	+ R	+	+		+	
EA 0120	-		+	+		+	
EA 0130	+	+ R	+	+		?	+
EA 0140	+	+ R	+	+		-	-
EA 0150	+	+ R	+	+		-	-
EA 0160	+	+	+	+		-	-
EA 0170	+	+ R	+	+		+	
EA 0180	+	+	+	+		-	-
EA 0190	+	+	+	+		-	-
EA 0200	-		+	+		-	-
EA 0210	+	+	+	+		-	-
EA 0220	+	+	+	+		-	-
EA 0230	-		+	-	-	-	-
EA 0240	-		+	-	-	-	-
EA 0250	-		+	-	-	-	-
EA 0260	-		+	-	-	-	-
EA 0270	+	+ R	+	-	±	-	-
EA 0280	-		+	-	-	-	-
EA 0290	+	+	+	-	±	-	-
EA 0300	-		+	-	±	-	-
EA 0310	-		+	-	±	-	-
EA 0320	-		+	-	-	-	-
EA 0330	-		+	-	±	-	-
EA 0340	-		+	-	±	-	-
EA 0350	-		+	-	-	-	-
EA 0360	+	+ R	+	-	-	-	-
EA 0370	-		+	-	±	-	-
EA 0380	-		+	-	-	-	-
EA 0390	+	+ R	+	-	±	-	-
EA 0400	-		+	-	±	-	-
EA 0410	-		+	-	±	-	-
EA 0420	-		+	-	-	-	-
EA 0430	-		+	-	±	-	-
EA 0440	-		+	-	-	-	-
CFBP 1430	+	+ R	+	-	-	-	-

- (1) Meio semissólido de King B.
 (2) Gota pendente.
 + R - Mobilidade reduzida.

4.3 Sistemas API 20E e 50CH

Na Tabela 10 encontra-se registada a leitura padronizada pela EPPO (2004) para o API 20E e preconizada pela EPPO (s/d) para o API 50CH, para *Erwinia amylovora*, e a leitura obtida para a estirpe CFBP 1430 (controlo positivo).

A empresa bioMérieux recomenda, na preparação da suspensão de inoculação para as *Enterobacteriaceae*, o uso do meio API 50CHB/E, ao invés do meio Ayers padronizado pela EPPO (2004). O primeiro usa o vermelho de fenol como indicador e o segundo o azul de bromotimol. Os resultados obtidos com a estirpe CFBP 1430, utilizando o meio API 50CHB/E, mostraram-se coerentes com os propostos pela EPPO para *E. amylovora*. Assim, entendeu-se que poderia ser usado o meio API 50CHB/E na preparação das suspensões de inoculação.

Tabela 10. Leitura dos sistemas de identificação API 20E e API 50CH padronizada pela EPPO para *Erwinia amylovora* e leitura da estirpe CFBP 1430 (controlo positivo).

Parâmetros do teste API 20E		Leitura expectável	CFBP 1430		Parâmetros do teste API 50CH		Leitura expectável	CFBP 1430		
		48h	24h	48h			72h	24h	48h	72h
ONPG	nitrofenil galactopiranosida	variavel	-	-	LARA	L-arabinose	+	-	-	+
ADH	L-arginina	- (ou fraco +)	-	-	RIB	D-ribose	+	-	-	+
LDC	L-lisina	-	-	-	DXYL	D-xilose	variavel	-	-	-
ODC	L-ornitina	-	-	-	GAL	D-galactose	variavel	-	±	+
CIT	citrato de sódio	-	-	-	GLU	D-glucose	+	±	+	+
H2S	tiosulfato de sódio	-	-	-	FRU	D-frutose	+	±	+	+
URE	ureia	-	-	-	MNE	D-manose	variavel	-	-	-
TDA	L-triptofano	-	-	-	MAN	D manitol	+	-	±	+
IND	indol	-	-	-	SOR	D-sorbitol	+	-	±	+
VP	piruvato de sódio	+ (ou variavel)	+	+	NAG	N-acetilglucosamina	+	±	+	+
GEL	gelatina	variavel	-	-	MEL	D-melibiose	variavel	-	-	-
GLU	D-glucose	+	+	+	SAC	D-sacarose	+	±	+	+
MAN	D-manitol	variavel	±	+	TRE	D-trealose	+	-	+	+
INO	inositol	variavel	-	-	GEN	β-gentiobiose	+	-	±	+
SOR	D-sorbitol	variavel	+	+						
RHA	L-ramnose	-	-	-						
SAC	D-sacarose	+	+	+						
MEL	D-melibiose	- (ou fraco +)	-	-						
AMY	amigdalina	-	-	-						
ARA	L-arabinose	+ (ou alguns -)	±	+						
OX	oxidase	-	-	-						

Na Tabela 11 apresentam-se as leituras, nos sistemas API 20E e API 50CH, obtidas nos isolados em estudo, registadas às 48 e 72 horas, respetivamente. A inscrição “CFBP 1430” respeita à coincidência dos resultados obtidos entre a estirpe CFBP 1430 e o isolado em estudo, enquanto o registo “EPPO” se refere ao cumprimento do registo padronizado pela EPPO. Sempre que se verificaram desvios relativamente à leitura padronizada pela EPPO, assinalaram-se o número de testes desviantes. Na Figura 9 pode observar-se o resultado do sistema API 20E para o isolado EA 0310 e do teste API 50 CH para o isolado EA 0300.



Figura 9. Resultado dos testes API 20E, para o isolado EA 0310 e API 50 CH para o isolado EA 0300.

Os isolados obtidos em 2010 e 2011 (isolados EA 0230 a EA 0440) expressaram o resultado esperado pela EPPO para *E. amylovora*, nos dois sistemas API, sendo que, em muitas situações, as leituras dos testes foram coincidentes com as leituras efetuadas para a estirpe de controlo (CFBP 1430).

Algumas bactérias isoladas entre 2007 e 2009 (isolados EA 0140 a EA 0220) evidenciaram concordância com a leitura expectável no API 50CH, no entanto a leitura do API 20E mostrou sempre alguma discordância relativamente à leitura padronizada pela EPPO.

Tabela 11. Leitura dos isolados nos sistemas de identificação API 20E e 50CH.

Referência	API 20E	API 50 CH		Referência	API 20E	API 50 CH
EA 0010	2 dif	1 dif		EA 0230	CFBP 1430	EPPO
EA 0020	3 dif	2 dif		EA 0240	CFBP 1430	EPPO
EA 0030	3 dif	EPPO		EA 0250	CFBP 1430	CFBP 1430
EA 0040	3 dif	3 dif		EA 0260	CFBP 1430	CFBP 1430
EA 0050	6 dif	3 dif		EA 0270	CFBP 1430	CFBP 1430
EA 0060	3 dif	n. a.		EA 0280	EPPO	CFBP 1430
EA 0070	3 dif	n. a.		EA 0290	EPPO	CFBP 1430
EA 0080	3 dif	3 dif		EA 0300	EPPO	CFBP 1430
EA 0090	3 dif	n. a.		EA 0310	EPPO	EPPO
EA 0100	3 dif	2 dif		EA 0320	EPPO	CFBP 1430
EA 0110	3 dif	2 dif		EA 0330	EPPO	EPPO
EA 0120	3 dif	1 dif		EA 0340	EPPO	CFBP 1430
EA 0130	1 dif	4 dif		EA 0350	EPPO	CFBP 1430
EA 0140	1 dif	2 dif		EA 0360	EPPO	CFBP 1430
EA 0150	4 dif	EPPO		EA 0370	CFBP 1430	EPPO
EA 0160	2 dif	EPPO		EA 0380	EPPO	CFBP 1430
EA 0170	2 dif	1 dif		EA 0390	CFBP 1430	EPPO
EA 0180	3 dif	EPPO		EA 0400	CFBP 1430	CFBP 1430
EA 0190	3 dif	EPPO		EA 0410	CFBP 1430	CFBP 1430
EA 0200	3 dif	1 dif		EA 0420	EPPO	CFBP 1430
EA 0210	3 dif	EPPO		EA 0430	CFBP 1430	CFBP 1430
EA 0220	3 dif	EPPO		EA 0440	EPPO	EPPO

(n.a.) - não avaliado; (dif) - número de testes diferentes relativamente ao padronizado pela EPPO.

As diferenças resultaram, fundamentalmente, da utilização do citrato de sódio, da L-ramnose e da amígdalina (Tabela 12). No que se refere à utilização destes compostos, a EPPO (2012b) refere que mais de 90 % dos isolados apresentam um comportamento negativo para aqueles testes, o que leva a crer que alguns isolados portugueses podem fazer parte do grupo de isolados minoritários, no que respeita à utilização do citrato de sódio, da L-ramnose e da amígdalina. De referir que Atanasova *et al.* (2007) identificaram perfis positivos para a L-ramnose em 30% dos isolados estudados e Cabrefiga (2004) identificou 6% dos isolados com perfis positivos para a utilização do citrato de sódio, da L-ramnose e da amígdalina.

Tabela 12. Códigos API 20E obtidos nos isolados.

N.º isolados	galactopiranosida	L-arginina	L-ísisina	L-ornitina	citrato de sódio	tiosulfato de sódio	ureia	L-triptofano	índol	piruvato de sódio	gelatina	D-glucose	D-maniol	inositol	D-sorbitol	L-ramnose	D-sacarose	D-melibriose	amigdalina	L-arabinose	oxitase	Código API 20E	% isolados
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX		
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0005522	18,6
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0007522	11,6
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	1004522	9,3
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0004522	7,0
2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	3004522	4,7
3	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	1204173	7,0
2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	1204333	4,7
2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1204573	4,7
2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	1205133	4,7
1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	0204171	2,3
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	1004133	2,3
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	1004733	2,3
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	1005173	2,3
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	1007363	2,3
1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	1204373	2,3
1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	1205173	2,3
1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1205573	2,3
1	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1214573	2,3
1	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	3204573	2,3
1	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	3205173	2,3
1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	7314333	2,3

(+) - reação positiva; (-) - reação negativa.

Dos 43 isolados amostrados resultaram 21 códigos API 20E, sendo que 51% dos isolados se distribuíram em cinco códigos correspondentes a leituras padronizadas pela EPPO.

Os estudos efetuados por Donat *et al.* (2005), com 48 isolados espanhóis e 13 isolados de referência, mostraram também uma falta de homogeneidade quanto ao sistema API 20E, dado que a amostra estudada se distribuiu por sete códigos, alguns deles apenas com um isolado. Apenas os códigos 0005522 e 0007522 foram obtidos nos isolados espanhóis e portugueses. No estudo de Donat *et al.* (2005), o primeiro foi encontrado em 31,5% da amostra e o segundo em 3%. O código 1005522, com maior expressão nos isolados espanhóis e de referência (48%), não foi identificado nos isolados portugueses. A estirpe CFBP 1430 apresentou o código 0005522 bem como 18,2% dos isolados em estudo. Este foi também o perfil mais frequente obtido nos estudos de Mergaert *et al.* (1984) e de acordo com Donat *et al.* (2005) nos estudos de Vantomme *et al.* (1986).

Da diversidade de perfis encontrados neste estudo e por diversos autores, depreende-se que o resultado do teste API 20E não poderá ser usado isoladamente para identificar *E. amylovora*, no entanto mostra-se útil, desde que associado a outros testes, para a sua presumível identificação (Donat *et al.*, 2005).

O isolado EA 0140, fluorescente em King B, apresentou o código 2206062, ao qual corresponde uma boa identificação para o género *Pseudomonas*.

No que concerne aos resultados do sistema API 50CH, verificou-se que 72,5% dos isolados cumpriram o padronizado pela EPPO (Tabela 13), sendo que 45% responderam aos testes da

mesma forma que a estirpe CFBP 1430. Os desvios relativamente ao padronizado pela EPPO foram encontrados na D-frutose, D-sorbitol, N-acetilglucosamina, D-trealose, D-sacarose e β -gentiobiose. Salientamos no entanto que, em 15% dos isolados, a reação para aqueles testes foi duvidosa, dado que as galerias apresentaram uma coloração alaranjada. O isolado EA 0140 apresentou reação negativa para a D-xilose, N-acetilglucosamina, D-melibiose e β -gentiobiose, único isolado que apresentou, simultaneamente, reação negativa para aqueles testes, situação que não é de estranhar por não se tratar de um presumível isolado de *E. amylovora*.

Tabela 13. Resultado do API 50CH para os isolados estudados.

L-arabinose	D-ribose	D-xilose	D-galactose	D-glucose	D-frutose	D-manose	D manitol	D-sorbitol	N-acetilglucosamina	D-melibiose	D-sacarose	D-trealose	β -gentiobiose	n.º isolados	% isolados
LARA	RIB	DXYL	GAL	GLU	FRU	MNE	MAN	SOR	NAG	MEL	SAC	TRE	GEN		
+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	18	45,0
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	3	7,5
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1	2,5
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	17,5
+	+	+	+	+	- fr	+	+	- fr	+	+	+	- fr	- fr	1	2,5
+	+	+	+	+	+	+	+	- fr	+	+	+	+	- fr	1	2,5
+	+	+	+	+	+	+	+	- fr	+	+	- fr	+	- fr	1	2,5
+	+	+	+	+	+	+	+	- fr	- fr	+	+	+	- fr	1	2,5
+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	- fr	1	2,5
+	+	+	+	+	+	+	+	- fr	- fr	+	+	- fr	+	1	2,5
+	+	+	+	+	+	+	+	-	- fr	+	+	+	+	1	2,5
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	- fr	1	2,5
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	3	7,5

(+) - reação positiva; (-) - reação negativa; (- fr) - reação negativa fraca

4.4 Detecção molecular por PCR

No teste PCR, segundo a metodologia descrita por Bereswill *et al.* (1992), foram obtidas amplificações a 1000 bp, para 28 amostras. O intervalo da amplificação obtido obedece ao estipulado pela EPPO (2004) para *Erwinia amylovora*. Também Yaich *et al.* (2011) obtiveram amplificação das bandas a 1000 bp com os mesmos *primers*.

As concentrações amplificadas variaram entre $3,2 \times 10^3$ e $1,1 \times 10^9$ ufc.mL⁻¹, exceto para os isolados EA 0300 e EA 0410 cujos duplicados foram amplificados a menores concentrações durante a realização do ensaio prévio de PCR. No entanto, as concentrações amplificadas variaram, frequentemente, entre 10^4 e 10^6 ufc.mL⁻¹ (Anexo XVII).

A Figura 10 ilustra a separação eletroforética obtida para seis isolados, sendo cada isolado amplificado para as concentrações de 10^4 e 10^5 . Apenas a banda do duplicado da amostra EA

0380, na concentração 10^4 , não foi visível, provavelmente devido a algum problema ocorrido durante o processo de amplificação. Esta situação vem comprovar a necessidade de proceder à realização do teste PCR em duplicado.

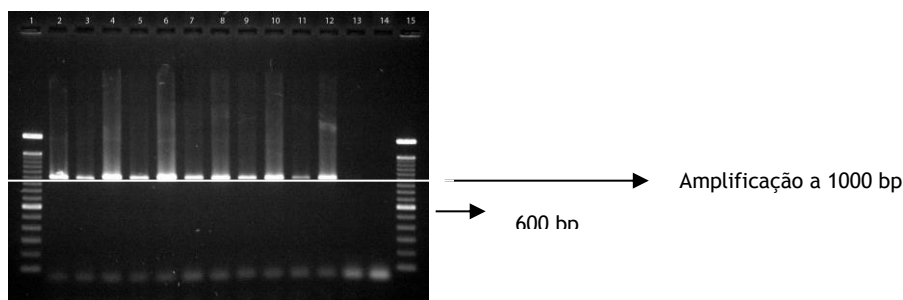


Figura 10. Separação eletroforética. Poços: 2 e 3 - CFBP 1430 ($2,6 \times 10^5$ e $2,6 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹); 4 e 5 - EA 0340 ($3,5 \times 10^5$ e $3,5 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹); 6 e 7 - EA 0350 ($5,7 \times 10^5$ e $5,7 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹); 8 e 9 - EA 0360 ($4,1 \times 10^5$ e $4,1 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹); 10 e 11 - EA 0370 ($1,4 \times 10^5$ e $1,4 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹); 12 e 13 - EA 0380 ($3,8 \times 10^5$ e $3,8 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹); 14 - controlo sem DNA; 1 e 15 - marcador de DNA de 100 bp.

As 28 amostras positivas foram isoladas das cultivares de macieira Bravo de Esmolfe; Golden Rendres e Royal Gala e das cultivares de pereira Rocha e Passe Crassane. A percentagem de testes positivos aumentou de 15% em 2006 para 100% em 2011 (Tabela 14). A percentagem total de testes positivos, pela metodologia de Bereswill *et al.* (1992), foi de 65%. Salientamos porém que, a metodologia usada neste trabalho se baseia no uso de *primers* das sequências plasmídicas do pEA29 e que de acordo com Llop *et al.* (2006) existem isolados patogénicos de *E. amylovora* que não apresentam aquele plasmídeo. Nestas situações devem ser amplificadas as sequências dos genes cromossómicos *ams*, RNA r16S ou RNA r23S (Palacio-Bielsa *et al.*, 2009; Powney *et al.*, 2011).

Tabela 14. Resultado do teste PCR, pela metodologia convencional de Bereswill *et al.* (1992).

Ano isolamento	2006		2007		2008		2009		2010		2011		Total
	Macieira	Pereira	Macieira	Pereira	Macieira	Pereira	Macieira	Pereira	Macieira	Pereira	Macieira	Pereira	
N.º isolados testados	10	3	1	0	3	0	4	0	0	5	6	11	43
N.º isolados positivos	2	0	0		1		3			5	6	11	28
Percentagem resultados positivos	20	0	0		33		75			100	100	100	
Percentagem resultados positivos	15		0		33		75		100		100		
Percentagem resultados positivos													65

4.5 Teste de patogenicidade

Na Tabela 15 apresentam-se os resultados do teste de patogenicidade, efetuado em peras e nêspas imaturas. O teste foi considerado positivo sempre que ocorreu a produção de exsudado bacteriano (Figuras 11 e 12). O número de dias após a inoculação em que o exsudado foi visível encontra-se também registado na Tabela 15.

Salienta-se que os isolados obtidos em 2010 e 2011 (isolados EA 0230 a EA 0440), inoculados em pera e nêspera, produziram infecções, de um modo geral, mais rapidamente do que os isolados obtidos entre 2006 e 2009 (isolados EA 0010 a EA 0220). Tanto as peras como as nêspersas, inoculadas com a estirpe CFBP 1430, revelaram aparecimento de exsudado bacteriano ao 3.º dia após inoculação.

Tabela 15. Resultados do teste de patogenicidade em frutos imaturos.

Referência	Orgão inoculado	Concentração suspensão de inoculação	Patogenicidade (dias após inoculação)	Referência	Orgão inoculado	Concentração suspensão de inoculação	Patogenicidade (dias após inoculação)
EA 0010	nêspera (1)	0,9x10 ⁹	-	EA 0230	nêspera (1)	0,7x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0020	nêspera (1)	1,0x10 ⁹	-	EA 0240	pera (2)	n.a.	+ (4.º)
EA 0030	nêspera (3)	0,9x10 ⁹	± (6.º)*	EA 0250	nêspera (3)	0,6x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0040	nêspera (1)	0,9x10 ⁹	-	EA 0260	pera (2)	n.a.	+ (6.º)
EA 0050	nêspera (1)	0,7x10 ⁹	-	EA 0270	pera (2)	n.a.	+ (6.º)
EA 0060	nêspera (1)	0,7x10 ⁹	-	EA 0280	pera (2)	0,6x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0070	nêspera (3)	0,8x10 ⁹	± (6.º)*	EA 0290	pera (2)	0,7x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0080	nêspera (1)	0,6x10 ⁹	-	EA 0300	pera (2)	0,7x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0090	nêspera (1)	0,8x10 ⁹	-	EA 0310	pera (2)	0,7x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0100	nêspera (1)	0,7x10 ⁹	-	EA 0320	pera (2)	1,0x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0110	nêspera (1)	0,7x10 ⁹	-	EA 0330	pera (2)	0,7x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0120	nêspera (1)	0,9x10 ⁹	+ (7.º)	EA 0340	pera (2)	0,5x10 ⁹	+ (7.º)
EA 0130	nêspera (3)	0,9x10 ⁹	-	EA 0350	pera (2)	0,8x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0140	nêspera (1)	0,7x10 ⁹	-	EA 0360	pera (2)	1,1x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0150	nêspera (1)	0,8x10 ⁹	-	EA 0370	pera (2)	0,9x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0160	nêspera (1)	0,7x10 ⁹	+ (13.º)	EA 0380	pera (2)	0,6x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0170	nêspera (1)	0,7x10 ⁹	+ (13.º)	EA 0390	pera (2)	0,7x10 ⁹	+ (5.º)
EA 0180	nêspera (1)	0,7x10 ⁹	+ (5.º)	EA 0400	pera (2)	0,9x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0190	nêspera (1)	0,9x10 ⁹	+ (7.º)	EA 0410	pera (2)	1,0x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0200	nêspera (3)	0,7x10 ⁹	± (7.º)*	EA 0420	pera (2)	0,7x10 ⁹	+ (6.º)
EA 0210	nêspera (1)	0,8x10 ⁹	+ (4.º)	EA 0430	pera (2)	0,7x10 ⁹	+ (3.º)
EA 0220	nêspera (3)	0,7x10 ⁹	± (7.º)*	EA 0440	pera (2)	0,8x10 ⁹	+ (3.º)
				CFBP 1430	nêspera (1)	1,0x10 ⁹	+ (3.º)
					pera (2)	0,83x10 ⁹	+ (3.º)
					nêspera (3)	0,7x10 ⁹	+ (3.º)

- (1) inoculação em frutos inteiros.
 (2) inoculação em frutos fatiados.
 (3) inoculação em frutos inteiros e frutos fatiados.
 (n.a.) não avaliado.
 (+) teste positivo.
 (-) teste negativo.
 (*) exsudado de fraca evolução ao longo dos dias seguintes.

Dos 43 isolados amostrados, 32 produziram infecções em frutos imaturos. Sendo que, 100% dos isolados obtidos entre 2008 e 2011 (isolados EA 0160 a EA0440) provocaram patogenicidade em frutos imaturos de espécies sensíveis ao fogo bacteriano, com a produção de exsudado bacteriano (Tabela 16). Em 2006 (isolados EA 0010 a EA 0130) apenas 3 isolados se mostraram patogénicos, correspondendo a 23% de amostras positivas.

Salienta-se que os isolados EA 0030, EA 0070, obtidos em 2006, e os isolados EA 0200 e EA 0220, obtidos em 2009, produziram menos quantidade de exsudado que os restantes isolados positivos no teste de patogenicidade. Os ensaios de Powney *et al.* (2011) mostraram isolados bacterianos de *E. amylovora* não produtores de exsudado em frutos imaturos.

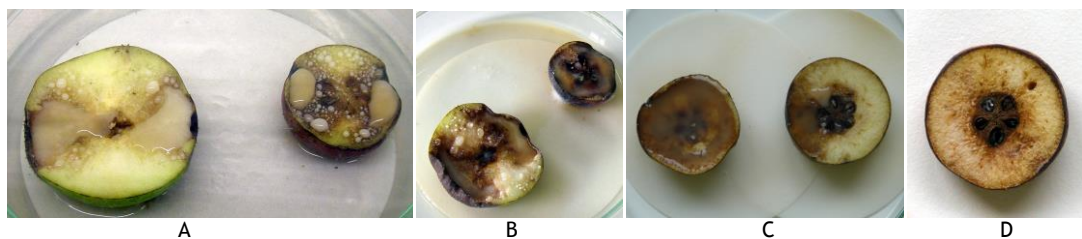


Figura 11. Presença de exsudado em peras imaturas ao 4.º (A) e 7.º dia (B) após inoculação com o isolado EA 0330 e controlo positivo com a estirpe CFBP 1430 (C) e controlo negativo com PBS ao 5.º dia após inoculação (D).

O isolado EA 0140, fluorescente em King B, não provocou exsudado nos frutos imaturos de nêspera, atuando como um controlo negativo para este teste.



Figura 12. Presença de exsudado em nêsperas imaturas ao 13.º dia após inoculação com o isolado EA 0120 (A, B e C), controlo positivo com a estirpe CFBP 1430 (D e E) e controlo negativo com PBS (F, G e H).

A patogenicidade dos isolados obtidos em 2011 (isolados EA 0280 a EA 0440) foi avaliada em fatias de peras imaturas, da cultivar Williams Rouge, com cerca de 3 cm de diâmetro e da cultivar Williams, com comprimento longitudinal aproximado de 8 cm, ambas cultivares sensíveis ao fogo bacteriano. Pode-se observar que em 65% das amostras, o aparecimento de exsudado ocorreu cerca de 2 a 3 dias (valor médio de 2,4 dias) mais cedo nas fatias de pera com 3 cm de diâmetro do que nas fatias de pera com 8 cm de comprimento longitudinal (Anexo XVIII). Esta situação está de acordo com o descrito na bibliografia no que se refere ao aumento de resistência com a idade do órgão (López *et al.*, 2009).

Por terem sido inoculados poucos isolados, não foi possível evidenciar diferenças no tempo de aparecimento dos exsudados bacterianos em fatias e frutos inteiros de nêspera.

Tabela 16. Amostras positivas no teste de patogenicidade, para *Erwinia amylovora*, em cada ano de isolamento.

Ano isolamento	2006		2007		2008		2009		2010		2011		Total
Espécie	Macieira	Pereira	Macieira	Pereira	Macieira	Pereira	Macieira	Pereira	Macieira	Pereira	Macieira	Pereira	
N.º isolados testados	10	3	1	0	3	0	4	0	0	5	6	11	43
N.º isolados positivos	1	0	0		3		2			5	6	11	28
Percentagem resultados positivos	10	0	0		100		50			100	100	100	65
N.º isolados positivos fracos	2	0	0		0		2			0	0	0	4
Percentagem resultados positivos fracos	20	0	0		0		50			0	0	0	9
Percentagem resultados positivos + positivos fracos	23		0		100		100		100		100		
Percentagem resultados positivos + positivos fracos													74

4.6 Identificação de *E. amylovora*

De acordo com EPPO (2004) e EPPO (2012b), a identificação da bactéria *Erwinia amylovora* deve assentar na combinação de dois testes baseados em diferentes características do agente patogénico, como sejam, os testes bioquímicos, serológicos ou moleculares e sempre que se entenda necessário, no teste de patogenicidade. Atendendo a este pressuposto e face aos resultados obtidos nos diferentes testes, para os isolados estudados, podemos inferir que os isolados EA 0230 a EA 0440 (22 isolados) respeitam à bactéria *E. amylovora* (Tabela 17). Salientamos, porém, que alguns destes isolados não revelaram crescimento em anaerobiose nas condições testadas e apresentaram ligeiro crescimento a temperatura de 36 °C, mas paragem de crescimento a 39°C.

Já os isolados EA 0160, EA 0190, EA 0200 e EA 0220 cresceram em condições de anaerobiose, à exceção do isolado EA 0200, apresentaram paragem de crescimento microbiano a 39 °C e evidenciaram amplificação a 1000 bp. Apresentaram um padrão bioquímico, para o API 50 CH conforme esperado, salvo o isolado EA 0200 que se mostrou negativo fraco no teste da β -gentiobiose (Anexo XIX), no entanto, o comportamento bioquímico evidenciado no API 20E mostrou diferenças no que respeita à utilização do citrato de sódio, da L-ramnose e da amigdalina (Anexo XX). Por este facto, parece necessário avaliar a resposta ao teste de patogenicidade. Da observação da Tabela 15 verificamos que os 4 isolados produziram exsudados bacterianos em nêspas imaturas entre o 7.º e o 13 dia, o que parece indicar que está presente a *E. amylovora*. De acordo com Milagro López (comunicação pessoal, 2012), até à data apenas se conhece à *E. amylovora* a capacidade de produzir exsudado bacteriano em frutos imaturos. Salienta-se que os isolados EA 0200 e EA 0220 produziram menos exsudado.

Tabela 17. Resumo do resultado dos testes.

Referência	Tipicidade colonial em NSA, King B e CCT	crescimento em anaerobiose	Mobilidade	Crescimento a 36 °C	Crescimento a 39 °C	API 20E	API 50 CH	PCR Bereswill	Patogenicidade
EA 0010	pouco caraterística	+	+	+	+	2 dif	1 dif	-	-
EA 0020	pouco caraterística	+	+	+	+	3 dif	2 dif	-	-
EA 0030	caraterística	+	+	+	+	3 dif	EPO	+	±
EA 0040	pouco caraterística	+	+	+	+	3 dif	3 dif	-	-
EA 0050	pouco caraterística	+	+	+	+	6 dif	3 dif	-	-
EA 0060	pouco caraterística	+	+	+	+	3 dif	n. a.	-	-
EA 0070	pouco caraterística	+	+	+	+	3 dif	n. a.	-	±
EA 0080	pouco caraterística	+	+	+	+	3 dif	3 dif	-	-
EA 0090	pouco caraterística	+	+	+	+	3 dif	n. a.	-	-
EA 0100	pouco caraterística	+	+	+	+	3 dif	2 dif	-	-
EA 0110	pouco caraterística	+	+	+	+	3 dif	2 dif	-	-
EA 0120	caraterística	-	+	+	+	3 dif	1 dif	+	+
EA 0130	caraterística	+	+	+	+	1 dif	4 dif	-	-
EA 0140	fluorescente em King B	+	+	+	-	1 dif	2 dif	-	-
EA 0150	caraterística	+	+	+	-	4 dif	EPO	-	-
EA 0160	caraterística	+	+	+	-	2 dif	EPO	+	+
EA 0170	pouco caraterística	+	+	+	+	2 dif	1 dif	-	+
EA 0180	pouco caraterística	+	+	+	-	3 dif	EPO	-	+
EA 0190	caraterística	+	+	+	-	3 dif	EPO	+	+
EA 0200	caraterística	-	+	+	-	3 dif	1 dif	+	±
EA 0210	caraterística	+	+	+	-	3 dif	EPO	-	+
EA 0220	caraterística	+	+	+	-	3 dif	EPO	+	±
EA 0230	muito caraterística	-	+	-	-	CFBP 1430	EPO	+	+
EA 0240	muito caraterística	-	+	-	-	CFBP 1430	EPO	+	+
EA 0250	muito caraterística	-	+	-	-	CFBP 1430	CFBP 1430	+	+
EA 0260	muito caraterística	-	+	-	-	CFBP 1430	CFBP 1430	+	+
EA 0270	muito caraterística	+	+	±	-	CFBP 1430	CFBP 1430	+	+
EA 0280	muito caraterística	-	+	-	-	EPO	CFBP 1430	+	+
EA 0290	muito caraterística	+	+	±	-	EPO	CFBP 1430	+	+
EA 0300	muito caraterística	-	+	±	-	EPO	CFBP 1430	+	+
EA 0310	muito caraterística	-	+	±	-	EPO	EPO	+	+
EA 0320	muito caraterística	-	+	-	-	EPO	CFBP 1430	+	+
EA 0330	muito caraterística	-	+	±	-	EPO	EPO	+	+
EA 0340	muito caraterística	-	+	±	-	EPO	CFBP 1430	+	+
EA 0350	muito caraterística	-	+	-	-	EPO	CFBP 1430	+	+
EA 0360	muito caraterística	+	+	-	-	EPO	CFBP 1430	+	+
EA 0370	muito caraterística	-	+	±	-	CFBP 1430	EPO	+	+
EA 0380	muito caraterística	-	+	-	-	EPO	CFBP 1430	+	+
EA 0390	muito caraterística	+	+	±	-	CFBP 1430	EPO	+	+
EA 0400	muito caraterística	-	+	±	-	CFBP 1430	CFBP 1430	+	+
EA 0410	muito caraterística	-	+	±	-	CFBP 1430	CFBP 1430	+	+
EA 0420	muito caraterística	-	+	-	-	EPO	CFBP 1430	+	+
EA 0430	muito caraterística	-	+	±	-	CFBP 1430	CFBP 1430	+	+
EA 0440	muito caraterística	-	+	-	-	EPO	EPO	+	+

Os isolados EA 0030 e EA 0120 apresentaram utilização de citrato de sódio, L-ramnose e amígdalina, sendo que o primeiro apresentou o padrão esperado em API 50 CH e o segundo mostrou-se negativo no teste do sorbitol. Os isolados foram amplificados a 1000 bp pela metodologia de Bereswill *et al.* (1992) (Anexo XVII) e apresentaram exsudados bacterianos em nêspers imaturas aos 6.º e 7.º dias após inoculação (Tabela 15), sendo que o isolado EA 0030 se mostrou menos patogênico. Ambos os isolados cresceram a 39°C, contra o descrito na bibliografia. Os isolados EA 0070, EA 0170, EA 0180 e EA 210 mostraram-se semelhantes aos anteriores no que respeita aos sistemas API, sendo que os dois primeiros isolados crescem a 39°C enquanto os segundos revelam paragem de crescimento para aquela temperatura. As colônias mostraram-se atípicas por serem demasiado mucoides e pouco domadas. No teste de patogenicidade surgiram aparecimento de exsudados bacterianos a partir do 4.º dia após inoculação (Figura 13), mas nenhum deles foi amplificado com os *primers* A e B de Bereswill *et al.* (1992). Esta metodologia baseia-se no uso de *primers* das sequências plasmídicas do pEA29 e existem isolados patogênicos de *E. amylovora* que não apresentam aquele plasmídeo. Uma vez que não foram testadas as sequências dos genes cromossômicos *ams*, RNA r16S ou RNA r23S, os isolados que se apresentaram negativos, pela metodologia de Bereswill *et al.* (1992), poderão ser apenas falsos negativos devido à ausência do plasmídeo pEA29 ou devido à falta de eficácia da metodologia.



Figura 13. Presença de exsudado em nêspers imaturas, ao 13.º dia após inoculação, com os isolados EA 0070, EA 0170, EA 0180 e EA 0210.

Os isolados obtidos em 2010 e 2011 (isolados EA 0230 a EA 0440), inoculados em pera ou nêspers, produziram, de um modo geral, infeções mais rapidamente do que os isolados obtidos entre 2006 e 2009 (isolados EA 0010 a EA 0220), o que leva a presumir tratarem-se de estirpes mais virulentas.

Tal como previsto, o isolado EA 0140, fluorescente em King B, não foi amplificado com os *primers* A e B de Bereswill *et al.* (1992) e não provocou a formação de exsudados bacterianos em frutos imaturos, uma vez que, de acordo com o perfil API 20E, será presumivelmente *Pseudomonas* sp.

Dos 43 isolados estudados, 26 % mostraram-se presumivelmente negativos nos testes de identificação para *E. amylovora*, uma vez que se revelaram, simultaneamente, negativos no teste de patogenicidade e na amplificação com os *primers* de Bereswill *et al.* (1992).

5 Conclusões

A análise da caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Erwinia amylovora*, obtidos em Portugal, desde o aparecimento dos primeiros focos de fogo bacteriano, detetados em 2006, e nos anos sucessivos até 2011, permitiu chegar às conclusões que a seguir se enunciam.

Dos 44 isolados avaliados, 22 (isolados EA 0230 a EA 0440) apresentaram resultados coincidentes com o expectável para *E. amylovora*.

Os isolados EA 0160, EA 0190, EA 0200 e EA 0220 evidenciaram amplificação a 1000 bp, apresentaram um padrão bioquímico, para o API 50CH conforme esperado, salvo o isolado EA 0200 que se mostrou negativo fraco no teste da β -gentiobiose, mas o comportamento bioquímico no API 20E mostrou diferenças no que respeita à utilização do citrato de sódio, da L-ramnose e da amigdalina. Os 4 isolados produziram exsudados bacterianos em nêspas imaturas entre o 7.º e o 13.º dias, o que leva a depreender que são *E. amylovora*, apesar de os isolados EA 0200 e EA 0220 terem produzido menos exsudado. Os isolados EA 0030 e EA 0120 apresentaram utilização do citrato de sódio, da L-ramnose e da amigdalina, sendo que o primeiro apresentou o padrão esperado em API 50CH e o segundo se mostrou negativo no teste do sorbitol. Os isolados foram amplificados a 1000 bp pela metodologia de Bereswill *et al.* (1992) e apresentaram exsudados bacterianos em nêspas imaturas ao 6.º e 7.º dias após inoculação, sendo que o isolado EA 0030 se mostrou menos patogénico. Ambos os isolados cresceram a 39°C, contra o descrito na bibliografia. Esta evidência leva-nos a sugerir a possibilidade de alguns isolados portugueses poderem crescer a temperaturas superiores a 39°C. Os isolados EA 0070, EA 0170, EA 0180 e EA 210 mostraram-se semelhantes aos anteriores no que respeita aos sistemas API, sendo que os dois primeiros isolados crescem a 39°C, enquanto os segundos revelam paragem de crescimento para aquela temperatura. As colónias mostraram-se atípicas por serem demasiado mucoides e pouco domadas. No teste de patogenicidade verificou-se o aparecimento de exsudados bacterianos a partir do 4.º dia após inoculação, mas nenhum deles foi amplificado com os *primers* de Bereswill *et al.* (1992). Considera-se de interesse, para confirmação, efetuar amplificações através de outras metodologias.

Dos 43 isolados estudados, 26 % mostraram-se presumivelmente negativos nos testes de identificação para *E. amylovora*, uma vez que se revelaram, simultaneamente, negativos no teste de patogenicidade e na amplificação com os *primers* de Bereswill *et al.* (1992).

O isolado EA 0140, fluorescente em King B, será presumivelmente pertencente ao género *Pseudomonas*.

Os isolados obtidos em 2010 e 2011 (isolados EA 0230 a EA 0440), inoculados em pera e nêspas, produziram, de um modo geral, infeções mais rapidamente do que os isolados obtidos entre 2006 e 2009 (isolados EA 0010 a EA 0220), o que leva a presumir tratarem-se de estirpes mais virulentas.

Nem todos os isolados se mostraram anaeróbios facultativos nas condições ensaiadas. Tal situação não permite afirmar tratarem-se de isolados aeróbios estritos, uma vez que estes isolados fermentaram os hidratos de carbono no sistema API 50CH, em condições de anaerobiose.

No que se refere à paragem de crescimento a 36°C, apenas 25% dos isolados evidenciaram paragem de crescimento para este valor de temperatura. Constatou-se que aquele número aumentou para 68% quando os isolados foram sujeitos a uma temperatura de 39°C. Considera-se de interesse continuar estes estudos, uma vez que poderão demonstrar uma adaptação da bactéria às nossas condições climáticas. Se tal aconteceu, em condições favoráveis de humidade, a bactéria poderá provocar infeções a temperaturas mais elevadas do que o inicialmente previsto.

A utilização do citrato de sódio, da L-ramnose e da amigdalina, evidenciada em alguns isolados, aponta para o facto de alguns isolados portugueses pertencerem ao grupo minoritário de estirpes que utilizam aqueles compostos.

Os isolados estudados mostraram-se pouco homogéneos no que respeita à caracterização bioquímica efetuada no sistema API 20E, dado que resultaram 21 códigos. Da diversidade de perfis encontrados, depreende-se que o resultado do teste API 20E não poderá ser usado isoladamente para identificar *E. amylovora*, no entanto, pode ser útil desde que associado a outros testes.

No teste de patogenicidade, o aparecimento de exsudado bacteriano ocorreu cerca de 2 a 3 dias mais cedo em peras de 3 cm de diâmetro comparativamente a peras com comprimento longitudinal aproximado de 8 cm.

Entendemos que os isolados estudados deverão ser amplificados através de outras metodologias, para confirmação de alguns resultados obtidos nos nossos ensaios, assim como para determinação dos perfis filogenéticos. Esta determinação poderia permitir conhecer a origem geográfica dos isolados estudados.

Consideramos de interesse continuar os estudos de caracterização fisiológica, bioquímica e molecular dos isolados portugueses, pois o conhecimento da bactéria *Erwinia amylovora*, nas nossas condições, contribuirá para um melhor controlo e erradicação.

Referências bibliográficas

- Agaskaveg JE, Förster H & Wade, ML. 2011. Effectiveness of kasugamycin against *Erwinia amylovora* and its potential use for managing fire blight of pear. *Plant Disease*, 95: 448-454.
- Aldwinckle H. 2011. Estado actual do fogo bacteriano e seu controlo em porta-enxerto infetados de macieira em Nova York. Seminário Fogo Bacteriano: uma abordagem mundial, 27 e 28 de outubro, Óbidos.
- Atanasova I; Stefanova K; Kabadjova P; Tishkov S; Dimitrov Z; BogatzevskaN; Moncheva P. 2007. Phenotypic diversity of *Erwinia amylovora* in Bulgaria. *Z. Naturforsch*, 62: 857-868.
- Babosa E, Ferré R, Planas M, Feliu L, Besalú E, Cabrefiga J, Bardaji E & Montesinos E. 2007. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides*, 28: 2276-2285.
- Balduque R, Cambra MA. & Lozano C. 1996. El fuego bacteriano de las Rosáceas (*Erwinia amylovora*). *Informaciones Técnicas*, 1/1996. Dirección General de Tecnología Agraria, Departamento de Agricultura, Gobierno de Aragón.
- Bereswill S, Bugert P, Bruchmuller I & Geider K. 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2636-2642.
- Bereswill S, Jock S, Bellemann P & Geider K. 1998. Identification of *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containing copper sulphate and by capsule staining with lecithin. *Plant Disease*, 82:158-164.
- Bereswill S, Pahl A, Bellemann P, Zeller W & Geider K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:3522-3526.
- Billing E, Baker LAE, Crosse JE & Garret CME. 1961. Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burril) Winslow *et al.* *Journal of Applied Bacteriology*, 24: 195-211.
- Billing E. 2000. Fire blight risk assessment systems and models. (ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Bogdanove AJ, Kim JF & Beer SV. 2000. Disease-specific genes of *Erwinia amylovora*: *Keys to understanding pathogenesis and potential targets for disease control*. (ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Bonaterra A, Cabrefiga J, Camps J & Montesinos E. 2007. Increasing survival and efficacy of a bacterial biocontrol agent of fire blight of rosaceous plants by means of osmoadaptation. *FEMS Microbiology Ecology*, 61: 185-195.
- Bonn WG & Van der Zwet T. 2000. Distribution and economic importance of Fire Blight. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Braun-Kiewnick A & Sands DC. 2001. Gram-negative bacteria, *Pseudomonas*. In *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (ed. Schaad, N.W; Jones, J.B.; Chun, W.). APS, St Paul, EUA.
- Cabrefiga J. 2004. Fire blight (*Erwinia amylovora*) of rosaceous plants. Pathogen virulence and selection and characterization of biological control agents. Tesis Doctoral. Universitat de Girona.
- Cambra MA, Palacio-Bielsa A, Lozano C & Crespo J. 2002. El fuego bacteriano de las Rosáceas. *Erwinia amylovora*. *Informaciones Técnicas*, 1/2002. Dirección General de Tecnología Agraria, Departamento de Agricultura, Gobierno de Aragón.
- Campbell CL. 1983. Erwin Frink Smith - Pioneer plant pathologist. *Annual Review of Phytopathology*, 21: 21-27.
- Carter N. 2010. Exploring fire blight, part I: Models. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Ontario, Canada.
- Cesbron S, Paulin J-P, Tharaud M, Barny M-A & Brisset M-N. 2006. The alternative δ factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under *hrp*-inducing conditions. *Microbiol. Lett.*, 257: 221-227.
- CFBP (Collection Française de Bactéries Phytopathogènes). 2012. Consulta em: <http://www.straininfo.net/strains/761795/browser;jsessionid=EE5D0CFB234D3DD404FE97FC0FE0C38D> (janeiro 2012).
- Cruz L. 2010. Fogo bacteriano - *Erwinia amylovora*. Boletim Técnico. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Instituto Nacional de Recursos Biológicos.
- Cruz L. 2011. O fogo bacteriano das rosáceas. Seminário Fogo Bacteriano: uma abordagem mundial, 27 e 28 de outubro, Óbidos.
- De Bellis P, Schena L & Cariddi C. 2007. Real-time scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. *European Journal Plant Pathology*, 118: 11-22.
- DGADR (Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural). 2012. Produtos autorizados para combate do fogo bacteriano em Portugal. Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território. Oeiras.

- DGADR, COTHN, DRAPLVT, INRB IP, FENAFRUTAS, FNOP, ANP & APMA. 2011. Manual de Boas Práticas para o Controlo do fogo Bacteriano - *Erwinia amylovora*. Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território, Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. Oeiras.
- Donat MV. 2004. Caracterización fenotípica y genotípica de aislados Españoles de *Erwinia amylovora*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Valencia.
- Donat V, Biosca EG, Rico A, Peñalver J, Borrueal M, Berra D, Basterretxea T, Murillo J & López MM. 2005. *Erwinia amylovora* strains from outbreaks of fire blight in Spain: phenotypic characteristics. *Annals of Applied Biology*, 146: 105-114.
- DRAPC (Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro). 2012a. Fogo bacteriano, *Erwinia amylovora*: Fruticultores. Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território. Castelo Branco.
- DRAPC (Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro). 2012b. Fogo bacteriano, *Erwinia amylovora*: Viveiristas. Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território. Castelo Branco.
- Earth Trampler Consulting. 2005. Fire blight of apple and pear in Canada: economic importance and strategy for sustainable management of the disease. Canadian Horticultural Council's, Apple working Group. Consultado em: http://publications.gc.ca/collections/collection_2009/agr/A52-159-2005E.pdf. Acesso novembro 2012.
- EPPO. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests - *Erwinia amylovora*. *Bulletin EPPO*, 34: 159-171.
- EPPO. 2012a. EPPO A2 list of pests recommended for regulation as quarantine pests. <http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>. Acesso Janeiro 2012.
- EPPO. 2012b. Diagnostic protocol for *Erwinia amylovora*. PM 7/20(2).
- EPPO. s/d. A2 list, EU Annex II//A2 Protocol for Diagnosis of quarantine Organism - *Erwinia amylovora*.
- EUPHRESKO Final Report. 2009. ERWINDECT - Development and validation of innovative diagnostic tools for the detection of fire blight (*Erwinia amylovora*).
- Evans K, Frank E, Beddes T, Pace M, Shao M & Moulton A. 2008. Fire Blight. Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory.
- Expert D, Dellagi A & Kachadourian R. 2000. Iron and fire blight: role in pathogenicity of desferrioxamine E, the main siderophore of *Erwinia amylovora*. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Fatmi M. 2011. Fire blight (*Erwinia amylovora*) the Moroccan experience. Seminário Fogo Bacteriano: uma abordagem mundial, 27 e 28 de outubro, Óbidos.
- Geider K. 2000. Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan. (ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Gorris MT, Cambra M, Lecomte P, Llop P, Chartier R, Paulin JP & López MM. 1996. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae*, 411: 41-46 (cit. López *et al.*, 2009).
- Güel I, Cabrefiga J, Badosa E, Ferre R, Talleda M, Bardaji E, Planas M, Feliu L & Montesinos E. 2011. Improvement of the efficacy of linear undecapeptides against plant-pathogenic bacteria by incorporation of d-amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*, XX: 2667-2675.
- Guilford PJ, Taylor RK, Clark RG, Hale CN & Forster LS. 1996. PCR-based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 411: 53-56.
- Hale CN, Taylor RK, Clark RG & Batchelor TA. 1996. Quarantine and market access. *Acta Horticulturae*, 411:63-65.
- Holliger E. 2012. Le guide arbo d'ACW: Few bactérien en Suisse. *Revue Suisse Viticulture Arboriculture Horticulture*, 44: 18-20.
- Holt TG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT & Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9.^a Ed. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, Maryland, EUA.
- Ishimaru C & Klos EJ 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathol.*, 74: 1342-1345.
- Ivanovic M; Obradovic A; Gasic, K; Minsavage, GV; Dickstein, ER; Jones, JB. 2012. Exploring diversity of *Erwinia amylovora* population en Serbia by conventional and automated techniques and detection of new PFGE patterns. *Eur. J. Plant Pathol.*, 133: 545-557.
- Johnson KB & Stockwell VO. 2000. Biological control of fire blight. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Johnson KB. 2000. Fire blight of apple and pear. *The Plant Health Instructor*.

- Jones AL & Geider K. 2001. Gram-negative bacteria, *Erwinia amylovora* group. In Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Ed. Schaad NW, Jones JB & Chun W). APS, St Paul, EUA.
- Jones AL & Schnabel EL. 2000. The development of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora*. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Kabadjova-Hristova P, Atanasova I, Dousset X & Moncheva P 2006. Multiplex PCR assay for identification of *Erwinia amylovora* - The causative agent of fire blight. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 20: 21-25.
- Kim JE & Beer SV. 2000. Hrp Genes and harpins of *Erwinia amylovora*: a decade of discovery. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Kim W-S, Gardan L, Rhim S-L & Geider K. 1999. *Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 899-906.
- King EO, Ward M & Raney DE. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Lab. Clin. Med.* 44: 301-307 (cit. Ordax M, 2008).
- Kokosková B, Mráz I & Hyblovác J. 2007. Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for reliable detection of *Erwinia amylovora*. *Folia Microbiol.*, 52: 175-182.
- Lelliott RA & Stead DE. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. British Society for Plant Pathology and Blackwell Scientific Publications, London, UK.
- Lespinasse Y & Aldwinckle H. 2000. Breeding for resistance to fire blight. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Llop P, Bonaterra A, Peñalver J & López MM. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:2071-2078.
- Llop P, Cabrefiga J, Smits THM, Dreo T, Barbé S, Pulawska J, Bultreys A, Blom J, Montesinos E & López MM. 2011. *Erwinia amylovora* novel plasmid pEI70: complete sequence, biogeography, and role in aggressiveness in the Fire Blight phytopathogen. *PLoS ONE* 6(12): e28651.
- Llop P, Caruso P, Cubero J, Morente C & López, MM. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 23-31.
- Llop P, Donat V, Rodríguez M, Cabrefiga J, Ruz L, Palomo JL, Montesinos E & López M.M. 2006. An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopathology*, 96: 900-907.
- López MM, Ordax M, Peñalver J, Roselló M, Gorris M, Cambra M, Marco-Noales E, Biosca E, Palacio-Bielsa A & Llop P. 2009. El fuego bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*). Capítulo 2 - *Erwinia amylovora*: Características generales. Métodos de diagnóstico de la enfermedad e identificación de *E. amylovora*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- López MM, Roselló M, Llop P, Ferrer S, Christen R & Garden L. 2011. *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov., a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61:561-567.
- Luz JP & Amaro C. 2011. Estudo do Fogo Bacteriano na região centro de Portugal. Seminário Fogo Bacteriano: uma abordagem mundial, 27 e 28 de outubro, Óbidos.
- Luz JP. 2011. Fogo Bacteriano em Portugal. BayFruta clube de fruticultores, Bayer CropScience. Lisboa.
- Maes M, Garbeva P & Crepel C. 1996. Identification and sensitive endophytic detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 45: 1139-1149.
- McManus PS & Jones AL. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-Dot-Blot and reverse-Blot hybridizations. *Phytopathology*, 85: 618-623.
- Melgarejo P, Garcia-Jiménez J, Jordá MC, López MM, Andrés MF & Duran-Vila N. 2010. Patógenos de plantas descritos en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2.ª ed. Madrid.
- Mergaert J; Verdonck L; Kersters K; Swings J; Boeufgras JM; De Ley. 1984). Numerical taxonomy of *Erwinia* species using API Systems. *Journal of General Microbiology*, 130: 1893-1910.
- Miller TD & Schroth MN. 1972. Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pears with selective medium. *Phytopathology*, 62: 1175-1182.

- Mohammadi M, Moltmann E, Zeller W & Geider K. 2009. Characterisation of naturally occurring *Erwinia amylovora* strains lacking the common plasmid pEA29 and their detection with real-time PCR. *Eur. Journal Plant Pathology*, 124: 293-302.
- Momol MT & Aldwinckle HS. 2000. Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Montesinos E & López MM. 2000. Enfermedades de los frutales de pepita y hueso. Fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*). Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Montesinos E, Llorente I, Badosa E, Cabrefiga J, Bonaterra A, Ruiz L, Moragrega C & Francês J. 2009. El fuego bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*). Capítulo 3 - Sistemas de predicción y métodos de control del fuego bacteriano. La enfermedad. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- Montesinos E. 2011. Experiencia práctica del control del fuego bacteriano en España. Seminário Fogo Bacteriano: uma abordagem mundial, 27 e 28 de outubro, Óbidos.
- Norelli JL & Aldwinckle HS. 2000. Transgenic varieties and rootstocks resistant to fire blight. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Norelli JL, Jones AL & Aldwinckle HS. 2003. Fire blight management in the twenty-first century. *Plant Disease*, 87:756-765.
- Nunes AP & Martins C. 2012. Infogobacteriano. Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional, 01:Febrero.2012.
- Obradovic D, Balaz J & Kevresan S. 2007. Detection of *Erwinia amylovora* by a novel chromosomal polymerase chain reaction primers. *Microbiology*, 76: 844-852.
- Ordax M, Biosca EG, Wimalajeewa, SC, López MM & Marco-Noales E. 2009. Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 106-116.
- Ordax M, Marco-Noales E, López MM & Biosca EG. 2006. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: introduction of the viable-but-nonculturable State. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3482-3488.
- Ordax M. 2008. Supervivencia de *Erwinia amylovora* en condiciones de estrés: influencia de la presencia de cobre y la limitación de nutrientes. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos Departamento de Biotecnología. Valencia.
- Palacio-Bielsa A & Cambra MA. 2009. El fuego bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*). Capítulo 1 - El fuego bacteriano: La enfermedad. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- Palacio-Bielsa A, Cambra MA & López MM. 2009. PCR Detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). *Journal of Plant Pathology*, 91: 249-297.
- Palomo JL; Garcia P; Cortés L. (s/d). *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* Fuego bacteriano de las rosáceas. Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Diputación Foral de Guipúzcoa . Centro Regional de Diagnóstico de la Junta de Castilla y León. Ficha 110.
- Paulin JP. 2000. *Erwinia amylovora: General characteristics, biochemistry and serology*. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Pirc M, Ravnikar M, Tomlinson J & Dreo T. 2009. Improved fire blight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology*, 58: 872-881.
- Powney R, Beer SV, Plummer K, Luck J & Rodoni B. 2011. The specificity of PCR-based protocols for detection of *Erwinia amylovora*. *Australasian Plant Pathology Society*, 40: 87-97.
- Psallidas G & Tsiantos J. 2000. Control of fire blight. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Ray TC, Smith ARW, Carter KJ & Hignett RC. 1986. Composition of lipopolysaccharides from four strains of *Erwinia amylovora*. *Journal of General Microbiology*, 132: 3159-3167.
- Raymundo AK & Ries SM. 1980a. Mobility of *Erwinia amylovora*: *Phytopathology*, 70: 1062-1065.
- Raymundo AK & Ries SM. 1980b. Chemotaxis of *Erwinia amylovora*: *Phytopathology*, 70: 1066-1069.
- Roselló M, Peñalver J, Llop P, Gorris MT, Chartier R, Garcia F, Montón C, Cambra M & López MM. 2006. Identification of an *Erwinia* sp. different from *Erwinia amylovora* and responsible for necrosis on pear blossoms. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28: 30-41.
- Salm H & Geider K. 2004. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Plant Pathology*, 53: 602-610.

- Santander RD, Català-Senent JF, Marco-Noales E & Biosca EG. 2012. In plant recovery of *Erwinia amylovora* viable but nonculturable cells. *Trees*, 26: 75-82.
- Schaad NW, Jones JB & Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS, St Paul, USA.
- Sebahia M, Bocsanczy AM, Biehl BS, Quail MA, Perna NT, Glasner JD, DeClerck GA, Cartinhour S, Scheider DJ, Bentley SD, Parkhill J & Beer SV 2010. Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 49946. *J. Bacteriol.*, 192: 2020-2021.
- Selectis (s/d). Fogo bacteriano: ameaça presente. Selectis.
- Serra C & Sousa S. 2011. Legislação nacional para o fogo bacteriano. Seminário Fogo Bacteriano: uma abordagem mundial, 27 e 28 de outubro, Óbidos.
- Silvestri G & Egger S. 2011. Combattre le feu bactérien grâce à des variétés peu sensibles. *Revue Suisse Viticulture Arboriculture Horticulture*, 43: 352-360.
- Smits THM, Rezzonico F, Kamber T, Blom J, Goesmann A, Frey JE & Duffy B. 2010. Complete genome sequence of fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *MPMI*, 4: 384-393.
- Steiner PW. 2000. Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Stöger A, Schaffer J & Ruppitsch W. 2006. A rapid and sensitive method for direct detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic and asymptomatic plant tissues by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*, 154: 469-473.
- Taylor RK, Guilford PJ, Clark RG, Hale CN & Forster RLS. 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29: 35-43.
- Thomson SV. 2000. Epidemiology of fire blight. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Van der Zwet T & Keil HL. 1979. Fire Blight: a bacterial disease of rosaceous plants. United States Department of Agriculture Handbook (USDA), 510. Washington DC.
- Van der Zwet T, Orolaza-Halbrendt N & Zeller W. 2012. Fire blight: History, biology and management. The American Phytopathological Society, St Paul, USA.
- Vanneste JL & Eden-Green S. 2000. Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues. (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Vanneste JL. 2000. Fire Blight. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. (ed. Vanneste J.) CAB International, Wallingford, UK.
- Vantomme R; Rijckaert C; Swings J; De ley J. (1986). Characterization of further *Erwinia amylovora* strains and the application of the API 20E system in diagnosis. *Journal of Phytopathology*, 117: 34-42.
- Wang D, Korban SS & Zhao Y. 2010. Molecular signature of differential virulence in natural isolates of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 100: 192-198.
- Wilcox WF. 1994. Fire blight *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow. Tree Fruit Crops. Cornell Cooperative Extension. USA.
- Yaich M, Fatmi MB, Bougsiba M, Valentini F, Scuderi G, D'Onghia AM & Cirvilleri G. 2011. Fire Blight (*Erwinia amylovora* (Burril) Winslow) in Morocco: importance, geographical distribution and characterization. *Phytopathologia Mediterranea*, 50: 212-227.

Anexos

Anexo I. Distribuição mundial do fogo bacteriano

(adaptado de EPPO PQR - informação gerado a 10.01.2012)

Europa	
Albania	B
Alemanha	B
Arménia	B
Austria	C
Bélgica	B
Bielo-Rússia	C
Bósnia e Herzgovinia	B
Búlgaria	B
Chipre	A
Croácia	B
Dinamarca	B
Eslováquia	C
Eslovénia	B
Espanha	B
França	B
Grécia	A
Holanda	A
Hungria	B
Irlanda	C
Itália	B

Letónia	C
Lituania	B
Luxemburgo	B
Macedónia	A
Moldávia	A
Montenegro	D
Noruega	B
Polónia	B
Reino Unido	B
Républica Checa	B
Roménia	A
Sérvia	B
Suécia	B
Suiça	B
Turquia	A

Oceania	
Nova Zelândia	B

América	
Bermuda	D
Canada	A
Estados Unidos	A
Guatemala	D
México	B

Ásia	
Irão	B
Israel	A
Jordania	D
Líbano	A
Síria	B

África	
Algéria	C
Egito	B
Marrocos	B

A - Presente, amplamente distribuída; B - Presente, distribuição restringida; C - Presente, pouco frequente; D - Presente, sem detalhes

Anexo II. Hospedeiros de *Erwinia amylovora*

(EPPO PQR - informação gerada a 10.01.2012)

Principais	Secundários	Silvestres	Inoculação artificial
<i>Cotoneaster bullatus</i>	<i>Amelanchier alnifolia</i>	<i>Pyrus</i>	<i>Rosa</i>
<i>Cotoneaster dammeri</i>	<i>Amelanchier canadensis</i>		
<i>Cotoneaster lacteus</i>	<i>Chaenomeles</i>		
<i>Cotoneaster lucidus</i>	<i>Cotoneaster</i>		
<i>Cotoneaster microphyllus</i>	<i>Crataegus</i>		
<i>Cotoneaster moupinensis</i>	<i>Cydonia oblonga</i>		
<i>Cotoneaster salicifolius</i>	<i>Eriobotrya japonica</i>		
<i>Cotoneaster x watereri</i>	<i>Malus</i>		
<i>Crataegus monogyna</i>	<i>Mespilus germanica</i>		
<i>Crataegus oxyacantha</i>	<i>Pyracantha</i>		
<i>Malus domestica</i>	<i>Pyrus elaeagrifolia</i> var. <i>kotschyana</i>		
<i>Pyracantha crenatoserrata</i>	<i>Sorbus</i>		
<i>Pyrus communis</i>			
<i>Sorbus aria</i>			
<i>Stranvaesia davidiana</i>			

Anexo III. Suscetibilidade varietal de macieira e pereira ao fogo bacteriano

Suscetibilidade varietal da macieira (adaptado de Van der Zwet *et al.*, 2012 e Palacio-Bielsa *et al.*, 2009)

Pouco sensível	Medianamente sensível	Muito sensível	
Arkansas Black	Alkmene	Abbondanza	Wayne
Boskoop	Baldwin	Beacon	Wealthy
Delicious (Red)	Ben Davis	Berlepsch	Winter Banana
Early Red One	Cortland	Burgundy	Yellow Newton
Glockenapfel	Elstar	Cox's Orange Pippin	Yellow Transparent
Haralson	Empire	Fuji	York Imperial
Jamba	Fiesta	Gala	
Jugol	Golden Delicious	Gloster	
Liberty	Granny Smith	Goldparmane	
Lysgolden	Gravenstein	Idared	
Maigold	Grimes Golden	Ingrid Marie	
Manter	Jerseymac	James Grieve	
Nova	Jonafree	Jonagold	
Ontario	Jonamac	Jonathan	
Oregon Spur	Macoun	Klarapfel	
Priam	McIntosh	Lodi	
Prima	Melrose	Mollies Delicious	
Priscilla	Monroe	Morgenduft	
Quinte	Mutsu	Niagara	
Red Chief	Northwestern Greening	Nittany	
Redfree	Oldenburg	Northern Spy	
Reinette Blanca	Reinette Gries	Paulared	
Sir Prize	Royal Gala	Reine de Reinettes	
Splendor	Spartan	Rhode Island Greening	
Starkimson	Stayman	Rome Beauty	
Starking Delicious	Summer Rambo	Twenty Ounce	
Topred		Tydeman's Early	
Winesap		Verde Doncella	

Suscetibilidade varietal da pereira (adaptado de Van der Zwet *et al.*, 2012 e Lespinasse & Aldwinckle, 2000)

Pouco sensível	Medianamente sensível	Muito sensível	
Alexander Lucas	Beurre d'Amantis	Abate Fetel	Flemish Beauty
Ayers	Beurre Diel	Alexandrine Douillard	Forelle
Beurre Giffard	Beurre Hardenpont	Aurora	General Leclerc
Harrow Delight	Bonne Louise d'Avanches	Bartlett (Williams)	Gorham
Harrow Sweet	Butirra Precoce Morettini	Beurré d'Anjou	Grand Champion
Honeysweet	Charneu	Beurré Bosc	Herzogin Elsa
Magness	Clara Frijs	Beurre Clairgeau	Highland
Maxine (Starking Delicious)	Conference	Beurre Durondeau	Jules Guyot
Monterey	Dawn	Beurre Hardy	Kristally
Moonglow	Douglas	Blanquilla	Laxton's Superb
Potomac	Duchesse d'Angouleme	Bunte Juli	Packham's Triumph
Rocha	Garber	California	Passe Crassane
Tyson	Harvest Queen	Cascade	Precoce de Trevoux
Warren	Kaiser Alexander	Clapp's Favorite	Sierra
	Kieffer	Comtesse de Paris	Starkrimson (Red Clapp)
	Lincoln	Concorde	Triumph de Vienne
	Luscious	Coscia	Winter Cole
	Pierre Corneille	Cure	Winter Nelis
	Rogue Red	De Voe	
	Seckel	Doyenne du comice	
	Spartlett	Earlibrite	
	Worden Seckel	Eldorado	

Anexo IV. Sensibilidade dos porta-enxertos de macieira e pereira ao fogo bacteriano

Sensibilidade dos porta-enxertos de macieira (adaptado de Van der Zwet *et al.*, 2012 e DGDAR *et al.*, 2011)

Pouco sensível	Medianamente sensível	Muito sensível
M.2	M.1	M.3
M.7	M.4	M.6
M.15	M.8	M.9
	M.10	M.16
	M.12	M.26
	M.13	Pajam 1 ® <i>Lancep</i>
	M.25	Pajam 2 ® <i>Cepiland</i>
	M.27	
MM.102	MM.106	MM.113
MM.103	MM.107	MM.114
MM.104	MM.109	
MM.105	MM.112	
MM.110		
MM.111		

Sensibilidade dos porta-enxertos de pereira (adaptado de DGDAR *et al.* 2011)

Pouco sensível	Medianamente sensível	Muito sensível
OHF 333 ® Brokmal		
		Marmeleiro EMC
		Marmeleiro d'Adams 332
		Marmeleiro EMA
		Marmeleiro Sydo
		Marmeleiro BA29
		Franco (<i>Pyrus communis</i>)

Anexo V. Isolamento de bactérias a partir de material vegetal infectado

- Desinfetar a bancada com álcool a 70%
- Lavar material em água corrente para retirar impurezas;
- Lavar material com água destilada;
- Cortar pedacinhos do material infectado (selecionar zonas onde o crescimento bacteriano é mais ativo - transição entre material são e necrosado);
- Colocar os pedaços em PBS;
- Pressionar o material para que as bactérias se desloquem para a água;
- Deixar macerar durante 5 minutos;
- Colocar uma gota (50 µL) da suspensão/placa, em placa de Petri com meio de cultura de agar nutritivo com 5% de sacarose (NSA), King B e CCT;
- Semear várias placas para que a probabilidade de isolar o ou os agentes patogénicos seja mais elevada;
- Espalhar a gota de suspensão com semeador;
- Colocar as placas de Petri na estufa a temperatura entre os 22 - 25° C

Anexo VI. Composição dos meios de cultura e solução tampão

Agar Nutritivo - NA

Triptona	5 g
Extrato de carne	3 g
Agar	12 g
Água destilada	1 L

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Agar Nutritivo com 5% de sacarose - NSA

Triptona	5 g
Extrato de carne	3 g
Agar	12 g
Sacarose	50 g
Água destilada	1 L

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

King B

Proteose peptona n.º 3	20,0 g
Glicerol	10,0 mL
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1 L

Ajustar o pH a 7.0-7.2. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

CCT

Sacarose	100 g
Sorbitol	10 g
Niaproof	1,2 mL
Cristal violeta (solução 0.1% etanol)	2 mL
Agar nutritivo	23 g
Água destilada	1 L

Ajustar pH a 7,0-7,2. Esterilizar a 115 °C durante 10 minutos

Preparar uma solução de:

Nitrato de tálio (1% w/v em solução aquosa)	2 mL
Cicloheximida	0,05 g

Esterilizar por filtração (0,45 µm). Adicionar a 1 litro da solução anterior a 45 °C.

Caldo Nutritivo

Triptona	10,0 g
Extrato de carne	5,0 g
NaCl	5,0 g
Água destilada	1 L

Ajustar o pH a 7.2. Esterilizar a 121° C durante 15 minutos.

Ayers

NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄	0,2 g
Azul de bromotimol (solução 0,2%)	75 mL
Água destilada	1 L

Ajustar o pH a 7. Esterilizar a 120° C durante 15 minutos.

Tampão fosfato salino - PBS

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Água destilada	1 L

Anexo VII. Coloração de Gram

- Fazer um esfregaço e fixá-lo;
- Cobrir a preparação com a solução de cristal violeta e deixar atuar 1 minuto;
- Lavar a lâmina com água corrente;
- Cobrir com solução de lugol e deixar atuar 1 minuto;
- Lavar com a solução álcool-acetona \pm 30 segundos;
- Lavar com água corrente;
- Cobrir com a solução de safranina e deixar atuar 30 segundos;
- Lavar com água e secar com papel de filtro;
- Observar ao microscópio com óleo de imersão na objetiva de 100x

A cultura é Gram negativa se for evidenciada uma cor vermelha ou Gram positiva se manifestar uma cor violeta.

Anexo VIII. Teste da oxidase

- Colocar uma gota do reagente incolor tetrametil p-fenilenediamina dihidroclorato 1% recém preparado e protegido da luz, num papel de filtro;
- Espalhar 2 a 3 colónias da bactéria em estudo sobre a área do papel de filtro contendo o reagente, utilizando uma ansa não metálica.

A prova é considerada positiva quando na mistura do reagente com a massa bacteriana se desenvolve a cor azul-roxo escura em cerca de 10 segundos. Na reação negativa não há desenvolvimento de cor.

Anexo IX. Teste API 20E

A preparação da galeria e do inóculo, bem como a inoculação da galeria, deve ser realizado em condições de esterilidade

Preparação da galeria

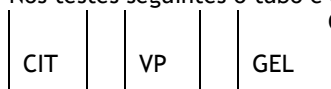
- Juntar fundo e tampa
- Distribuir 5 ml de água esterilizada na caixa de incubação
- Identificar a colónia na lingueta lateral
- Retirar a galeria da caixa de armazenamento
- Colocar a galeria na caixa de incubação

Preparação do inóculo

- Abrir uma ampola : API Suspension Medium (5 mL)
- Colocar 1µL de colónia, com crescimento de 48 horas, com ansa descartável
- Efetuar a suspensão bacteriana homogeneizando cuidadosamente as bactérias no meio utilizando o vórtice

Inoculação da galeria

- Introduzir a suspensão bacteriana nos tubos da galeria utilizando a mesma pipeta de Pasteur. Encostar a ponta no lado da cúpula para não fazer bolhas. Inclinar, ligeiramente, a caixa de incubação para a frente
- Nos testes seguintes o tubo e a cúpula devem ficar preenchidos



- Nos restantes testes encher apenas a os tubos
- Encher cúpula com óleo de parafina os seguintes testes:
ADH, LDC, ODC, H₂S, URE
- Fechar a caixa de incubação
- Incubar a 25-26 °C
- Ler após 24 e 48 horas

Leitura e interpretação

- Consultar o quadro de leitura fornecido pela empresa bioMérieux
- Anotar as reações positivas e negativas na ficha de resultados
- Adicionar uma gota do reagente TDA no teste TDA. A produção de uma cor castanho-avermelhada corresponde a uma reação positiva.
- No teste VP adicionar uma gota dos reagentes VP1 e VP2. Esperar 10 minutos. As cores rosa ou vermelho correspondem a reação positiva, uma fraca cor rosa corresponde uma reação negativa
- Adicionar, no teste IND, uma gota de reagente James. Uma coloração rosa difundida por toda a cúpula é indicadora de reação positiva.

Anexo X. Teste API 50CH

A preparação da galeria e do inóculo, bem como a inoculação da galeria, deve ser realizado em condições de esterilidade

Preparação da galeria

- Juntar fundo e tampa
- Distribuir 5 ml de água destilada na caixa de incubação
- Identificar a colónia na lingueta lateral
- Retirar a galeria da caixa de armazenamento
- Colocar a galeria na caixa de incubação

Preparação do inóculo

- Colocar 1 ml de água destilada esterilizada num tubo esterilizado
- Preparar uma suspensão com turvação 4 da Escala de McFarland (cerca de 2 a 2,5 µl de colónia)
- Homogeneizar no vórtice
- Verter, com pipeta de Pasteur, esta suspensão para uma ampola de API 50CH CHB/E Medium
- Homogeneizar a suspensão no vórtice

Inoculação da galeria

- Introduzir a suspensão bacteriana nos tubos da galeria utilizando a mesma pipeta de Pasteur.
- Encostar a ponta no lado da cúpula para não fazer bolhas. Inclinar, ligeiramente, a caixa de incubação para a frente
- Encher apenas os tubos com a suspensão bacteriana
- Encher as cúpulas com parafina líquida esterilizada
- Fechar a caixa de incubação
- Incubar a galeria 25 °C
- Ler às 24, 48 e 72 horas

Leitura e interpretação

- As reações são consideradas positivas quando existe alteração da cor vermelha para amarelo

Anexo XI. Preparação dos *primers*

Os primers são comercializados liofilizados. A solução mãe preparada é de 100 μM .

Seguidamente procede-se à constituição da solução de trabalho de 10 μM .

A concentração de cada primer, em cada reação, deverá ser de 25 pmol. Assim, em cada reação deverá ser adicionado 2,5 μL de cada primer.

Os primers depois de reconstituídos devem ser conservados a -20°C . (Bereswill *et al.*, 1992)

Anexo XII. Preparação da solução tampão TAE 0,5x e do gel de agarose

Preparação da solução tampão TAE 0,5x

A solução de trabalho de TAE a 0,5x é preparada em água destilada, adicionando a esta, o volume de TAE da solução concentrada, previamente calculado pela equação das diluições:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Assim, para preparar 1 litro de solução de trabalho de TAE 0,5x, colocar 10 mL de solução concentrada (50x) num balão volumétrico de 1000 mL e perfazer o volume com água destilada.

Preparação do gel de agarose

O gel é preparado em função da espessura, da percentagem de agarose que se pretende usar e do tipo de Tina.

Para a tina Bio-Rad (*Wide Mini-Sub Cell GT*) pode tomar-se como referência os volumes de tampão necessários para se obter uma determinada espessura, como pode ser observado no quadro seguinte:

Espessura do gel (mm)	Volume de tampão (mL)	Volume da tina (mL)	Dimensões do gel (mm)
2,5	30	650-900	150 x 100
5,0	60		
7,5	90		
10	120		

Para obter um gel a 1,5% e com espessura de 5 mm:

Pesar 0,9 g de agarose e adicionar a 60 mL de tampão TAE 0,5x

Modo de preparação:

- Adicionar 0,9 g de agarose a 60 mL de tampão TAE 0,5x, num frasco apropriado;
- Pesar o conjunto;
- Fundir lentamente em micro-ondas até dissolver completamente a agarose ou seja até ficar transparente, tendo o cuidado de não deixar ferver, para evitar perdas;
- Retificar o peso com adição de água destilada, se necessário;
- Deixar arrefecer à temperatura ambiente;
- Logo que seja atingida a temperatura de 50-60°C, verter no tabuleiro de preparação do gel, onde previamente foi colocado o pente, para formar os poços;
- Deixar solidificar durante 30 a 45 minutos
- Retirar o pente;
- Colocar o tabuleiro com o gel na tina de eletroforese;
- Verter solução tampão de TAE 0,5x, na tina de eletroforese, até submergir o gel de agarose, para que este não desidrate;

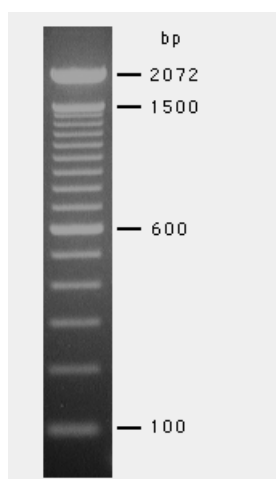
Anexo XIII. Preparação do marcador

Caraterísticas:

- marcador de DNA 100 bp da marca Invitrogen
- Ref.^a: 15628-019 (quantidade/embalagem: 50 µg)
- Concentração: 1 µg/µL (solução stock)

Consiste em 15 fragmentos entre 100 e 1500 bp em múltiplos de 100 bp e um fragmento adicional em 2072 bp.

A banda de 600 bp é aproximadamente 2 a 3 vezes mais brilhante do que as outras bandas do marcador para fornecer orientação interna. Este marcador é adequado para medir tamanhos de fragmentos de DNA entre os 100 e 1500 bp.



Marcador de DNA de 100 bp
0.5 µg/poço
2% gel de agarose com brometo de etídio

A solução *stock* do marcador apresenta uma concentração de 1000 ng/µL.

A solução de trabalho deve apresentar uma concentração de 50 ng/µL.

Para a sua preparação recorre-se à equação das diluições: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$

Assim, para preparar uma solução de trabalho de 100 µL de marcador com uma concentração de 50 ng/µL, deve pipetar-se 5 µL (com concentração inicial de 1 µg/µL).

Uma vez que o marcador vai ser depositado no gel de agarose, tem que ter peso para que não saia dos poços, por este facto é necessário adicionar gel *loading* na preparação do marcador. O gel *loading* é uma solução constituída à base de açúcar, para conferir peso, e um indicador, azul de bromofenol, que serve para visualizar a corrida de eletroforese.

Recomenda-se a proporção de 1/5, pelo que se deve adicionar 20 µL de gel *loading* na preparação de um volume de 100 µL.

Assim, 100 μL de solução de trabalho do marcador é obtida através da adição dos seguintes componentes:

5 μL de marcador (solução stock)

20 μL de gel *loading*

75 μL de água destilada ultra pura

} Adiciona-se a mistura por pipetagem,
num microtubo de 1,5 mL

100 μL de marcador com uma concentração de 50 ng/ μL

Anexo XIV. Preparação do brometo de etídio

Caraterísticas:

- Reagente tóxico por contacto (mutagénico)
- Ref^ª: 17-1328-01 - marca: Plusone (quantidade/frasco: 10 mL)
- Concentração: 10 mg.mL⁻¹ (solução stock)

A solução de brometo de etídio é usada com uma concentração de 0,5 µg.mL⁻¹ (solução de trabalho).

Recorrendo à equação das diluições e para preparar um volume de 200 mL de solução de brometo de etídio, adicionar 10 µL da solução *stock* de brometo de etídio a 200 mL de água destilada.

Instruções de utilização:

- 1- Usar sempre luvas e bata
- 2- Colocar a solução de brometo de etídio, preparada no passo anterior, numa tina e mergulhar o gel durante 20 minutos (se a solução já tiver sido usada algumas vezes, prolongar o tempo de permanência do gel)
- 3- Após o tempo de coloração, o gel deverá ser tirado com muito cuidado para outra tina contendo água destilada, para diluir ligeiramente o brometo de etídio e de seguida colocado no transiluminador.
- 4- Antes de ligar o transiluminador devem ser colocados óculos de proteção UV, depois de ligado e selecionado o melhor tempo de exposição, a imagem do gel é captada com câmara digital devidamente adaptada.

Anexo XV. Conservação das peras

- Mergulhar as peras rapidamente em álcool a 70%
- Lavar duas vezes com água destilada e esterilizada
- Deixar secar
- Envolver cada fruto com papel absorvente e colocar em envelope de papel
- Acondicionar individualmente em sacos limpos
- Armazenar no frio entre 2-5° C

Anexo XVI. Teste patogenicidade em peras e nêspas

- Usar frutos imaturos de 5 a 8 cm de comprimento ou 3 a 3,5 cm de diâmetro
- Passar os frutos com algodão embebido em álcool e lava-los com água destilada esterilizada
- Cortar os frutos em fatias com 1 cm de espessura ou usar frutos inteiros
- Colocar as rodela ou os frutos inteiros em placas de Petri esterilizadas e revestidas com papel de filtro esterilizado e humedecido
- Preparar uma suspensão bacteriana turva fraca em PBS ($\pm 10^9$ cfu.mL⁻¹) para, rapidamente, inocular os frutos
- Fazer um corte com bisturi desinfetado e pipetar para dentro da ferida 10µl da suspensão bacteriana
- Usar um controlo positivo (estirpe CFBP 1430) e um controlo negativo, este último é o solvente usado para preparar as suspensões bacterianas
- Incubar a 25° C em placa de Petri fechada
- Observação entre o 3.º e o 15.º dias após inoculação

Anexo XVII. Resultados do PCR e concentrações amplificadas

Referência	Concent. amplificadas	PCR Bereswill	Referência	Concent. amplificadas	PCR Bereswill	Referência	Concent. amplificadas	PCR Bereswill
EA 0010	$4,3 \times 10^6$	-	EA 0160	$2,8 \times 10^6$	+	EA 0310	$3,5 \times 10^5$	+
	$4,3 \times 10^5$			$2,8 \times 10^5$			$3,5 \times 10^4$	
EA 0020	$4,1 \times 10^6$	-	EA 0170	$2,0 \times 10^6$	-	EA 0320	$6,8 \times 10^5$	+
	$4,1 \times 10^5$			$2,0 \times 10^5$			$6,8 \times 10^4$	
EA 0030	$2,0 \times 10^6$	+	EA 0180	$1,0 \times 10^6$	-	EA 0330	$1,2 \times 10^6$	+
	$2,0 \times 10^5$			$1,0 \times 10^5$			$1,2 \times 10^5$	
EA 0040	$9,6 \times 10^6$	-	EA 0190	$6,1 \times 10^6$	+	EA 0340	$3,5 \times 10^5$	+
	$9,6 \times 10^5$			$6,1 \times 10^5$			$3,5 \times 10^4$	
EA 0050	$3,5 \times 10^6$	-	EA 0200	$5,5 \times 10^6$	+	EA 0350	$5,7 \times 10^5$	+
	$3,5 \times 10^5$			$5,5 \times 10^5$			$5,7 \times 10^4$	
EA 0060	7×10^6	-	EA 0210	$9,0 \times 10^6$	-	EA 0360	$4,1 \times 10^5$	+
	7×10^5			$9,0 \times 10^5$			$4,1 \times 10^4$	
EA 0070	$3,3 \times 10^6$	-	EA 0220	$1,1 \times 10^7$	+	EA 0370	$1,4 \times 10^5$	+
	$3,3 \times 10^5$			$1,1 \times 10^6$			$1,4 \times 10^4$	
EA 0080	$1,9 \times 10^6$	-	EA 0230	$2,6 \times 10^6$	+	EA 0380	$3,8 \times 10^5$	+
	$1,9 \times 10^5$			$2,6 \times 10^5$			$3,8 \times 10^4$	
EA 0090	$2,1 \times 10^6$	-	EA 0240	$4,6 \times 10^6$	+	EA 0390	$7,6 \times 10^5$	+
	$2,1 \times 10^5$			$4,6 \times 10^5$			$7,6 \times 10^4$	
EA 0100	$2,0 \times 10^6$	-	EA 0250	$4,9 \times 10^6$	+	EA 0400	$1,4 \times 10^6$	+
	$2,0 \times 10^5$			$4,9 \times 10^5$			$1,4 \times 10^5$	
EA 0110	$3,2 \times 10^4$	-	EA 0260	$2,2 \times 10^6$	+	EA 0410	$5,5 \times 10^5$	+
	$3,2 \times 10^3$			$2,2 \times 10^5$			$5,5 \times 10^2$	
EA 0120	$2,1 \times 10^6$	+	EA 0270	$5,0 \times 10^6$	+	EA 0420	$4,2 \times 10^5$	+
	$2,1 \times 10^5$			$5,0 \times 10^5$			$4,2 \times 10^4$	
EA 0130	9×10^5	-	EA 0280	$4,2 \times 10^5$	+	EA 0430	$8,8 \times 10^5$	+
	9×10^4			$4,2 \times 10^4$			$8,8 \times 10^4$	
EA 0140	$1,3 \times 10^6$	-	EA 0290	$3,1 \times 10^5$	+	EA 0440	$6,2 \times 10^5$	+
	$1,3 \times 10^5$			$3,1 \times 10^4$			$6,2 \times 10^4$	
EA 0150	$2,1 \times 10^6$	-	EA 0300	$1,1 \times 10^6$	+			
	$2,1 \times 10^5$			$1,1 \times 10^3$				

Anexo XVIII. Resultado da inoculação de fatias de pera em dois estados de imaturidade

Referência	Concentração suspensão de inoculação	Orgão inoculado	Patogenicidade (dias após inoculação)	Referência	Concentração suspensão de inoculação	Orgão inoculado	Patogenicidade (dias após inoculação)
EA 0280	0,6x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)	EA 0370	0,9x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)
		fatia de pera (b)	+ (3.º)			fatia de pera (b)	+ (6.º)
EA 0290	0,7x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)	EA 0380	0,6x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)
		fatia de pera (b)	+ (4.º)			fatia de pera (b)	+ (3.º)
EA 0300	0,7x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)	EA 0390	0,7x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (6.º)
		fatia de pera (b)	+ (6.º)			fatia de pera (b)	+ (5.º)
EA 0310	0,7x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)	EA 0400	0,9x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)
		fatia de pera (b)	+ (6.º)			fatia de pera (b)	+ (5.º)
EA 0320	1,0x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)	EA 0410	1,0x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)
		fatia de pera (b)	+ (3.º)			fatia de pera (b)	+ (4.º)
EA 0330	0,7x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)	EA 0420	0,7x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (6.º)
		fatia de pera (b)	+ (3.º)			fatia de pera (b)	+ (7.º)
EA 0340	0,5x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (7.º)	EA 0430	0,7x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)
		fatia de pera (b)	+ (7.º)			fatia de pera (b)	+ (6.º)
EA 0350	0,8x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)	EA 0440	0,8x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)
		fatia de pera (b)	+ (7.º)			fatia de pera (b)	+ (6.º)
EA 0360	1,1x10 ⁹	fatia de pera (a)	+ (3.º)	(a) pera da cultivar William's rouge de ± 3 cm de diâmetro			
		fatia de pera (b)	+ (5.º)	(b) pera da cultivar William's de ± 8 cm de comprimento			

Anexo XIX. Resultado do teste API 50CH

Referência	L-arabinose	D-ribose	D-xilose	D-galactose	D-glucose	D-frutose	D-manose	D manitol	D-sorbitol	N-acetilglucosamina	D-melibiose	D-sacarose	D-trealose	β-gentriose
	LARA	RIB	DXYL	GAL	GLU	FRU	MNE	MAN	SOR	NAG	MEL	SAC	TRE	GEN
EA 0010	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
EA 0020	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	- fr
EA 0030	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EA 0040	+	+	+	+	+	+	+	+	- fr	- fr	+	+	- fr	+
EA 0050	+	+	+	+	+	+	+	+	- fr	- fr	+	+	+	- fr
EA 0060	não avaliado													
EA 0070	não avaliado													
EA 0080	+	+	+	+	+	+	+	+	- fr	+	+	- fr	+ fr	- fr
EA 0090	não avaliado													
EA 0100	+	+	+	+	+	+	+	+	- fr	+	+	+	+	- fr
EA 0110	+	+	+	+	+	+	+	+	-	- fr	+	+	+	+
EA 0120	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
EA 0130	+	+	+	+	+	- fr	+	+	- fr	+	+	+	- fr	- fr
EA 0140	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
EA 0150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EA 0160	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EA 0170	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
EA 0180	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EA 0190	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EA 0200	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	- fr
EA 0210	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EA 0220	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EA 0230	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0240	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0250	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0260	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0270	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0280	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0290	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0300	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0310	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0320	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0330	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0340	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0350	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0360	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0370	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0380	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0390	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
EA 0400	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0410	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0420	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0430	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EA 0440	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
CFBP 1430	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+

Anexo XX. Resultado do teste API 20E

Referência	nitrofenil galactopiranosida	L-arginina	L-lisina	L-ornitina	citrato de sódio	tiossulfato de sódio	ureia	L-triptofano	indol	piruvato de sódio	gelatina	D-glucose	D-manitol	inositol	D-sorbitol	L-ramnose	D-sacarose	D-melibiose	amigdalina	L-arabinose	oxidase	Código API 20E
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	
EA 0010	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	1005173
EA 0020	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	1205133
EA 0030	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	1205173
EA 0040	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	1205133
EA 0050	+	+ fr	+	+	+	-	+ fr	-	-	-	-	+	+	+ fr	-	+	+	-	+	+	-	7314333
EA 0060	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	- fr	-	+	+	+	+	+	-	1204173
EA 0070	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+ fr	-	+	+	-	+	+	-	1204333
EA 0080	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+ fr	-	+	+	+ fr	+	+	-	1204373
EA 0090	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+ fr	-	+	+	-	+	+	-	1204333
EA 0100	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	- fr	-	+	+	+	+	+	-	1204173
EA 0110	+	+ fr	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	- fr	-	+	+	+	+	+	-	3205173
EA 0120	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	1204173
EA 0130	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	1007363
EA 0140	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	2206062
EA 0150	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	1214573
EA 0160	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+ fr	+	+	+	- fr	+	+	-	1004733
EA 0170	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	- fr	+	+	-	1004133
EA 0180	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	1205573
EA 0190	+	+ fr	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3204573
EA 0200	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	- fr	- fr	+ fr	+	+ fr	+	- fr	-	0204171
EA 0210	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	1204573
EA 0220	+	- fr	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	1204573
EA 0230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0005522
EA 0240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0005522
EA 0250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0005522
EA 0260	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0005522
EA 0270	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0005522
EA 0280	+	+ fr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+ fr	-	+ fr	-	+	-	-	+	-	3004522
EA 0290	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0007522
EA 0300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0007522
EA 0310	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0007522
EA 0320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0004522
EA 0330	+	+ fr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+ fr	-	+	-	+	-	-	+	-	3004522
EA 0340	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+ fr	-	+ fr	-	+	-	-	+	-	1004522
EA 0350	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+ fr	-	+ fr	-	+	-	-	+	-	1004522
EA 0360	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0004522
EA 0370	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0005522
EA 0380	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+ fr	-	+ fr	-	+	-	-	+	-	1004522
EA 0390	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0007522
EA 0400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0007522
EA 0410	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0005522
EA 0420	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0004522
EA 0430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0005522
EA 0440	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+ fr	-	+ fr	-	+	-	-	+	-	1004522
CFBP 1430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	0005522

