



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Variabilidade genética e fenotípica de
Pseudomonas syringae pv. *actinidiae*,
agente causal do Cancro da Actinídea,
na Região de Entre Douro e Minho

Eva Garcia

Escola Superior Agrária



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Eva Margarida Fernandes Garcia

VARIABILIDADE GENÉTICA E FENOTÍPICA DE
PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. *ACTINIDIAE*,
AGENTE CAUSAL DO CANCRO DA ACTINÍDEA,
NA REGIÃO DE ENTRE DOURO E MINHO

Nome do Curso de Mestrado
Agricultura Biológica

Trabalho efectuado sob a orientação de
Professora Doutora Maria Luísa Roldão Marques Moura

E co-orientação de
Doutor Pedro Mansilla Vásquez

Fevereiro de 2015

Agradecimentos

Estando mais uma importante etapa a terminar, é imprescindível deixar o meu agradecimento a todas as pessoas e instituições que contribuíram, de alguma forma, para a concretização deste trabalho.

Em primeiro lugar, quero expressar um enorme agradecimento à Professora Doutora Maria Luísa Moura da Escola Superior Agrária/IPVC, pela sugestão do tema, orientação do trabalho de investigação realizado na ESA, pela disponibilidade e apoio em todas as situações, por todas as oportunidades de que me proporcionou, por tudo o que me ensinou e, espero, continuará a ensinar.

Ao Doutor Pedro Mansilla Vázquez da Estación Fitopatolóxica do Areeiro, um grande agradecimento pela oportunidade de aprendizagem e de trabalho. À Doutora Olga Aguin e à Doutora Adela Abelleira, agradeço também a ajuda e acompanhamento durante o trabalho de laboratório. Às companheiras de laboratório Paula Figueira, Vanesa Martínez e, em especial, Aitana Ares, o meu profundo agradecimento por tudo o que me ensinaram, o tempo que me disponibilizaram e pelo esforço por compreender o meu “português/galego”. Sem vocês teria sido muito mais difícil fazer este trabalho.

Agradeço a todas as entidades que facultaram contactos de produtores e material vegetal para a realização deste trabalho, tais como “Frutas Douro ao Minho”, “Kiwi Greensun”, “Cooperativa Terras de Felgueiras”, “Kiwi 1000”, “Solintenso”, “Delícias do Tojal”, Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte. À Diputación de Pontevedra, agradeço a oportunidade da realização do trabalho de investigação na Estación Fitopatolóxica do Areeiro (EFA). Ao Doutor J. Vanneste agradeço a cedência das estirpes de referência K-Psa, 10627 e 10880, utilizadas nos trabalhos realizados na EFA.

O meu agradecimento também à Cátia Martins que me ensinou diversas técnicas e me ajudou na integração no laboratório da ESA-IPVC. Ao Eng. Virgílio Peixoto, D. Maria Carvalhosa, D. Maria Rocha e D. Suzy Marinho, muito obrigada por todo o apoio e disponibilidade.

Aos meus pais Ana Garcia e Mário Garcia, e irmãos Tiago Garcia e Rita Garcia. Porque me fizeram a pessoa que sou hoje, me apoiaram incondicionalmente em todas as situações, foram ajudando a amortecer as pequenas quedas e impulsionando para mais uns passos em frente. Porque todas as minhas conquistas são também vossas.

Ao meu namorado, Miguel Carvalho, por todo o apoio, todas as viagens, toda a paciência, por todas as vezes em que me ouviu falar de trabalho (mesmo sem entender o que estava a dizer) e por todas as vezes em que me salvou os dias através dos seus dotes informáticos.

A todos os companheiros do Mestrado, agradeço por terem enriquecido esta etapa com a vossa amizade, experiências e conhecimentos. Em particular aos companheiros de viagem e de residência Teresa Saraiva, Pedro Teixeira e Jorge Baptista por me terem dado muitas vezes alojamento e momentos muito bem passados, tendo feito do Norte a minha segunda casa durante estes dois anos.

A todos os meus amigos, principalmente à Ana Maria Botelho, Ana Teresa Botelho, Joana Costa, Mariana Lucas, Vanessa Carregosa, Ana João Ramos, Diana Canas, Joni Marques, Luís Lopes, João Simões, Tiago Pedrosa e Mário Pó, por todo o apoio, pelos momentos de descontração e por estarem sempre à distância de um telefonema ou mensagem.

RESUMO

A bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), agente causal do cancro bacteriano da actinídea, é responsável pela doença considerada mais grave desta cultura na atualidade, provocando importantes prejuízos nos principais países produtores de kiwi, incluindo Portugal. Esta doença, descrita pela primeira vez no Japão em 1984, foi detetada em Portugal em 2010, manifestando elevada agressividade e uma dispersão muito rápida, tendo, nos dias de hoje, distribuição generalizada nas principais regiões produtoras de kiwi.

Este trabalho, realizado em 2013 e 2014, teve por objetivo isolar, identificar e caracterizar isolados de Psa na Região do Entre Douro e Minho (EDM), e conhecer a prevalência das populações de Psa (Psa1, Psa2, Psa3, Psa4) nesta região. A partir de material vegetal com sintomas da doença proveniente de diferentes pomares de *Actinidia deliciosa*, isolou-se o agente patogénico e realizou-se a sua identificação, caracterização morfológica, fenotípica, molecular e de patogenicidade.

A análise fenotípica de 94 características de uma coleção de isolados portugueses mostrou que a maioria deles se posicionou em dois fena. A maior parte dos isolados ficou incluído no fenon 1 juntamente com a estirpe italiana CFBP 7286 (Psa3). A comparação destes resultados com a identificação molecular obtida por PCR (com os *primers* Psa-F1/PsaR2, de Rees-George e colaboradores (2010)) permitiu identificar as 23 estirpes portuguesas como *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

Os resultados da análise da estrutura genética da população portuguesa de Psa caracterizada, com a utilização da técnica de multiplex-PCR utilizando os *primers* PsaF/PsaR, EuropeF/EuropR, ChinaF/ChinaR e JapanF/JapanR, amplificou os dois fragmentos de ADN esperados de 311 e 733 pb simultaneamente, em 22 estirpes isoladas na região EDM e na estirpe italiana CFBP 7286. Estes resultados indicam que as estirpes portuguesas pertencem à população Psa3, população mais virulenta de Psa, atualmente responsável pelo surto da doença na Europa e na Nova Zelândia. Apenas para uma estirpe (B65), a caracterização molecular não foi

conclusiva, indicando os resultados que se poderá tratar de uma estirpe da população Psa4 (*P. s. pv. actinidifoliorum* pv. nov.). A análise do polimorfismo obtido por RFLP e BOX-PCR permitiu confirmar que, com exceção da estirpe B65, as estirpes portuguesas são idênticas à população Psa3, pois apresentaram o mesmo perfil genético das estirpes Psa3 italiana e da Nova Zelândia incluídas neste estudo. Contudo registou-se a existência de variabilidade genética no interior das estirpes da população portuguesa. Estes resultados foram igualmente confirmados pela análise dos alinhamentos das sequências dos genes *ompP1* e *cts* das estirpes portuguesas estudadas, que permitiu observar que existe similaridade entre estas e as estirpes de Psa da população Psa3, cujas sequências foram obtidas no GenBank (JX297572) e no artigo publicado por Vanneste e colaboradores (2010), respetivamente.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram ainda isolar bacteriófagos naturalmente presentes em pomares de actínídea do EDM, com a capacidade de provocar lise celular de estirpes de Psa. Estes resultados promissores, são importantes do ponto de vista do controlo da doença, sendo necessário a realização de novos estudos.

Palavras-chave: biovar; cancro bacteriano da actínídea; kiwi; populações de Psa; Portugal; Psa3.

ABSTRACT

The bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, is currently the cause of the most severe disease affecting this crop, causing significant losses in the main kiwi producing countries, including Portugal. This disease was described by the first time in Japan in 1984 and it was detected in Portugal in 2010, showing high aggressiveness and very fast spreading, and at the moment it is present in all the main areas of kiwifruit production.

This study, accomplished between 2013 and 2014, aims to isolate, identify and characterize strains of Psa in the Entre Douro e Minho (EDM) region, and to determine the prevalence of populations of Psa (PSA1, PSA2 Psa3 and PSA4) in this region.

The pathogen was isolated from plant material with symptoms of the disease from different *Actinidia deliciosa* orchards and then was realized its identification and morphological, phenotypical, molecular and pathogenicity characterization.

The Phenotypic analysis of 94 characteristics of Portuguese isolates collection showed that the majority of them are positioned in two fena. The majority of the isolates were included in fenon 1 with the Italian strain CFBP 7286 (Psa3). The comparison of these results with the molecular identification obtained by PCR (with the primers Psa-F1/PsaR2, Rees-George et al. (2010)) allowed the identification of 23 Portuguese strains as *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. The results of the analysis of the genetic structure of the Portuguese Psa population, obtained trough the multiplex-PCR technique using the primers PsaF/PsaR, EuropeF/EuropR,

ChinaF/ChinaR and JapanF/JapanR amplified the two expected DNA fragments with 311 and 733 bp (bar pares) into 22 strains isolated in EDM region and into the Italian strain CFBP 7286 (Psa3). These results indicate that the Portuguese strains belong to the Psa3 population, the most virulent Psa population, currently responsible for the European and New Zealand Psa outbreak. The molecular characterization was not conclusive in just one strain (B65), with the results showing the possibility that this strain belongs to the Psa4 population (*P. s. pv. actinidifoliorum* pv. nov.). The polymorphism analysis obtained by RFLP and BOX-PCR allowed to confirm that the Portuguese strains (except the strain B65) are identical to the Psa3 popultaion, because they exhibited the same genetic profile as the Italian and New Zealand Psa3 strains included in this study. However, it was observed that there is genetic variability between Portuguese population strains. These results were also confirmed by the analyses of the *ompP1* and *cts* gene sequences of the EDM strains studied, which allowed the observation of similarity between this Portuguese strains and the Psa strains of the Psa3 population, whose sequences were obtained respectively from the GenBank (JX297572) and the article published by Vanneste and Colaborators (2010).

The results of this work allowed the isolation of bacteriophages naturally present in EDM *Actinidia* orchads, with the ability to cause cell lysis of Psa strains. These promising results are important for disease control, being necessary to conduct further studies.

Keywords: biovar; kiwi; kiwifruit bacterial canker; Portugal; Psa populations; Psa3

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	V
Lista de Figuras	XI
Lista de Quadros	XIV
Lista de Anexos	XV
Lista de Abreviaturas	XVI
1. Introdução	1
1.1. A cultura da actinídea	1
1.2. Importância económica da actinídea.....	2
1.3. Principais doenças que afetam a actinídea.....	3
1.4. O cancro bacteriano da actinídea	4
1.4.1. História e distribuição geográfica da doença	4
1.4.2. Sintomatologia e evolução da doença	7
1.4.3. Transmissão e disseminação da doença.....	11
1.4.4. Meios de proteção	13
1.4.4.1. Meios de proteção culturais	14
1.4.4.2. Meios de proteção biológica.....	16
1.4.4.2.1. Bacteriófagos.....	16
1.4.4.3. Meios de proteção química	16
1.4.4.3.1. Cobre	17
1.4.4.3.2. Estreptomicina	18
1.4.4.3.3. Terpenos.....	18
1.4.4.3.4. Quitosana	19

1.4.4.3.5.	Péptidos antimicrobianos.....	19
1.4.4.3.6.	Indutores de defesa das plantas.....	20
1.5.	A bactéria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	21
1.5.1.	Taxonomia.....	21
1.5.1.1.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidifoliorum</i> pv. nov. (anterior população Ps4).....	23
1.5.2.	Caracterização morfológica, cultural e bioquímica	24
1.5.3.	Caraterização dos ácidos gordos	26
1.5.4.	Caracterização molecular	27
1.5.4.1.	Reação em cadeia da polimerase.....	27
1.5.4.2.	Identificação molecular de <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	28
1.5.4.3.	Amplificação múltipla definida (rep-PCR).....	31
1.5.5.	Sequenciação de ADN	32
1.6.	Objetivos.....	33
2.	Material e Métodos.....	35
2.1.	Obtenção da uma coleção de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	35
2.1.1.	Extração e isolamento de bactérias.....	37
2.1.2.	Preservação de culturas bacterianas.....	38
2.2.	Caracterização morfológica e cultural	38
2.3.	Caracterização bioquímica dos isolados.....	39
2.4.	Caracterização dos ácidos gordos.....	40
2.5.	Identificação e caracterização molecular	42
2.5.1.	Extração de ADN.....	42
2.5.2.	Amplificação por PCR.....	42
2.5.2.1.	Identificação molecular de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	

2.5.2.1.1.	Amplificação por PCR utilizando os <i>primers</i> PsaF1/PsaR2 .	42
2.5.2.1.2.	Amplificação por <i>Duplex</i> -PCR utilizando os primers KN-F/ KN-R e AvrDdpx-F/ AvrDdpx-R.....	43
2.5.2.2.	Caracterização molecular de isolados de Psa	44
2.5.3.	Eletroforese de fragmentos de ADN	48
2.6.	Análise da diversidade genética	49
2.6.1.	Análise de sequências repetitivas de ADN por BOX-PCR.....	49
2.6.2.	Análise do polimorfismo por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism)	50
2.6.3.	Sequenciação de ADN amplificado e análise filogenética	50
2.6.4.	Análise das sequências, alinhamento e árvore filogenética	52
2.7.	Caracterização da patogenicidade.....	54
2.8.	Extração de bacteriófagos a partir de material vegetal infetado	55
3.	Resultados	57
3.1.	Caracterização morfológica e cultural	57
3.2.	Caracterização bioquímica e fisiológica dos isolados	57
3.3.	Caracterização dos ácidos gordos.....	59
3.4.	Identificação e caracterização molecular	61
3.4.1.	Identificação por PCR utilizando os <i>primers</i> PsaF1-PsaR2.....	61
3.4.2.	Identificação por <i>Dúplex</i> -PCR utilizando os <i>primers</i> KN-F/KN-R.....	62
3.4.3.	Caracterização molecular de Psa com os <i>primers</i> avrD1-F/avrD1-R, B1/B2, cts-Fp/cts-Rp, PsITSF1/PsITSR2.....	62
	Análise da diversidade genética	67
3.4.4.	Análise de sequências repetitivas de ADN por BOX-PCR.....	67

3.4.5. Análise do polimorfismo por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism)	70
3.5. Sequenciação de ADN amplificado e análise filogenética	71
3.6. Caracterização da patogenicidade.....	77
3.7. Extração de bacteriófagos a partir de material vegetal infetado	78
4. Discussão e Conclusão.....	79
5. Bibliografia	85

Lista de Figuras

Figura 1. Valores de exportação portuguesa de kiwi, em euros. (INE, 2006 a 2013)	3
Figura 2. Distribuição do cancro bacteriano da actínídea no mundo (EPPO, 2012)	4
Figura 3. Distribuição mundial de Psa.....	5
Figura 4. Sintomas característicos de Psa em actínídea.....	9
Figura 5. Ciclo de vida da Psa sugerido por Vanneste e seus colaboradores.	10
Figura 6. Folha com sintomas de Psa e colónias de Psa após 72 horas de incubação a 28°C em meio B de King modificado.....	38
Figura 7. Esquema representativos etapas seguidas na preparação das amostras para a análise de ácidos gordos por cromatografia de fase gasosa..	41
Figura 8. Características morfológicas de colónias de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	57
Figura 9. Dendrograma das distâncias fenotípicas entre 25 estirpes testadas para 56 características fenotípicas.....	59
Figura 10. Fragmentos de amplificação obtidos com os primers PsaF1/R2 numa reação de PCR, obtidos com as estirpes de <i>P.s.</i> pv. <i>actinidiae</i>	61
Figura 11. Fragmentos de amplificação obtidos com os primers KN-F/R e AvrDpx-F/R numa reação de Dúplex-PCR, obtidos com as estirpes de Psa	62
Figura 12. Fragmentos de amplificação obtidos com os primers ArgK-F3 / ArgK-R, obtidos com as estirpes de Psa.....	64
Figura 13. Fragmentos de amplificação obtidos com os primers avrD1-F / avrD1-R, obtidos com as estirpes de Psa.....	64
Figura 14. Fragmentos de amplificação obtidos com os primers B1/B2, obtidos com as estirpes de Psa.....	65

Figura 15. Fragmentos de amplificação obtidos com os primers cts-Fp / cts-Rp, obtidos com as estirpes de Psa.....	65
Figura 16. Fragmentos de amplificação obtidos com os primers PsaF3/R4 numa reação de PCR, obtidos com as estirpes de <i>P.s. pv. actinidiae</i>	65
Figura 17. Fragmentos de amplificação obtidos com os primers desenhados por Balestra et al., 2013, obtidos com as estirpes de <i>P. s. pv. actinidiae</i>	66
Figura 18. Fragmentos de amplificação obtidos com os <i>primers</i> PsITS-F1/R2, obtidos com as estirpes de <i>P. s. pv. actinidiae</i>	66
Figura 19. Perfis electroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de <i>P. s. pv. actinidiae</i> (Psa), através de PCR utilizando o <i>primer</i> BOX.	69
Figura 20. Perfis electroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de <i>P. s. pv. actinidiae</i> (Psa), através de PCR utilizando o <i>primer</i> BOX.	69
Figura 21. Análise por RFLP do amplicon B1/B2 (631 pb) com a enzima <i>AluI</i> de estirpes de <i>P. s. pv. actinidiae</i>	70
Figura 22. Comparação de sequências de ADN do gene <i>cts</i> de isolados de <i>P. syringae pv. actinidiae</i>	72
Figura 23. Comparação de sequências de ADN do gene <i>ompPI</i> de isolados de <i>P. syringae pv. actinidiae</i>	73
Figura 24. Árvore filogenética obtida com a sequenciação do gene <i>cts</i> das estirpes de <i>Pseudomonas</i> estudadas	74
Figura 25. Árvore NJ (Neighbour-joining) de estirpes de <i>Pseudomonas</i> a partir das sequências de ADN do gene <i>ompPI</i>	75
Figura 26. Resultados dos testes de patogenicidade após 15 dias de inoculação.	77

Figura 27. Formação de placas fágicas. 78

Lista de Quadros

Quadro 1. Classificações das populações de Psa, distribuição geográfica e virulência.....	24
Quadro 2 - Origem dos isolados portugueses obtidos a partir de material vegetal com sintomas do cancro da actíntida.	35
Quadro 3. Origem das estirpes de Psa isoladas noutros países produtores de kiwi.	36
Quadro 4. Sequência dos primers utilizados, região amplificada e tamanho dos fragmentos amplificados.	44
Quadro 5. Condições químicas das reações de amplificação num volume total de 25 µl.....	45
Quadro 6. Condições físicas das reações de amplificação	46
Quadro 7. Condições de reação para purificação e sequenciação de ADN.....	50
Quadro 8. Preparação das reações de purificação e sequenciação	50
Quadro 9. Estirpes bacterianas utilizadas na análise filogenética, origem geográfica, hospedeiro, ano de isolamento e número de acesso GenBank.....	52
Quadro 10. Resultados das amplificações obtidas por PCR utilizando os primers ArgK-F3, ArgK-R; avrD1-F, avrD1-R; B1, B2; Cts-Fp, Cts-Rp; PsaF3, PsaR4; PsITS-F1, PsITS-R2	61
Quadro 11. Estirpes estudadas com o primer BOXA1R.....	64
Quadro 12. Número do grupo e número de estirpes de cada grupo obtidos pela análise da árvore filogenética obtida a partir do gene cts.....	73
Quadro 13. Número do grupo e número de estirpes de cada grupo obtidos pela análise da árvore filogenética obtida a partir do gene ompP1	73

Lista de Anexos

ANEXO I – Meios de cultura e reagentes utilizados	i
ANEXO II – Sistema Biolog	viii

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATCC	“American Type Culture Collection”
BOX	Elemento BOX
bp	Pares de bases
CFBP	Coleção Francesa de Bactérias Fitopatogénicas
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados (“deoxynucleotide triphosphates”)
EDM	Região Entre Douro e Minho
ERIC	“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”
GYCA	Meio de preservação de culturas bacterianas
ICMP	“International Collection of Microorganisms from Plants”
KACC	“Korean Agricultural Culture Collection”
kb	Kilobases
mM	Milimolar
NCPPB	“National Collection of Plant Pathogenic Bacteria”
nm	nanómetro
PCR	Reação em cadeia de polimerase (“polymerase chain reaction”)
Psa	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>
REP	“Repetitive Extragenic Palindromic”
rep	“Repetitive Extragenic Palindromic”
rep-PCR	Repetitive extragenic palindromic sequences”
RFLP	Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (“Restriction Fragment Length Polymorfism”)
rpm	Rotações por minuto
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Borato de tris-EDTA (“Tris-borate-EDTA”)
TSA	Meio de cultura “Tryptophan Soy Agar”
TSB	Meio de cultura “Trypticase-soy-broth”
ufc	Unidades formadoras de colónias
UPGMA	“Unweigted Pair-Group Method using arithmetic Averages”
w/v	Peso/volume
µl	Microlitro

1. Introdução

1.1. A cultura da actinídea

A actinídea pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Ericales, família Actinidiaceae e género *Actinidia* (NCBI, 2014). O género *Actinidia* compreende mais de setenta espécies e variedades (Garcia *et al.*, 2012), das quais a *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) e *Actinidia chinensis* (Planch.) são as que têm maior interesse comercial, havendo no entanto outras como a *Actinidia arguta* (Siebold & Zucc.) que têm vindo a ser cada vez mais exploradas.

Segundo Ferguson (2013) a primeira descrição feita e conhecida da actinídea, na altura conhecida como “Mihoutao” na China, ocorreu no século XII pelo autor Song Dynasty. Este descreveu-a como sendo uma planta com folhas redondas e pilosas, que crescia subindo pelas árvores em vales de montanhas. Relativamente à forma e tamanho do fruto, referiu que fazia lembrar um ovo, com pele castanha e que depois das primeiras geadas se tornava doce e comestível. Os relatos mais antigos conhecidos referentes à actinídea no resto do mundo remontam ao século XVIII e foram feitos por botânicos europeus que viajaram pela China e trouxeram as primeiras amostras da planta para a Europa. Na época, o fruto não tinha interesse comercial, mas sim para os colecionadores e como decoração. A descrição feita dos frutos referia que tinham o tamanho de uma noz e o sabor de groselha madura (Ferguson, 2013).

A maior parte das espécies e variedades do género *Actinidia* encontram-se entre os 25º e os 30º norte na China (Burdon e Lallu, 2011). Desde que se iniciou a difusão desta planta pelo mundo, diversas cultivares têm surgido, como “Abbott”, “Allison”, “Bruno”, “Hayward”, “Monty”, entre outras. A cultivar dominante é a “Hayward”, pertencente à espécie *A. deliciosa*, devido às características organolépticas e conservação pós-colheita do fruto. Outra cultivar que também tem vindo a crescer comercialmente é a “Hort16A”, obtida na Nova Zelândia pelo HortResearch, tendo resultado de cruzamentos feitos em 1987. Esta cultivar da espécie *A. chinensis* produz um fruto visualmente distinto e com sabor mais

complexo e “tropical” do que a “Hayward” (Burdon e Lallu, 2011), tendo contribuído para o aumento do número de consumidores de kiwi (Ferguson, 2013).

Atualmente, a espécie *A. deliciosa* encontra-se distribuída entre os 25º e os 45º em ambos os hemisférios. Os ambientes relativamente húmidos e abrigados, frios no inverno (atingindo até -10°C) e quentes no verão (sem exceder os 40°C), que tenham um período sem geadas suficientemente longo para permitir a maturação do fruto, são os ideais para o desenvolvimento da planta (Ferguson, 2013).

O fruto é maioritariamente consumido fresco, mas também tem sido utilizado em diversos produtos processados, como compotas, sumos, *topping*, doces, entre outros. Também lhe são atribuídas algumas características medicinais, como ajudando em funções digestivas, redutor de irritabilidade, atenuador do reumatismo, agindo na prevenção de formação de pedras nos rins, entre outras (Ferguson, 2013).

1.2. Importância económica da actinídea

A produção de kiwi é uma importante atividade económica em vários países, tendo sido a China em 2013 o maior produtor mundial com a produção de 1 765 847 toneladas (FAOSTAT, 2015). No mundo, a produção de kiwi tem vindo a aumentar de uma forma geral nos últimos anos, tanto ao nível de toneladas produzidas como em área utilizada. Entre 1992 e 2013, segundo estatísticas disponibilizadas pela FAOSTAT, a área utilizada aumentou de 64 903 para 243 879 hectares e a produção de 986 621 para 3 261 474 toneladas.

Em Portugal, foi a partir da década de 1990 que a produção de kiwi começou a ter maior interesse, graças ao valor interessante que a fruta tinha no mercado, ao baixo custo de produção e por se tratar de uma cultura que tinha poucos problemas fitossanitários (Félix e Cavaco, 2004). As principais regiões produtoras de kiwi são o Entre Douro e Minho e a Beira Litoral, sendo a primeira a que apresenta maior área e produção do fruto (INE, 2012). Segundo dados disponibilizados pelo Instituto Nacional de Estatística (INE), em 2013 foram produzidas 21 306 ton de kiwi em

Portugal numa área total de 2 127 ha, das quais 16 695 ton foram produzidas apenas na zona Norte do país. O aumento da exportação de kiwi tem sido notável nos últimos anos, como se pode verificar na Figura 1, tendo sido atingido o valor máximo em 2013 de 13 261 ton, equivalendo a 11 212 000 €.



Figura 1. Valores de exportação portuguesa de kiwi, em euros. (INE, 2007 a 2013)

1.3. Principais doenças que afetam a actinídea

Atualmente, a doença mais preocupante que afeta a actinídea é o cancro bacteriano da actinídea, causado pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Outras bactérias que podem igualmente infetar esta cultura são *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e *P. viridiflava*.

Entre as doenças causadas por fungos que podem provocar danos na cultura do kiwi, referem-se a “podridão agárica” causada por *Armillaria* spp., a podridão radicular causada por *Phytophthora* spp. e a “esca” provocada por um complexo de fungos entre os quais *Phaeoacremonium* spp., *Fomitiporia mediterranea* e *Fusicoccum* spp. (Moreira e Coutinho, 2011; Moreira e Coutinho, 2014). Na Nova Zelândia, a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, os fungos *Phytophthora cactorum*,

P. cinnamomi, *Armillaria mellea* e *Botrytis cinerea* estão também descritos como organismos que infetam e podem provocar danos em actinídea.

1.4. O cancro bacteriano da actinídea

1.4.1. História e distribuição geográfica da doença

O cancro bacteriano da actinídea é causado pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (também denominada pela sigla Psa), isolada pela primeira vez em *A. deliciosa* cv. Hayward em 1984 no Japão por Takikawa e seus colaboradores (Takikawa *et al.*, 1989). Em 1989 foi descrita na China uma doença semelhante (Butler *et al.*, 2013), e em 1992 ocorreu o primeiro relato de Psa na Europa, em Itália (Scortichini, 1994). As referências do aparecimento da doença começaram então a espalhar-se pelos países produtores de kiwi, estando oficialmente presente, tal como está ilustrado na Figura 2, na Coreia do Sul e Irão desde 1994 (Mazarei e Mostofipour, 1994; Butler *et al.*, 2013), em Portugal desde 2010 (Balestra *et al.*, 2010), desde 2011 no Chile (EPPO, 2011a), na Nova Zelândia (Everett *et al.*, 2011), em França (Vanneste *et al.*, 2011), em Espanha (Abelleira *et al.*, 2011), na Austrália (EPPO, 2011b) e na Suíça (EPPO, 2011c) e desde 2012 na Turquia (Bastas e Karakaya, 2012).



Figura 2. Distribuição do cancro bacteriano da actinídea no mundo (EPPO, 2012)

Resultados publicados recentemente por Khandan e Worner (2013) utilizando modelos de previsão da dispersão da doença, indicam que Portugal, a província de Latin em Itália e a Grécia, são previstas como zonas altamente suscetíveis para o desenvolvimento da doença. Com base nos dados disponíveis, e utilizando os modelos CLIMEX e MaxEnt, estes autores apresentam a distribuição global de Psa a nível mundial Figura 3.

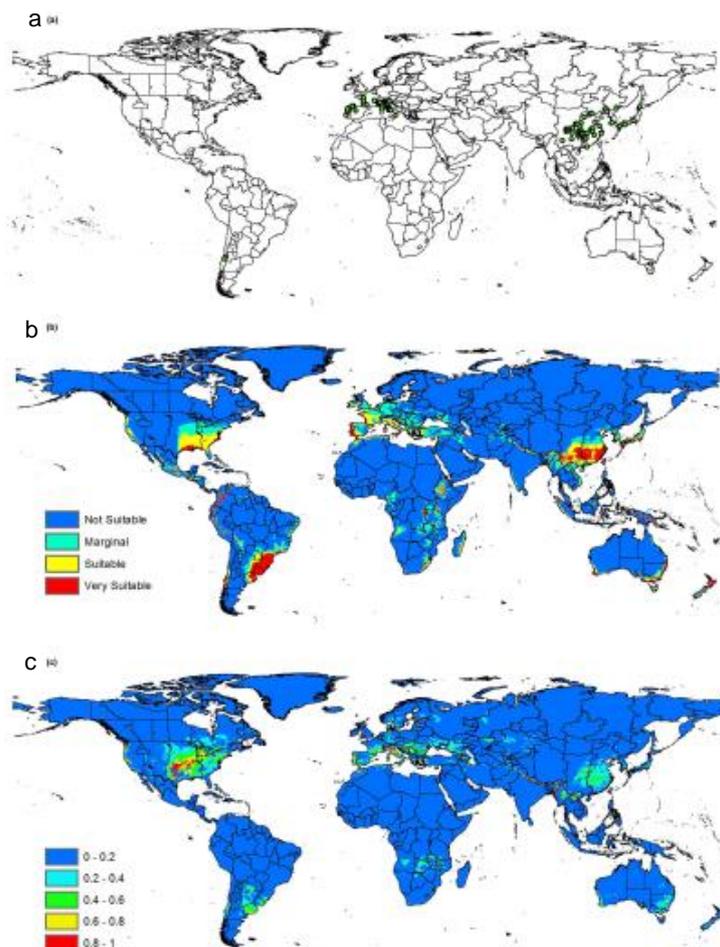


Figura 3. (a) Atual distribuição mundial de Psa usando o modelo CLIMEX e MaxEnt. (b) Potencial distribuição de Psa pelo modelo CLIMEX. (c) Potencial distribuição de Psa pelo modelo MaxEnt. As cores vermelho e amarelo indicam a maior suscetibilidade climática.

Esta doença é atualmente considerada a maior causa de perdas na produção de kiwi dado que tanto afeta a produção como também pode levar à morte das plantas (Abelleira *et al.*, 2014). Foi já responsável por perdas económicas importantes em França, Espanha, Portugal, Chile, Coreia do Sul e Japão, mas principalmente em países como Itália e Nova Zelândia onde a produção de kiwi é bastante importante

para a economia nacional (Scortichini *et al.*, 2012). Em 2008 terá causado perdas económicas na ordem dos 2 000 000 euros em Itália e calcula-se que irá causar prejuízos de 310 a 410 milhões de euros na Nova Zelândia entre 2013 e 2018 (Khandan e Worner, 2013).

A origem e evolução da bactéria Psa, é um tema que ainda não está totalmente esclarecido e que continua a ser alvo de múltiplos estudos. Vários autores referem que Psa terá surgido na Ásia, tendo em conta que é a região de origem do seu hospedeiro (Marcelletti *et al.*, 2011).

Diversos estudos indicam que, ao contrário do que se poderia supor inicialmente, a população Psa3 registada pela primeira vez em Itália em 2008 não deverá descender da população Psa1 já presente no país, mas ambas terão evoluído a partir de um ancestral comum (Marcelletti *et al.*, 2011). Num estudo publicado por Marcelletti e seus colaboradores (2011), em que foram feitas comparações de sequências genéticas de diferentes populações de Psa, *P. avellanae*, *P. s. pv. thea* e *P. s. pv. tomato*, foi verificado que uma importante parte do genoma específico da população Psa3 não tem homologia com a população Psa1, tendo-a com bactérias de outras patovares. Estes resultados sugerem que uma parte importante da porção de ADN da população Psa3 pode ter sido adquirida através de transferência horizontal de genes (Scortichini *et al.*, 2012). Esta aquisição de material genético exógeno pode ocorrer quando as bactérias estão sob condições de stresse e, assim, adquirem genes que podem contribuir para a sua sobrevivência.

A introdução e dispersão desta população Psa3 nos países da Europa, Nova Zelândia e Chile, parece estar ainda por esclarecer, existindo atualmente duas posições diferentes. Por um lado, Scortichini e seus colaboradores (2012) defendem que a doença se propagou pela Europa a partir de material vegetal infetado e para a Nova Zelândia a partir de pólen infetado provenientes de Itália. Por outro lado, Butler *et al.* (2013) afirmam que as estirpes de Psa presentes na Nova Zelândia, Itália e Chile têm um ancestral comum presente na China, sendo este o país de origem do surto.

A bactéria pode infetar tanto *Actinidia deliciosa* como *A. chinensis*, onde causa perdas económicas consideráveis. Também já foi isolada a partir de *A. arguta* e *A. kolomikta* (Scortichini *et al.*, 2012) e recentemente foi descrito que a bactéria também sobrevive em *Cryptomeria japonica*, uma espécie não hospedeira (Vanneste *et al.*, 2012).

Tendo em vista a limitação da dispersão da doença, a EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) adicionou, em 2009, a doença na lista de alerta A2, lista que inclui os organismos recomendados para regulação como organismos de quarentena (EPPO, 2012). Já em 2012 foram pedidas recomendações pela Comissão da União Europeia com vista a serem adquiridas medidas para limitar a propagação da doença nos estados membros. Para esse efeito, passou a ser necessário um certificado fitossanitário de plantas ou pólen que tenham origem em países fora da União Europeia, bem como a sua inspeção e realização de testes laboratoriais para detetar a presença de Psa, quando considerado apropriado. Para movimentação de plantas entre estados membros, passou a ser obrigatório um “passaporte fitossanitário” que garanta que as plantas têm origem num local onde a doença não está presente e podem também ser testadas para a presença de Psa (Cunty *et al.*, 2014).

1.4.2. Sintomatologia e evolução da doença

Os sintomas da doença variam ao longo do ano. No princípio da primavera o sintoma mais visível é a produção de um exsudado avermelhado associado a cancos e feridas nos troncos e ramos infetados. No caso de não haver exsudado, pode ser observada uma coloração vermelha-acastanhada por baixo da casca (Figura 4e). Embora seja mais difícil de detetar, pode ainda ocorrer a formação de gotas de exsudado branco nos tecidos, o qual é consequência da bactéria estar a ser expelida dos tecidos infetados após um período de intensa multiplicação bacteriana. A produção deste exsudado não acontece sempre associada aos outros sintomas, podendo ser observada antes da floração e no verão. Durante a primavera podem ainda surgir pintas e necroses nas folhas (Figura 4a), e necroses

castanhas nos botões florais (Figura 4c), que podem levar ao abortamento floral, impedindo assim a formação de fruto (Vanneste *et al.*, 2011d; Abelleira *et al.*, 2011; Moura, 2013). Também um importante sinal de que o pomar pode estar infetado com Psa é a morte repentina de plantas, com a parte aérea da planta a murchar em poucos dias (Andolfi *et al.*, 2014).

No verão, o sintoma mais notório é o aparecimento de pequenas manchas necróticas angulares nas folhas (podem começar a formar-se no final da primavera), podendo apresentar ou não, um halo amarelo (Figura 4a). Estas manchas podem acabar por se juntar, formando necroses castanhas de maiores dimensões (Figura 4b) (Moura, 2013). Os ramos podem começar a secar a partir do meio, presumivelmente o local onde a bactéria entrou no tecido, secando posteriormente em ambas as direções (Vanneste *et al.*, 2011d), com a consequente morte do fruto (Figura 4d).

Na parte final do verão e durante o outono podem começar a formar-se cancrios nos troncos e nos ramos. No final do outono a bactéria pode entrar na planta através das diversas feridas resultantes da colheita do fruto e da queda das folhas. No entanto, os sintomas das novas infeções só aparecerão na primavera seguinte (Vanneste *et al.*, 2011d).

Alguns sintomas desta doença não são específicos, o que dificulta a sua identificação no campo. Por exemplo, a morfologia das manchas nas folhas e as necroses nas flores causadas pela Psa são semelhantes às causadas por outras bactérias patogénicas da actinídea como *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ou *Pseudomonas viridiflava*. Entre os restantes sintomas, os que parecem ser mais específicos de Psa são a produção de exsudados brancos e avermelhados e a morte dos rebentos no verão (Vanneste *et al.*, 2011d).

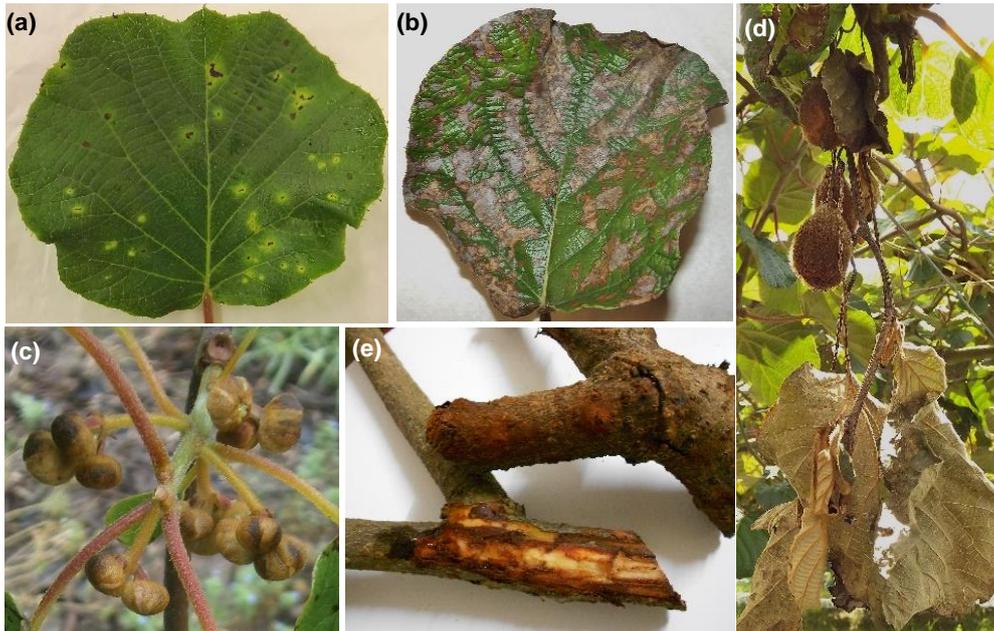


Figura 4. Sintomas característicos de Psa em actinídea **(a)** Folha de *Actinidia deliciosa* com necroses castanhas circundadas por halo amarelo. **(b)** Folha com necroses castanhas de maiores dimensões. **(c)** Botões florais com necroses castanhas. **(d)** Murchidão e morte de ramos. **(e)** Zonas debaixo da casca com tonalidade avermelhada.

A bactéria pode colonizar a planta aparentemente em qualquer altura do ano, no entanto, as épocas mais favoráveis são o fim do inverno, início da primavera e o outono, dado que as condições de temperatura e humidade são mais favoráveis e são realizadas operações culturais que podem promover a sua penetração (Vanneste *et al.*, 2011e; Ferrante *et al.*, 2012; Scortichini *et al.*, 2012). No verão, quando as temperaturas sobem acima de 27°C, a sua dispersão e infeção são totalmente inibidas (Serizawa e Ichikawa, 1993). Relativamente à sua virulência, esta é maior a temperaturas entre os 10°C e os 20°C, em que a temperatura ótima parece ser nos 15±3°C (Serizawa e Ichikawa, 1993; Cheng *et al.*, 1995)

No inverno pensa-se que Psa se possa manter nos tecidos doentes, como é característico da espécie *P. syringae* que infeta plantas lenhosas (Vanneste *et al.*, 2011d), podendo mesmo descer até às raízes da planta onde se mantém inativa (Renzi *et al.*, 2012a). No final do inverno pode iniciar-se a dispersão da bactéria através da produção de exsudados bacterianos a partir dos cancrios antigos (Ferrante *et al.*, 2012). Quando a temperatura começa a aumentar, com o início da primavera, a bactéria aumenta a sua multiplicação, sendo uma época do ano

preferencial para a disseminação dentro da planta e entre plantas no mesmo pomar. A migração dentro da planta hospedeira ocorre através dos vasos xilémicos e representa uma importante fase do ciclo da doença, uma vez que pode resultar na formação de cancrios que permitem a dispersão no ambiente através dos exsudados (Spinelli *et al.*, 2011). Nesta fase podem aparecer necroses nos botões florais que podem resultar em necroses nas pétalas ou mesmo na queda em massa das flores na época de floração (Ferrante *et al.*, 2012).

No verão, a população de Psa pode diminuir, graças ao aumento da temperatura, embora a bactéria tenha a capacidade de sobreviver a temperaturas elevadas, podendo observar-se apenas a diminuição da sua atividade (Vanneste *et al.*, 2011d; Renzi *et al.*, 2012a). A população e a sua atividade volta a aumentar quando as temperaturas decrescem com a chegada do outono (Vanneste *et al.*, 2011d).

Vanneste *et al.*, (2011d) apresentam, através da Figura 5, uma proposta possível para o ciclo de vida da Psa (Vanneste *et al.*, 2011d). Nesta figura associam-se as



fases do ciclo de vida da bactéria aos sintomas conhecidos nas plantas.

Figura 5. Ciclo de vida da Psa sugerido por Vanneste e seus colaboradores (adaptado de Vanneste *et al.*, 2011d).

1.4.3. Transmissão e disseminação da doença

Os mecanismos utilizados por Psa na sua dispersão ainda não estão totalmente esclarecidos. Acredita-se que a propagação e disseminação da bactéria a pequenas distâncias, como dentro de um pomar ou entre pomares vizinhos, seja feita pelas populações de Psa que se desenvolvem no exterior da planta (população epifítica), pela produção de exsudados das plantas infetadas, pela fricção entre folhas de plantas infetadas e plantas saudáveis, pelo vento, pela chuva, pelo pólen e ainda por insetos (nomeadamente abelhas) (Stefani e Giovanardi, 2011; Vanneste *et al.*, 2011d; Ferrante *et al.*, 2012; Pattemore *et al.*, 2013; Tontou *et al.*, 2014).

No estudo publicado por Vanneste *et al.*, (2011d), na sequência do acompanhamento de pomares de kiwi na região de Latina (Itália), foi observado que a propagação da doença a pequenas distâncias ocorre de uma forma mais acelerada quando a temperatura é relativamente baixa (abaixo dos 20°C) e a humidade relativa é elevada, tendo havido o aumento de focos de infeção já existentes, mesmo com a utilização de medidas de proteção culturais rigorosas (Vanneste *et al.*, 2011d). Os mesmos autores, numa monitorização feita entre Abril e Junho de 2010 a um pomar na mesma região, observaram que algumas plantas assintomáticas no início da monitorização acabaram por morrer pela presença comprovada da doença, mostrando a rapidez com que a Psa pode infetar e mover-se entre plantas e dentro delas. Entre as plantas monitorizadas, observaram também que as que tinham sido enxertadas mais recentemente (2008) foram mais suscetíveis à infeção do que as que tinham sido enxertadas em 2004. Embora estes aspetos resultem de uma simples observação, correspondente à situação particular da região de Latina, e uma vez que estas plantas não foram inoculadas e mantidas em ambiente controlado, não se podem tirar conclusões seguras, mas parece que as plantas mais jovens são mais suscetíveis à doença do que as mais antigas (Vanneste *et al.*, 2011d).

Outros autores como Stefani e Giovanardi (2011) e Tontou *et al.* (2014), referem ainda que a humidade relativa, a ocorrência de geadas e a própria idade da planta são igualmente fatores importantes na transmissão e disseminação da doença.

A geada é considerada um dos fatores que tornam a planta mais suscetível à colonização de bactérias já existentes na planta ou que facilitam a sua entrada na planta (Ferrante e Scortichini, 2014). No estudo publicado por Ferrante e Scortichini (2014), foi mostrado que a população de *Psa* presente em plantas sujeitas a geadas aumenta mais do que nas que estão protegidas (Ferrante e Scortichini, 2014). Este aumento da população pode estar relacionado com o facto das células da planta danificadas pelo gelo libertarem água e nutrientes, importantes para a multiplicação celular das bactérias. Ainda se verificou que, após uma geada e dois dias de incubação, a população de *Psa* presente em ramos novos (lançamentos de primeiro ano) aumentou 10 vezes mais, do que a população bacteriana presente em ramos mais antigos. Para além da multiplicação da bactéria, estas geadas também promoveram a penetração efetiva do patogéneo nas folhas através dos estomas e de pequenas feridas. Este estudo mostrou ainda que após uma geada, durante o descongelamento dos tecidos, os cristais de gelo que ocupavam os espaços intracelulares começam a derreter, ocupando menos espaço, e as bactérias suspensas nas gotas de água à superfície podem então ser absorvidas para os espaços intracelulares. Assim, sendo um processo que pode ocorrer numerosas vezes durante o ano, pode-se dizer que este processo pode efetivamente levar à colonização de porções relevantes de ramos com um ano, e conseqüentemente permitir a migração da bactéria para os ramos e o tronco principal na estação seguinte (Ferrante e Scortichini, 2014).

Para além dos locais suscetíveis de entrada da bactéria na planta deixados pela ocorrência de geadas, também os estomas, as lenticelas, os tricomas danificados, as cicatrizes deixadas pela queda das folhas, as lesões provocadas por acontecimentos naturais (vento, granizo, etc.) ou humanos (poda, colheita de frutos, etc.) são importantes pontos de penetração na planta (Spinelli *et al.*, 2011; Renzi *et al.*, 2012a).

Diversos estudos já mostraram que o pólen de *Actinidia* spp. é um importante vetor de propagação de *Psa*. Estudos publicados por vários autores em 2011 (Gallelli *et al.*, 2011b; Stefani e Giovanardi, 2011; Vanneste *et al.*, 2011b) mostraram que o

pólen pode ser um substrato de sobrevivência e colonização de Psa. Mais recentemente, estudos publicados por Tontou *et al.*, (2014) comprovaram a presença de Psa em pólen proveniente de plantas com sintomas da doença e, ainda, a possibilidade do pólen naturalmente infetado ser o responsável pelo início de um novo foco de infeção, e conseqüente estabelecimento da doença no pomar (Tontou *et al.*, 2014).

Também as abelhas podem desempenhar um papel importante na propagação da doença, uma vez que já foram detetadas bactérias viáveis de Psa em abelhas presentes em pomares com plantas infetadas (Pattemore *et al.*, 2013). Esta questão pode ser particularmente importante dado que é habitual haver movimentações de colmeias entre pomares para promover a polinização.

Relativamente ao risco de introdução e propagação da doença pelo fruto, os resultados de estudos feito por Stefani e Giovanardi (2011) indicam ser um risco insignificante (Stefani e Giovanardi, 2011).

A bactéria ativa nos tecidos das plantas infetadas pode facilmente ser transmitida a novas plantas através de práticas utilizadas em viveiros de propagação de plantas, particularmente a enxertia e a poda. Assim, alguns autores referem que a disseminação da bactéria a longas distâncias, entre regiões ou países, é mais provavelmente o resultado da troca comercial de plantas infetadas, e de pólen infetado (Vanneste *et al.*, 2011d; Ferrante *et al.*, 2012;).

1.4.4. Meios de proteção

Tratando-se de uma doença que afeta gravemente a produção de kiwi podendo levar à morte das plantas com perdas económicas significativas, para a qual não existem métodos curativos conhecidos, é particularmente importante evitar a infeção dos pomares. No entanto, como já foi descrito nos pontos anteriores deste trabalho, é muito difícil conter a disseminação da bactéria.

Uma vez a doença instalada, a utilização de meios de proteção adequados revestem-se de fundamental importância. Devem ser adotadas práticas fitossanitárias adequadas como a utilização de compostos bacteriostáticos, uso de indutores que ativem o sistema imunitário da planta e utilização de agentes de luta biológica (Cameron *et al.*, 2014). A nutrição do pomar e a gestão da água são igualmente fatores importantes no controlo da doença.

Recentemente têm sido desenvolvidos vários trabalhos com o objetivo de obter cultivares resistentes à doença, agentes de biocontrolo (bacteriófagos, por exemplo) e compostos que induzam o sistema de ativação dos mecanismos de defesa da planta para controlar efetivamente a doença (Scortichini *et al.*, 2012). No entanto, é importante referir que o sucesso das estratégias de controlo da doença dependem das condições climáticas, o que significa que uma estratégia encontrada e que funcione num país ou região, não significa obrigatoriamente que resulte no território português (Vanneste, 2013a).

1.4.4.1. Meios de proteção culturais

No plano de ação nacional para o controlo da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (DGAV, 2013) é aconselhado que todas as plantas com sintomas nítidos da doença (nomeadamente o aparecimento de exsudado ferruginoso) sejam cortadas até um metro abaixo do ponto de infeção. Aconselha-se ainda que as plantas com sintomas apenas nos ramos devem ser podadas, cortando os ramos a, pelo menos, 70 cm abaixo do ponto de infeção e as plantas que apresentam apenas sintomas nas folhas devem ser podadas no final da colheita de uma forma cuidada, sendo o pomar desinfetado com produtos à base de cobre. Vanneste *et al.* (2011d), embora também aconselhem o corte e remoção de material sintomático, acrescentam que esta medida não remove todo o inóculo, uma vez que apenas são removidas plantas que foram infetadas e que tiveram tempo para expressar os sintomas (Vanneste *et al.*, 2011d). As plantas ou parte de plantas que tenham sido infetadas e que ainda não tenham expressado os sintomas, ou as plantas nas quais a Psa esteja presente como epifítica não são removidas, o que permite que a doença continue a espalhar-se no pomar. Este fenómeno foi demonstrado nos pomares de

Latina, em Itália, em que, apesar de se terem cortado as plantas doentes, a doença continuou a progredir (Vanneste *et al.*, 2011d).

Na altura de poda e de colheita, deve-se minimizar o tamanho e o número de feridas resultantes destas operações, protegendo as feridas com uma cobertura protetora sempre que possível. O material de colheita, como as caixas usadas no campo, devem ser novas ou cuidadosamente desinfetadas, tendo o cuidado de confirmar que não têm folhas ou varas de outros pomares (Moreira e Coutinho, 2014). Na altura da poda, deve ser removido todo o material vegetal em excesso e desordenado das plantas, de forma a evitar que fenómenos naturais, como o vento, provoquem danos nas plantas e, conseqüentemente, abertura de feridas (Cameron *et al.*, 2014; DGAV, 2013; Vanneste, 2013a). Toda a lenha de poda e plantas mortas de pomares infetados devem ser retiradas do pomar e queimadas (Moreira *et al.*, 2014). A desinfecção do material e equipamento agrícola é crucial para prevenir tanto a introdução da doença no pomar, como a transferência do inóculo entre plantas. Todo o material agrícola que tenha vindo de outro pomar deve ser desinfetado, incluindo as alfaias agrícola, rodas dos tratores, e os utensílios usados na poda devem ser regularmente desinfetados ao longo do dia (álcool a 70°C, durante 2 minutos) (Cameron e Sarojini, 2014; DGAV, 2013; Moreira *et al.*, 2014; Vanneste, 2013a). Recomenda-se, assim, o cuidado de verificar que não há transferência de material vegetal ou solo entre pomares, assegurar que o vestuário, cabelo ou calçado se encontram limpos, que se higienizem as mãos e desinfete o calçado, que se utilizem luvas descartáveis e que se trabalhe primeiro nos pomares menos infetados (Vanneste, 2013a).

A utilização de plantas sãs para instalação de pomares é de extrema importância, devendo ser acompanhadas de passaporte fitossanitário que comprove que as plantas estão isentas de Psa. Deve ser evitado o vigor excessivo das plantas, com as adubações feitas tendo como base análises de solo e foliares (Moreira e Coutinho, 2014). O excesso de humidade no interior do pomar deve ser evitado, com técnicas de rega apropriadas e o coberto vegetal do solo controlado.

1.4.4.2. Meios de proteção biológica

1.4.4.2.1. Bacteriófagos

Os bacteriófagos são vírus que infetam especificamente uma bactéria e a sua replicação resulta na lise e morte da célula hospedeira e no lançamento de mais partículas virais (Frampton *et al.*, 2014). Como exemplo de produto comercial já a ser utilizado, pode-se referir o AgriPhage™ da OmniLytics, utilizado como meio de luta contra patógenos do tomateiro como *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Relativamente à cultura da actinídea, estudos realizados na Nova Zelândia por Frampton e seus colaboradores (2014), permitiram a obtenção de bacteriófagos em pomares de kiwi. Estes foram testados numa coleção de diferentes estirpes de Psa e de outras bactérias presentes habitualmente nos pomares, o que permitiu verificar que os bacteriófagos isolados têm a capacidade de infetar as duas populações de Psa presentes na Nova Zelândia, Psa3 e Psa4 (atualmente descrita como *P. s.* pv. *actinidifoliorum* pv. nov.) (Frampton *et al.*, 2014). A variedade de hospedeiros de cada fago em particular foi reduzida, sugerindo que o desenvolvimento de um cocktail de fagos com atividade contra a Psa deve ter um impacto mínimo na restante microflora. Os resultados obtidos mostraram ainda que estes têm a capacidade de infetar a maioria das estirpes de Psa isoladas na Nova Zelândia e na Europa, mas não as provenientes do Japão ou Coreia, o que sugere que o desenvolvimento de um tratamento à base de fagos pode ser aplicável tanto na Nova Zelândia como na Europa, embora as condições climáticas possam provocar alterações que têm que ser tidas em conta.

1.4.4.3. Meios de proteção química

Não havendo tratamentos curativos para o cancro bacteriano da actinídea, os tratamentos químicos existentes são preventivos, e têm melhores resultados quando aplicados numa fase inicial do desenvolvimento da doença. Atualmente os

tratamentos químicos baseiam-se na pulverização com compostos de cobre. Os compostos à base de cobre são os mais importantes neste momento, dado que na Europa não é permitido o uso de antibióticos na agricultura, e ainda porque o cobre pode ser utilizado no modo de produção biológico de kiwi. Contudo, ambos apresentam problemas de fitotoxicidade, resistência da bactéria e presença de resíduos nos frutos (Cameron *et al.*, 2014). Os compostos indutores de mecanismos de resistência relatados para o controlo de doenças nas plantas, incluem proteínas bacterianas como as proteínas *Harpin*, que ativam a defesa da planta e induzem a sua resistência, e ainda polissacarídeos como a quitosana. O uso de indutores isoladamente não é recomendado, e a duração da proteção fornecida depende do tipo de molécula utilizada, do patógeno e da cultura (Cameron *et al.*, 2014).

1.4.4.3.1. Cobre

Embora o cobre seja um micronutriente essencial para os organismos, quando utilizado em excesso é tóxico, sendo amplamente usado na agricultura como meio de luta contra diferentes agentes patogénicos das plantas. No entanto, estes compostos usados como bacteriostáticos já mostraram ser fitotóxicos, provocando danos tanto em folhas como em caules. Adicionalmente são já conhecidos casos de resistência de Psa a estes compostos de cobre (Vanneste *et al.*, 2011d; Cameron *et al.*, 2014)

As pulverizações com compostos à base de cobre devem ser efetuadas em fases do ciclo vegetativo de maior risco de infeção. Assim, recomendam-se tratamentos realizados o mais próximo possível do fim da poda de inverno, na fase de quebra da dormência (para a redução do inóculo) e duas e 4 semanas depois, preferencialmente antes dos maiores eventos de chuva, para proteger os tecidos jovens suscetíveis (Vanneste *et al.*, 2011d; Moreira e Coutinho, 2014). Só se devem fazer pulverizações após a floração em situações de alto risco, como por exemplo depois de ocorrência de ventos fortes, chuvas ou granizo. No período após a colheita e à queda das folhas são novamente recomendadas pulverizações para

prevenir que a bactéria infete a planta através das feridas naturais resultantes (Vanneste *et al.*, 2011d; Moreira e Coutinho, 2014).

Embora pareça que a actínídea seja relativamente tolerante a novas formulações de cobre, o seu uso excessivo irá conduzir a fenómenos de fitotoxicidade, acumulação no solo e seleção de estirpes da bactéria resistentes ou tolerantes ao cobre, o que diminuirá a sua eficácia (Vanneste *et al.*, 2011d).

1.4.4.3.2. Estreptomicina

A estreptomicina é um antibiótico aminoglicosídeo (composto por um grupo amino e um grupo glicosídeo) que foi introduzido em 1944 para o controlo clínico da tuberculose. A partir dos anos 50, este antibiótico também tem sido usado no controlo de doenças de plantas e é considerado o tratamento químico atualmente mais efetivo para Psa. A sua capacidade antimicrobiana deve-se ao facto de se ligar de forma irreversível à subunidade 30S do ribossoma do 16S sRNA da bactéria, interferindo na tradução de mRNA das proteínas e, conseqüentemente, conduzindo à morte celular. No entanto, para além de não ser permitido o uso de antibióticos na agricultura na Europa, já foram reportados casos de resistência de Psa à estreptomicina em pomares frequentemente pulverizados com este antibiótico (Cameron *et al.*, 2014)

1.4.4.3.3. Terpenos

Terpenos como o geraniol e o citronelol são hidrocarbonetos de origem animal ou vegetal, geralmente encontrados em óleos essenciais ou nos seus derivados. O geraniol é o isómero “E” do composto 3,7-dimetilocta-2,6-dieno-1-ol e acredita-se que ocorra em quase todos os óleos essenciais contendo terpenos, como o óleo de palmarosa (contendo 70-85% de geraniol), gerânio e óleo de rosas. O citronelol (3,7-dimetiloct-6-1-ol) ocorre naturalmente em ambos os isómeros (+) e (-) em muitos óleos essenciais como os de *Boronia citriodora* e *Eucalyptus citriodora*.

De acordo com Cameron e Sarojini (2014) os terpenos geraniol e citronelol, têm um efeito inibitório do crescimento *in vitro* de Psa quando se utilizam 50 mg/L e 200

mg/L, respetivamente. Estes dois compostos também inibem o crescimento de *Erwinia amylovora*, agente causal do fogo bacteriano em rosáceas. Segundo os mesmos autores, os resultados obtidos com estas duas bactérias foram idênticos, sendo o geraniol mais eficaz do que o citronelol (Cameron e Sarojini, 2014).

1.4.4.3.4. Quitosana

A quitosana é obtida a partir de casca de crustáceos, principalmente do camarão, e é conhecida pela sua atividade antimicrobiana contra diversos patogéneos de plantas, tendo já mostrado boa atividade contra *Psa in vitro*. A vantagem da utilização desta substância em detrimento dos métodos químicos convencionais é o facto de possuir uma boa biocompatibilidade com os organismos e biodegradabilidade. A sua natureza catiónica, o grau de acetilação e o comprimento da cadeia do polímero são cruciais para a sua atividade antimicrobiana (Cameron e Sarojini, 2014).

A quitosana é a substância ativa em produtos comerciais como ARMOUR-Zen[®], o qual está atualmente sob consideração afim de se tornar um produto aprovado na Nova Zelândia para controlo de *Psa*.

1.4.4.3.5. Péptidos antimicrobianos

Os péptidos antimicrobianos (AMP) são componentes evolutivamente conservados do sistema imunitário inato do complexo multicelular dos organismos e fornece a primeira linha de defesa contra muitos patogéneos, incluindo bactérias. No geral os AMP consistem em menos de 50 aminoácidos, são anfipáticos na natureza e normalmente a sua carga global é positiva (catiónica). A natureza anfipática permite aos AMP serem solúveis tanto em meios aquosos como lipídicos, propriedade esta que é essencial para a sua atividade antimicrobiana (Cameron *et al.*, 2014). Apesar dos mecanismos de ação dos AMP não estarem bem estabelecidos, é amplamente aceite que muitos AMP atingem a membrana de bicamada lipídica, promovendo a sua danificação e podendo mesmo levar à lise total. Enquanto que a monocamada externa da membrana celular das plantas e dos animais é constituída quase na totalidade por lípidos sem carga e a camada interna possui lípidos com carga

negativa, nas bactérias Gram-negativas como Psa, tanto a camada externa como a interna contêm grupos aniônicos. Assim, as membranas externas celulares das bactérias fornecem um ponto de ligação seletivo para os AMP catiónicos (Cameron *et al.*, 2014).

Estudos recentes realizados por Cameron e seus colaboradores (2014), mostraram que a Psa é suscetível a pequenos AMPs catiónicos, no entanto, ainda é necessário realizar-se experiências de campo, testes de toxicidade e otimização da sequência peptídica. Contrariamente ao que se passa com os antibióticos convencionais, a resistência de microrganismos aos AMPs será altamente improvável, o que leva a pensar que poderão ser um meio de luta interessante a utilizar para Psa (Cameron *et al.*, 2014).

1.4.4.3.6. Indutores de defesa das plantas

Os indutores são compostos que ativam o sistema natural de defesa da planta. Um dos indutores com melhores resultados em ensaios em estufa com *A. chinensis* e *A. deliciosa* é o acibenzolar-S-metil (ASM), vendido com o nome Bion[®] ou Actigard[®] (Syngenta) (Reglinski *et al.*, 2013).

O ASM pertence ao grupo químico benzotriazol e atua como análogo funcional do ácido salicílico, tendo já mostrado boa eficácia contra outras doenças bacterianas. Contudo, sabe-se que estes compostos podem ser muito eficazes em condições controladas, mas a resposta do hospedeiro pode ser altamente variável no campo, o que aumenta as questões sobre a sua potencial utilização como meio de luta à doença. Além disso, há evidências de que a resistência induzida das plantas pode ser acompanhada pela redução de produção ou de qualidade do fruto (Reglinski *et al.*, 2013).

No que respeita a Psa, a utilização de ASM em aplicação foliar em plantas de *A. chinensis* diminuiu significativamente a incidência da doença, existindo evidências histológicas que sugerem que a bactéria é menos capaz de colonizar folhas tratadas com ASM do que folhas não tratadas (Reglinski *et al.*, 2013).

1.5. A bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

1.5.1. Taxonomia

A bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pertence ao super-reino Bactéria, filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonadaceae*, género *Pseudomonas*, espécie *Pseudomonas syringae* e patovar *actinidiae*, (EPPO, 2012). Está incluída na *genomospecies* 8 *sensu* Gardan *et al.* (1999) juntamente com *P. avellanae* e *P. s.* pv. *theae* (Ferrante e Scortichini, 2011; Scortichini *et al.*, 2012; Koh *et al.*, 2014).

Ao nível da patovar, diferentes populações de Psa apresentam distintas características fenotípicas, genéticas e de patogenicidade, caracterizadas por diferenças na sequência de ADN de diversos genes, bem como pela presença ou ausência de genes codificadores de faseolotoxina, coronatina e proteínas efetoras (Cunty *et al.*, 2014; EPPO, 2014). Assim, até novembro de 2014, as estirpes de Psa foram divididas em 4 populações diferentes (Quadro 1). Recentemente, a população Psa4 foi reclassificada numa nova patovar de *P. syringae*, tal como se descreverá seguidamente (Cunty *et al.*, 2014).

Como já foi referido, a primeira publicação com a caracterização de Psa foi feita em 1989 por Takikawa e seus colaboradores (1989), estando também presente desde 1992 em Itália (Takikawa *et al.*, 1989). Estas estirpes pertencem à população “Psa1” (Chapman *et al.*, 2012), também conhecida por “biovar 1” (Vanneste *et al.*, 2013b), “cts haplotipo A” (Vanneste *et al.*, 2010), “J-Psa” (Marcelletti *et al.*, 2011) ou “linhagem Coreana/Japonesa” (Mazzaglia *et al.*, 2012). As estirpes de Psa pertencentes à população Psa1 são caracterizadas por produzirem faseolotoxina e não produzirem coronatina (Vanneste *et al.*, 2013b). Relativamente à sua virulência, parece variar com a região geográfica em que se encontra, uma vez que o seu impacto nos pomares foi bastante diferente no Japão e em Itália. Embora as populações sejam bastante semelhantes geneticamente, no Japão causou importantes perdas económicas ao contrário do que aconteceu em Itália, onde não provocou grande impacto na produção de kiwi. Esta situação pode sugerir que as condições climáticas ou as técnicas de produção utilizadas nos dois países podem

ter influência na agressividade com que a bactéria infeta a planta. (Scortichini *et al.*, 2012). As estirpes isoladas na Coreia do Sul pertencem à população “Psa2” (Chapman *et al.*, 2012) ou “biovar 2” (Vanneste *et al.*, 2013b) e caracterizam-se por não produzirem faseolotoxina e possuírem um gene presumivelmente transmitido por plasmídeos que permite a produção de coronatina (Scortichini *et al.*, 2012). Estas estirpes têm sido responsáveis por importantes perdas económicas na Coreia do Sul, tanto em *A. deliciosa* cv. Hayward como em *A. chinensis* Hort16A (Scortichini *et al.*, 2012).

A população Psa3 (Chapman *et al.*, 2012), também conhecida por biovar 3 (Vanneste *et al.*, 2013b), Psa-V (Vanneste, 2013b), “cts haplotipo I” (Vanneste *et al.*, 2010), I2-Psa (Marcelletti e Scortichini, 2011) ou “linhagem Chinesa/Europeia” (Mazzaglia *et al.*, 2012) é a responsável pelo atual surto nos principais países produtores de kiwi, nomeadamente na Nova Zelândia e Itália, estando a causar importantes perdas económicas. As bactérias desta população não produzem faseolotoxina ou coronatina (Scortichini *et al.*, 2012) estando oficialmente presentes no Chile, China, Espanha, França, Itália, Portugal e Nova Zelândia (Chapman *et al.*, 2012; Moura *et al.*, 2013).

Estudos recentes sobre as características fenotípicas, moleculares e de patogenicidade de Psa, realizados por Cuntty e seus colaboradores (2014), permitiram reclassificar a população Psa4 (ou biovar 4, ou Psa-LV), como uma nova patovar, designada *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. (Cuntty *et al.*, 2014; EPPO, 2014), que é caracterizada por causar sintomas apenas nas folhas, não conduzindo à morte das plantas (Scortichini *et al.*, 2012; Cuntty *et al.*, 2014).

As estirpes utilizadas para a descrição desta nova patovar foram isoladas na Nova Zelândia, Austrália e França, mas pensa-se que esta nova patovar possa estar presente em todos os países produtores de kiwi da Europa (Cuntty *et al.*, 2014)

Quadro 1. Classificações das populações de Psa, distribuição geográfica e virulência.

POPULAÇÃO	LOCALIZAÇÃO	VIRULÊNCIA
Psa1 Biovar 1	Japão (1984), Itália (1992)	Moderada Elevada
Psa2 Biovar 2	Coreia	Moderada
Psa3 Biovar 3 Psa-V	Chile, China, Espanha, França, Itália, Portugal, Nova Zelândia	Elevada
Psa4 Biovar 4 Psa-LV	Austrália, Nova Zelândia, França	Pouca

P. s. pv. actinidifoliorum pv nov.

1.5.1.1. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. (anterior população Psa4)

As estirpes que constituem esta patovar, anteriormente descrita como sendo a população Psa4, foram isoladas desde 1992 na Austrália e podem estar presentes nos restantes países produtores de kiwi há muitos anos sem ter sido detetada, já que nunca foi associada a outros sintomas para além de manchas nas folhas, não conduzindo a perdas económicas importantes (Vanneste *et al.*, 2013b). Num estudo publicado por Cuntly *et al.* (2014) é admitida a possibilidade destas estirpes estarem presentes na Europa muito antes de ter surgido a patovar *actinidiae*, havendo portanto a possibilidade de existir uma maior variabilidade genética dentro desta patovar do que a registada até agora, e admitindo-se que possa mesmo ter outros hospedeiros para além da actínídea (Cuntly *et al.*, 2014).

A importância em distinguir as estirpes de *P. s. pv. actinidiae* das estirpes *P. s. pv. actinidifoliorum* prende-se principalmente com o facto das medidas exigidas para controlar o cancro da actínídea causado por Psa serem desadequadas às perdas induzidas pelas estirpes da patovar *actinidifoliorum* (Cuntly *et al.*, 2014).

Existem importantes diferenças genéticas, bioquímicas e patogénicas entre as duas patovares. Análises filogenéticas de genes *housekeeping* (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, *rpoD*) mostram que as populações de Psa1, Psa2 e Psa3 apresentam maior proximidade com *P. s. pv. theae* do que com estirpes de *P. s. pv. actinidifoliorum* pv. nov., existindo assim uma clara distinção genética entre as duas patovares em questão (Chapman *et al.*, 2012; Vanneste *et al.*, 2013b; Cuntty *et al.*, 2014). Adicionalmente, trabalhos publicados por Chapman *et al.* (2012) mostraram que enquanto nas estirpes de *P. s. pv. actinidifoliorum* pv. nov. (ex. Psa4) o gene *avrD1* não está presente e o gene *hopAF1* está, nas biovares de Psa acontece o contrário (Chapman *et al.*, 2012). As diferenças genéticas são também evidenciadas pelo facto da utilização de duas técnicas moleculares recentes de deteção específica de Psa, descritas por Gallelli *et al.* (2011a) e Balestra *et al.* (2013), não produzirem qualquer fragmento para estirpes de *P. s. pv. actinidifoliorum*. Adicionalmente, o padrão de bandas obtido por rep-PCR de estirpes de ambas as patovares são claramente distintos (Cuntty *et al.*, 2014).

Ao nível da sintomatologia, as estirpes de *P. s. pv. actinidifoliorum* pv. nov causam manchas pequenas nas folhas de actinídea e não originam cancrios ou a morte das plantas (Vanneste *et al.*, 2013b; Cuntty *et al.*, 2014). Contrariamente à Psa que apenas causa infeção em actinídea, esta patovar parece infetar *Prunus cerasus* e causar necroses em frutos de *Capsicum annuum* (Cuntty *et al.*, 2014; Ferrante e Scortichini, 2014).

1.5.2. Caracterização morfológica, cultural e bioquímica

P. s. pv. actinidiae é, como todas as *Pseudomonas*, uma bactéria Gram negativa, em forma de bastonete, móvel e é oxidase negativa (Scortichini *et al.*, 2012). É estritamente aeróbica, produz colónias tipo levana positivo em meio *Nutrient Sacarose Agar* (NSA), não é pectinolítica, não hidrolisa a arginina e produz uma reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco, sendo incluída no grupo LOPAT la de Lelliott *et al.* (1966) (Ferrante e Scortichini, 2010; Koh *et al.*, 2010; Gallelli *et al.*, 2011a; Chapman *et al.*, 2012). Reage positivamente ao teste da urease e

negativamente ao teste da tirosina e nitratos (Mazzaglia *et al.*, 2011; Renzi *et al.*, 2012b). No entanto, em estirpes isoladas em Itália durante o surto de 1992 o teste da tirosina era negativo (Ferrante e Scortichini, 2010; Scortichini, 1994). Em meio B de King (King *et al.*, 1954), forma colónias de uma cor esbranquiçada, translúcidas e redondas (Scortichini, 1994; Everett *et al.*, 2011; Moura, 2013; Abelleira *et al.*, 2014). A fluorescência em meio B de King parece ser uma característica variável para *Psa*. No primeiro artigo publicado sobre a bactéria, esta não produzia fluorescência neste meio de cultura quando observada sob luz ultravioleta (Takikawa *et al.*, 1989). O mesmo se verificou com os isolados obtidos mais tarde por outros autores (Mazzaglia *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2013). Estudos de Ferrante e Scortichini (2010) indicam que enquanto as estirpes isoladas em Itália durante o surto de 1992 não apresentavam fluorescência, as estirpes isoladas em 2009 já apresentavam esta característica. Também Vanneste *et al.* (2011a) obtiveram resultados positivos quanto à fluorescência para as estirpes isoladas em França e Itália após 2008.

A caracterização com base no estudo das características fisiológicas, bioquímicas ou nutricionais (assimilação de diferentes fontes de carbono e produção de enzimas), é atualmente facilitada pela utilização de Kits comerciais. Assim, o perfil de assimilação de 94 substratos de carbono (incluindo açúcares, aminoácidos, e álcoois) podem ser avaliados pela utilização do sistema Biolog GN MicroPlate® (Biolog, 2011), que complementados pelo estudo de outros caracteres, como a fluorescência em meio B de King, actividade pectinolítica, produção de levana, hidrólise da arginina e teste de hipersensibilidade no tabaco, constituem um meio de caracterização de uma estirpe muito completo e rápido, fornecendo resultados entre 24 a 48 horas após a sua realização. O sistema Biolog tem vindo a ser utilizado para organismos em diversos estudos, incluindo *Pseudomonas* (Grimont *et al.*, 1996; Gormez e Sahin, 2012), e *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Chapman *et al.*, 2012).

1.5.3. Caraterização dos ácidos gordos

A composição em ácidos gordos das bactérias é altamente conservada ao nível da espécie, o que faz com que a sua análise seja utilizada para a sua identificação e caracterização (Slabbinck *et al.*, 2009).

A maioria dos protocolos de extracção dos ácidos gordos é idêntico ao utilizado no MIDI Microbial Identification System (MIDI, 2012), descrito por Stead (1992). A análise do perfil de ácidos gordos das bactérias habitualmente é feita de acordo com o protocolo descrito por (Stead, 1992), o qual se baseia na análise de ésteres metilados dos ácidos gordos (FAMES) extraídos das células por cromatografia gasosa. Os dados obtidos dos tempos de retenção são comparados com uma solução padrão utilizada, o que permite qualificar e quantificar os ácidos gordos presentes na amostra (Kunitsky *et al.*, 2006). Os dados obtidos são analisados e comparados com uma base de dados contendo perfis de ácidos gordos já conhecidos.

Embora alguns autores reconheçam este método como útil para a identificação e caracterização de espécies e patovares dentro do género *Pseudomonas* (Abelleira *et al.*, 2014), outros reconhecem algumas limitações no que se refere à distinção de espécies deste género (Slabbinck *et al.*, 2009). De qualquer forma é um método amplamente utilizado e com interesse para o conhecimento aprofundado das bactérias.

O perfil dos ácidos gordos de *Psa* ainda não está incluído no sistema MIDI para comparação, no entanto, existem já trabalhos publicados por Abelleira *et al.* (2014) em que numerosas estirpes de *Psa* foram analisadas, tendo sido identificado um “pico” distintivo para o ácido gordo monosaturado 18:1 ω 7c (Abelleira *et al.*, 2014).

1.5.4. Caracterização molecular

1.5.4.1. Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR - Polymerase chain reaction) consiste na amplificação enzimática de sequências específicas de ácidos nucleicos do ADN, para que seja produzida uma quantidade de produto amplificado que possa ser analisado (Coleman, 2007). O conceito surgiu pela primeira vez em 1985 e a técnica foi publicada em 1988 por Saiki e seus colaboradores que envolve a amplificação enzimática *in vitro* de milhões de cópias de segmentos específicos de ADN na presença da enzima termoestável ADN polimerase (*Taq*), isolada de *Thermus aquaticus*. É um procedimento fácil, rápido, versátil, sensível e específico, amplamente utilizado em fitopatologia (Moura, 2005).

Para implementar este procedimento é necessário incluir na mistura de reação não só o ADN a estudar, mas também os oligonucleótidos específicos (*primers*), desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP), e uma polimerase do ADN termoestável (para resistir às flutuações de temperatura necessárias para realizar as várias fases da reação). Na prática, outros componentes são também adicionados, para que as condições de reação sejam as ideais para a enzima utilizada, como é o MgCl₂.

A primeira fase do processo de PCR é denominada por “desnaturação” e consiste na desnaturação da cadeia dupla de ADN por temperatura elevada (normalmente aproximada a 95°C), tornando assim a região a amplificar disponível para os *primers*. Na segunda fase a temperatura diminui e ocorre a “hibridação dos *primers*” nos locais de complementaridade que delimitam a sequência de ADN alvo. Durante a terceira etapa ocorre a “extensão dos *primers*” em que é sintetizado ADN a partir dos *primers*, e formam-se novas cadeias de ADN. Com a repetição do ciclo descrito, a sequência de ADN de interesse é amplificada exponencialmente, uma vez que a sequência formada numa etapa serve de molde para a seguinte (Walker e Rapley, 2009)

As técnicas moleculares por PCR, assumem um papel central na deteção de Psa devido, por um lado, à importância da rápida deteção da bactéria, para

implementação de medidas fitossanitárias, no caso de serem identificadas plantas provenientes de pomares infetados, como pela necessidade de controlar a disseminação da doença. Por outro lado, os métodos fisiológicos e bioquímicos parecem ser insuficientes e lentos para uma identificação inequívoca, facto que é agravado por coexistirem frequentemente várias espécies e patovares de *Pseudomonas* em actinídea com características e sintomas semelhantes aos causados por Psa, mas que não necessitam das mesmas intervenções exigidas e necessárias para Psa (Koh e Nou, 2002; Balestra *et al.*, 2013).

1.5.4.2. Identificação molecular de *P. syringae* pv. *actinidiae*

Tendo em vista a identificação de Psa, Koh e Nou (2002) desenharam um par de *primers* designados KN-F e KN-R, com as sequências 5'-CACGATACATGGGCTTATGC-3' e 5'-CTTTTCATCCACACACTCCG-3' respetivamente. Este par de *primers* produz um fragmento de 492 pares de bases (Koh e Nou, 2002) e constituiu um grande passo para a identificação de Psa. No entanto, este método não é específico para Psa, pois amplifica o mesmo fragmento em estirpes de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, de *P. s.* pv. *theae* (Rees-George *et al.*, 2010) e de *P. s.* pv. *tomato* (Biondi *et al.*, 2013).

Trabalhos desenvolvidos por Rees-George *et al.* (2010) permitiram, mais tarde, publicar 3 pares de *primers* desenhados com base na região variável 16S-23S rRNA ITS que podem ser utilizados para o estudo de Psa:

P.s. ITSF1/R2 (5'-GTGATTCATGACTGGGGTGA-3' e 5'-ATAACCCCAAGCAATCTGGT-3');

PsaF1/R2 (5'-TTTTGCTTTGCACACCCGATTTT-3' e 5'-CACGCACCCTTCAATCAGGATG-3');

PsaF3/R4 (5'-ACCTGGTGAAGTTGGTCAGAGC-3' e 5'-CGCACCCCTTCAATCAGGATG-3'). O par de *primers* "PsaF1/R2" produz um fragmento de 280 pares de bases e o par de *primers* "PsaF3/R4" um fragmento de 175 pb para estirpes de Psa e *P. s.* pv. *theae*. Enquanto vários autores reportaram resultados positivos na identificação de Psa utilizando estes pares de *primers* (Vanneste *et al.*, 2010; Abelleira *et al.*, 2014), outros autores (Rees-George *et al.*, 2010) encontraram problemas em amplificar algumas estirpes isoladas na Coreia, nos Estados Unidos da América e em Itália

(estripes isoladas durante o surto de 1992). Recentemente, Vanneste (2013b) descreve que desde 2010 estes *primers* amplificam fragmentos de igual tamanho em outras patovares como *P. s. pv. avellanea*, *P. s. pv. passiflorae* e *P. s. pv. morsprunorum*. Apesar destes resultados, é um protocolo bastante utilizado na identificação de Psa (Everett *et al.*, 2011; Vanneste *et al.*, 2011a; Renzi *et al.*, 2012b; Vanneste *et al.*, 2012; Vanneste *et al.*, 2013a; Abelleira *et al.*, 2014; Cunty *et al.*, 2014), e indicado pela EPPO (2014) para a sua deteção, tendo em conta que as patovares também detetadas com este par de *primers* provavelmente não estarão presentes em actínídea.

As tentativas para melhorar a especificidade do PCR na identificação de Psa continuaram, e em 2011 Gallelli e seus colaboradores desenvolveram um protocolo de Duplex-PCR que utilizara o par de *primers* AvrDdpx-F/R (5'-TTTCGGTGGTAACGTTGGCA-3' e 5'-TTCCGCTAGGTGAAAAATGGG-3' respetivamente) e um segundo par de *primers* (KN-F e KN-R) já anteriormente desenhado por Koh e Nou em 2002. Com estes *primers*, é obtida a amplificação simultânea de 2 fragmentos de 226 pb e 492 pb apenas para estirpes de Psa. No caso de estirpes de *P. s. pv. theae* e *P. s. pv. tomato* apenas é amplificado o fragmentos de 492 pb, e no caso de *P. avellanae* apenas se obtém o fragmento de 226 pb (Gallelli *et al.*, 2011a). Este método, já testado por diversos autores (Abelleira *et al.*, 2014; Cunty *et al.*, 2014; Ferrante e Scortichini, 2014), consta também nos protocolos de deteção de Psa recomendados pela EPPO (EPPO, 2014). Apresenta ainda as vantagens de poder ser utilizado diretamente em tecidos de actínídea infetados com sintomas da doença ou assintomáticos. Para tal, o ADN é extraído recorrendo a um kit comercial de extração de ADN (Gallelli *et al.*, 2011a). Adicionalmente, Cunty e seus colaboradores referem, recentemente, que nas estirpes da patovar *P. s. pv. actinidifoliorum* apenas é amplificado o fragmento de 492 pb, permitindo assim a sua distinção das estirpes de Psa (Cunty *et al.*, 2014).

Um protocolo de Multiplex-PCR descrito por Balestra *et al.* (2013) permite detetar estirpes de Psa e simultaneamente identificar a sua origem geográfica. Para tal utilizam-se 4 pares de *primers*:

Psa-F/R (5'- CAGAGGCGCTAACGAGGAAA-3' e 5'- CGAGCATACATCAACAGGTCA-3'), **Europe-F/R** (5'- TGGTGATCGTCTGGATGTGT-3' e 5'- ATTATGCTCCTGGCTCATGG-3'),

J/K-F/R (5'- AGCAACGGTGGTTTGTTC-3' e 5'- AAATGTTTGCCAGCCAAGTC-3') e

China-F/R (5'- GGAGTTCCAGCAACTGACG-3' e 5'- CGCTCAAGATCCTTTTCCAT-3'). O par de *primers* Psa-F/R foi desenhado para amplificar uma porção do gene *hopZ3* conservada para todas as estirpes de Psa completamente sequenciadas até então, e distinta das outras patovares relacionadas, amplificando um fragmento de 311 pb apenas para estas estirpes de Psa. Os restantes *primers* foram desenhados para amplificar uma região dentro da ilha genómica PPHGI-1, identificada como distinta nas estirpes de diferentes origens. O par de *primers* Europe-F/R foi descrito pela primeira vez por Mazzaglia e colaboradores em 2012 e permite a amplificação de uma região apenas presente em estirpes de Psa associadas ao atual surto da doença na Europa, originando um fragmento com 733pb (Mazzaglia *et al.*, 2012). Para a amplificação de uma região do genoma presente apenas nos genomas sequenciados de estirpes de Psa isoladas no Japão e na Coreia, foi desenhado o par de *primers* J/K-F e J/K-R que amplifica um fragmento de 254 pb. Por último, o par de *primers* China-F e China-R foi desenhado para amplificar um fragmento de 609pb apenas para estirpes de Psa isoladas na China. Este método também pode ser utilizado para deteção de Psa e identificação da sua origem diretamente a partir de tecidos sintomáticos de actínídea, fazendo com que possa ser útil na deteção do patogéneo (Balestra, *et al.*, 2013).

Com o objetivo de desenvolver um método de PCR específico para detecção de Psa e suficientemente sensível para o fazer diretamente a partir de material vegetal sintomático e assintomático, Biondi *et al.* (2013) desenharam o par de *primers* B1 e B2 (5'-GTGATTATCGGCACTGACGG-3' e 5'-CAAGCACACCATTGGTCATTGA-3') que amplifica uma parte do gene *ompP1* que codifica a proteína membrana PI. Com este par de *primers* é amplificado um fragmento de ADN com 631pb apenas para estirpes de Psa, podendo no entanto amplificar fragmentos com cerca de 500 pb para outras patovares relacionadas.

Mais recentemente, um outro protocolo de multiplex PCR foi desenvolvido por Koh e colaboradores (2014) com o objetivo de identificar e distinguir uma população de Psa recentemente isolada na Coreia, geneticamente distinta das já identificadas neste país, que se aproxima da população Psa 3 presente em Itália. Assim, foi desenvolvido um par de *primers* TacF/R que apenas amplifica um fragmento de 545 pb para estirpes italianas (Psa 3) e para as novas estirpes detetadas na Coreia. Este novo par de *primers* em conjunto com o par de *primers* PsaF/PsaR (Balestra *et al.*, 2013), permitem não só identificar estirpes de Psa (com a amplificação de um fragmento de 311 pb), como também distinguir as duas populações que se encontram na Coreia, apresentando simultaneamente 2 fragmentos de 545 e 311 pb apenas para a população mais recentemente identificada e para estirpes de Psa 3 italianas (Koh *et al.*, 2014).

1.5.4.3. Amplificação múltipla definida (rep-PCR)

Na técnica rep-PCR recorre-se a *primers* complementares de sequências de ADN altamente conservadas, repetidas e dispersas no genoma de bactérias. Podem ser referidas 3 famílias destas sequências, a sequência REP (“Repetitive Extragenic Palindromic”) de 35-40 pb, a sequência ERIC (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) e o elemento BOX 154 pb (Louws *et al.*, 1994). Com esta técnica são obtidos perfis de fragmentos de ADN característicos, em que as diferenças dos tamanhos das bandas obtidas representam polimorfismo nos genomas bacterianos, sendo bastante útil na identificação e classificação de bactérias,

permitindo distinguir espécies, patovares ou biovares (Moura, 2005; Marques *et al.*, 2008).

A amplificação múltipla definida por BOX-PCR, tem sido bastante utilizada na caracterização e comparação entre estirpes de Psa (Ferrante *et al.*, 2012; Marcelletti *et al.*, 2011; Stefani *et al.*, 2011; Vanneste *et al.*, 2010; Vanneste, *et al.*, 2011a), constando inclusivamente no documento publicado pela EPPO em 2014 para identificação do patógeno (EPPO, 2014).

1.5.5. Sequenciação de ADN

A sequenciação de ADN de genes é uma ferramenta bastante importante tanto para a elaboração de *primers* específicos que poderão ser úteis para a identificação e caracterização das bactérias fitopatogénicas, como para estudos mais aprofundados de diversidade genética entre espécies, patovares, biovares ou mesmo entre estirpes. Como exemplo referem-se os *primers* desenhados por Balestra e seus colaboradores a partir de uma parte do gene *hopZ3*. Por comparação com o mesmo gene de outras estirpes relacionadas com Psa concluiu-se que a sua sequência de ADN é distinta, permitindo assim identificar as estirpes de Psa.

No estudo evolutivo das bactérias são considerados especialmente dois grupos de genoma: o chamado genoma “core”, que consiste em genes que geralmente codificam proteínas essenciais para a sobrevivência da bactéria, pouco variáveis dentro de estirpes da mesma espécie, e não sendo por isso normalmente alvo de transferência horizontal de genes; e o chamado genoma “flexível” que habitualmente codifica proteínas responsáveis por adaptações ao meio, incluindo genes associados à virulência ou à resistência, que variam com frequência dentro de estirpes da mesma espécie e são alvo de transferência horizontal de genes (Sarkar e Guttman, 2004). No estudo de Psa, foram já sequenciados vários genes que mostram diferenças entre estirpes da mesma patovar, permitindo assim distinguir diferentes populações, nomeadamente o gene *cts* e o gene *ompP1*. Para

além destes, também genes envolvidos na resistência das bactérias a tratamentos à base de cobre e à estreptomicina foram estudados (Mellano e Cooksey, 2004).

1.6. Objetivos

Atualmente são conhecidas três populações de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa1, Psa2 e Psa3). A população anteriormente designada por Psa4 foi recentemente reclassificada como uma nova patovar, denominada *P. s.* pv. *actinidifoliorum* pv. nov., sendo no entanto referida como “Psa4” no decorrer deste trabalho. Estas populações estão presentes em diferentes países produtores de kiwi e têm agressividades distintas, causando prejuízos também distintos, pelo que é importante conhecer a prevalência das populações de Psa numa região ou país. Este trabalho tem por objetivo identificar e estudar a estrutura de populações de Psa na Região do Entre Douro e Minho (EDM) onde a produção de kiwi tem grande importância económica.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção da uma coleção de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

A obtenção da coleção de bactérias de Psa foi feita através da análise de amostras de folhas, ramos, flores e caules evidenciando sintomas típicos da doença, obtidas a partir de plantas masculinas e femininas de diferentes cultivares de actinídea. As amostragens foram realizadas durante os anos de 2013 e 2014 em pomares de diferentes idades, localizados em vários concelhos da região do Entre Douro e Minho. A análise do material vegetal e os isolamentos foram realizados nos laboratórios da Escola Superior Agrária/IPVC e da Estación Fitopatológica do Areeiro, Pontevedra.

Dos isolados obtidos, e considerando o ano do isolamento, a cultivar, a localização geográfica dos pomares e a parte da planta utilizada, foram selecionados para este estudo 23 isolados (Quadro 2). Adicionalmente, incluíram-se neste estudo a estirpe tipo de Psa CFBP 4909^T, e as estirpes K-Psa2, CFBP 7286, 10627 e 10880, descritas no Quadro 3.

Quadro 2 - Origem dos isolados portugueses obtidos a partir de material vegetal com sintomas do cancro da actinídea.

Isolado	Origem	Cultivar	Zona da Planta	Ano de isolamento
AL 9		Tsechelidis (♀)	Caule	
AL 13		Tsechelidis (♀)	Folha	2013
AL 14		Chieftain (♂)	Folha	
AL 114a	Amares, Lago	Chieftain (♂)	Folha	
AL 114b		Chieftain (♂)	Folha	
AL 115		Tsechelidis (♀)	Folha	2014
AL 116b		Tsechelidis (♀)	Folha	
Am 63	Amares	-	Folha	2013
B 65	Braga	-	Caule	2013
F 12	Famalicão	Hayward (♀)	Folha	2013
Fv 46	Felgueiras - Várzea	Chieftain (♂)	Ramos	2013
Fv 62		Matua (♂)	Folha	
P 18		-	Caule (sistema vascular)	
P 84	Prado	-	Folha	2013
P 93		-	Folha	
P 85		-	Folha	
Pn 16		Penafiel	Hayward (♀)	
VC 104b	Vila do Conde	Hayward (♀)	Folha	2013
VV 112	Vila Verde- Coucieiro	Hayward (♀)	Folha	2014
VV 113		Tomuri (♂)	Folha	
VM 568.1	Valença do Minho	-	Folha	2014
VM 538.2		Erica (♀)	Folha	
MC 589	Marco de Canavezes	Hayward (♀)	Folha	2014

- : sem informação; ♀ : planta feminina; ♂ : planta masculina

Quadro 3. Origem das estirpes de Psa isoladas noutros países produtores de kiwi.

Estirpe	Hospedeiro	Origem	Ano	População	Referência
CFBP 4909^{T*}	<i>Actinidia deliciosa</i>	Japão	1984	Psa1	Le Saux, 2006a
K-Psa2	<i>Actinidia</i> sp.	Coreia	-	Psa2	Vanneste <i>et al.</i> , 2013
10627	<i>A. chinensis</i>	Nova Zelândia (Te Puke)	2010	Psa3	Vanneste <i>et al.</i> , 2013
CFBP 7286	<i>Actinidia chinensis</i> cv. HORT16A	Itália	2008	Psa3	Le Saux, 2006b
10880	<i>A. chinensis</i>	Nova Zelândia (Motueka)	2010	Psa4	Vanneste <i>et al.</i> , 2013

CFBP = CIRM-Collection Française de Bactéries associées aux Plantes / CIRM-CFBP, UMR 1345 IRHS (Institut de Recherche en Horticulture et Semences), 49071 Angers, France. **ICMP** = International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Private Bag 92170, Auckland 1142, New Zealand; **NCPPB** = National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Central Science Laboratory, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Sand Hutton, York, YO4 1LW, United Kingdom;

^T Estirpe tipo da patovar

* designação noutras coleções de culturas: ICMP 9617 e NCPPB 3739

2.1.1. Extração e isolamento de bactérias

Foram selecionadas pequenas porções de tecidos de folhas, ramos ou flores, apresentando sintomas da doença (Figura 6-A). Os tecidos foram desinfetados externamente com etanol a 95%, macerados em 5 ml de água destilada esterilizada e, posteriormente, cerca de 50 µl da suspensão bacteriana obtida foi inoculada em meio B de King modificado (Mohan e Schaad, 1987) (Anexo I-1). As placas foram incubadas a 28°C e observadas após 24, 48 e 72 horas de incubação (Figura 6-B). As colónias que apresentaram morfologia idêntica à descrita para Psa foram repicadas em meio B de King (King *et al.*, 1954) (Anexo I-2), até se obterem culturas puras.

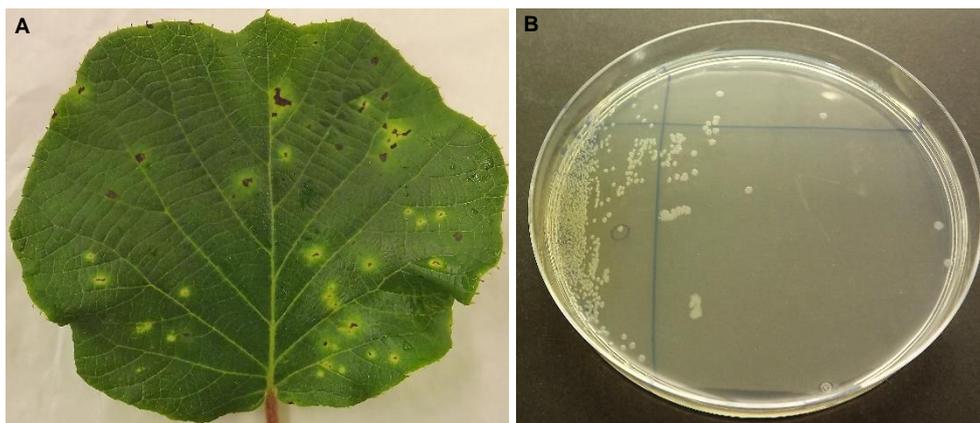


Figura 6. Folha com sintomas de Psa (A) e colônias de Psa após 72 horas de incubação a 28°C em meio B de King modificado.

2.1.2. Preservação de culturas bacterianas

A preservação das culturas bacterianas foi feita recorrendo a três métodos diferentes, de acordo com o período de conservação pretendido. Assim, a coleção de trabalho foi mantida em tubos com meio B de King inclinado, e as culturas foram repicadas sempre que necessário. Os tubos foram incubados a 28°C durante 48 horas e posteriormente conservados a 4°C. Para a preservação das culturas a médio prazo, foram inoculadas em tubos com meio GYCA (Anexo I-3) e incubadas durante 48 horas a 28°C. Os tubos foram preenchidos com óleo de parafina esterilizado e conservados a 4°C. Para a preservação das bactérias a longo prazo utilizaram-se tubos estéreis com anéis porosos para preservação de estirpes microbianas “Cryoinstant Mixed” (VWR® - We Enable Science) que foram armazenados a -70°C.

2.2. Caracterização morfológica e cultural

As características morfológicas e culturais das colônias foram analisadas ao fim de 48 horas do seu crescimento a 28°C em meio B de King (King, *et al.*, 1954), no que respeita à sua forma, consistência, tamanho, relevo, contornos das colônias, cor, transparência, brilho e presença/ausência de pigmentos difusíveis.

Na caracterização da parede celular utilizou-se o método do KOH a 3% (Suslow, 1982) (Anexo I-4), em alternativa ao método de coloração de Gram.

2.3. Caracterização bioquímica dos isolados

Caracterizaram-se as 23 estirpes descritas no Quadro 2, a estirpe tipo de Psa (CFBP 4909^T) e a estirpe italiana CFBP 7286 (população Psa3). Para tal, foram efetuados os testes LOPAT (Lelliott *et al.*, 1966) (Anexo I-5 a 8): produção de levana, oxidase, dihidrólise da arginina, atividade pectinolítica e reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco.

Analizou-se a capacidade para a utilização de fontes de carbono (açúcares, álcoois, aminoácidos e ácidos orgânicos), determinaram-se propriedades fisiológicas (sais, pH e tolerância ao ácido láctico), o poder redutor e a sensibilidade química através do Sistema Biolog (Biolog, 2011). O sistema Biolog permite identificar microrganismos com base nas suas características bioquímicas. O sistema de identificação microbiana (*Biolog Microbial ID System*) permite a identificação de mais de 2500 espécies de bactérias aeróbicas e anaeróbicas, leveduras e fungos. Este sistema baseia-se em 94 diferentes testes fenotípicos que, em conjunto, formam como que uma “impressão digital” metabólica do organismo. Neste momento, o teste “GEN III”, para além de analisar a capacidade das células metabolizarem as principais classes de produtos bioquímicos, determina outras importantes propriedades fisiológicas como o pH, tolerância ao ácido láctico, poder de redução e sensibilidade química (Biolog, 2011).

Este sistema compreende microplacas que já vêm preparados com todos os componentes necessários e com um indicador redox tetrazólico usado para indicar colorimetricamente a utilização de fontes de carbono ou resistência aos químicos inibitórios. Depois de inoculadas com a suspensão do microrganismo de interesse, estas vão a incubar para que ocorra o aumento de respiração nos poços onde as células podem utilizar a fonte de carbono e/ou crescer. Caso o microrganismo utilize a fonte de carbono disponível e, assim, ocorra respiração, ocorre a redução do

indicador redox tetrazólio, aparecendo uma cor púrpura. Por outro lado, os poços com resultado negativo e o controlo negativo (sem fonte de carbono) permanecem incolores (Anexo II). Existe também o controlo positivo, localizado no poço A-10, que é usado como uma referência para os ensaios de sensibilidade química nas colunas 10 a 12. Assim, após a incubação, é feita a leitura dos resultados dos poços com coloração púrpura utilizando um leitor de placas automático e esta é comparada com as presentes na base de dados do sistema Biolog. Caso seja encontrada uma correspondência, é feita uma identificação ao nível da espécie (Biolog, 2008).

As amostras presentes no Quadro 2 foram analisadas utilizando microplacas “GEN III”. Estas foram inoculadas utilizando o fluido de inoculação “IF-A”, no qual se incorporou previamente uma suspensão bacteriana, seguindo as recomendações do fabricante. As microplacas inoculadas foram incubadas a 28°C e a absorvância (590 nm) lida e registada após 24, 48 e 72 horas utilizando a Micro Estação ID System e o *software* MicroLog™. Os resultados obtidos foram analisados recorrendo ao *software* Past 3.04. A comparação dos isolados bacterianos estudados utilizou o coeficiente de Correlação (Bartko, 1966), e uma classificação hierárquica ascendente pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages*) (Sneath e Sokal, 1973).

2.4. Caracterização dos ácidos gordos

Para a caracterização bacteriana utilizando a análise dos ácidos gordos seguiu-se o método descrito por Stead (1992) para espécies de *Pseudomonas*. As culturas bacterianas utilizadas neste processo foram repicadas duas vezes no meio TSBA (*trypticase soy broth agar*) (Anexo I-9), incubadas durante 48 horas a 28°C, e aproximadamente 50 mg de células foram transferidas para tubos de ensaio tapados. Os lípidos celulares foram saponificados e os ácidos gordos foram metilados, extraídos e purificados (Figura 7).

A etapa de saponificação iniciou-se com a adição de 1 ml do reagente de saponificação (Anexo I-10), seguido de agitação e incubação a 95-100°C durante 5 minutos. Os tubos de ensaio foram arrefecidos, agitados e novamente incubados a 95-100°C durante 25 minutos. Na etapa de metilação, a cada tubo de ensaio foram adicionados 2 ml do reagente de metilação (Anexo I-11), agitados e aquecidos a 80°C durante 1 minuto, seguido de arrefecimento à temperatura ambiente. O procedimento de extração consistiu em colocar 1,25 ml de solvente de extração (Anexo I-12) em cada tubo, agitação durante 10 minutos, recolhendo-se a fase aquosa inferior. Para a purificação dos ácidos gordos, foram adicionados 3 ml da base de lavagem (Anexo I-13), colocaram-se os tubos no agitador rotativo durante 5 minutos, centrifugaram-se durante 3 minutos e a fase orgânica (superior) foi transferida para um frasco de amostragem.

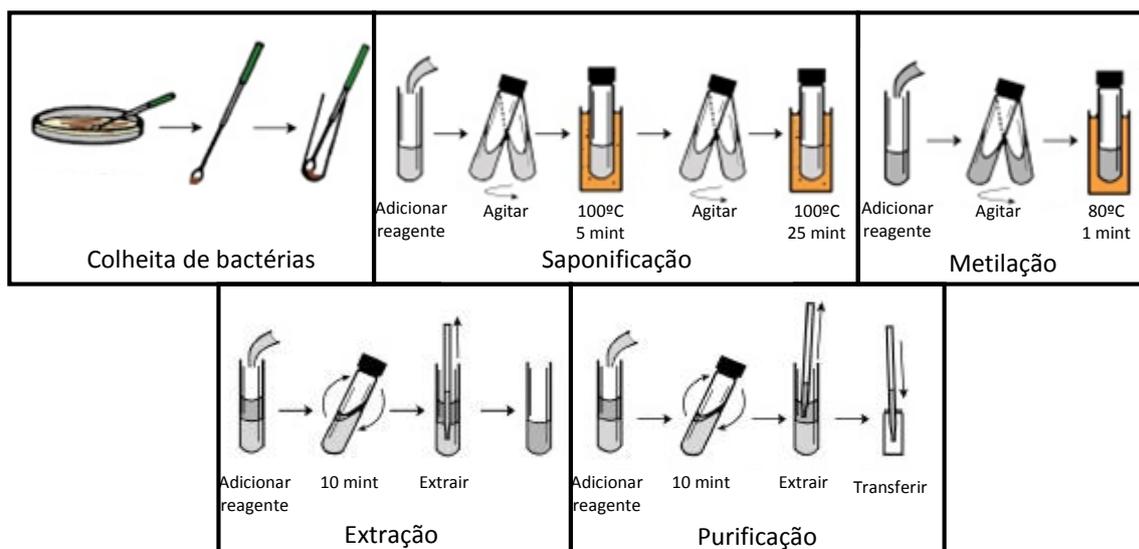


Figura 7. Esquema representativos etapas seguidas na preparação das amostras para a análise de ácidos gordos por cromatografia de fase gasosa. (adaptado de MIDI Inc., 2012).

A quantificação foi feita recorrendo a um cromatógrafo de fase gasosa Hewlett Packard 6890 e a identificação dos picos obtidos foi feita usando o Sistema MIDI v. 5 (*System for Microbiological Identification Sherlock* (MIDI, 2012)).

2.5. Identificação e caracterização molecular

2.5.1.Extração de ADN

A lise bacteriana para a realização das amplificações por PCR foi feita utilizando culturas bacterianas em meio B de King incubadas durante 48 horas a 28°C. Prepararam-se suspensões bacterianas com uma concentração de 10^8 UFC ml⁻¹ (DO₆₀₀=0,5) numa solução de 10% de NaOH a 0,5M. As suspensões foram colocadas a 95°C durante 15 minutos, e de seguida colocadas no frigorífico a 4°C até utilização nas reações de amplificação.

2.5.2.Amplificação por PCR

2.5.2.1. Identificação molecular de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

Para a identificação molecular de Psa foi utilizado o par de *primers* PsaF1/PsaR2 descrito por Rees-George *et al.* (2010) e o protocolo *Duplex-PCR* descrito por Gallelli e seus colaboradores (2011a).

2.5.2.1.1. Amplificação por PCR utilizando os *primers* PsaF1/PsaR2

O par de *primers* utilizado PsaF1 (5'-TTTTGCTTTGCACACCCGATTTT-3') e PsaR2 (5'-CACGCACCCTTCAATCAGGATG-3'), descritos por Rees-George e colaboradores (2010), permite a amplificação do gene *ITS*, conduzindo à amplificação de um fragmento de 280 pb.

A reação de amplificação de cada isolado decorreu num volume final de 25 µL, constituída por 2,5 µl de KAPA Taq Buffer (1,5mM), 2,5 µl de dNTPs (2mM), 0,1 µl Taq DNA polimerase (Kapa Biosystems, Inc.), 1,3 µl de cada *primer* a 10 µM, 1 µl

de suspensão contendo ADN e 16,3 µl de água ultrapura estéril. Como controlo positivo da reação PCR foram incluídas sistematicamente em cada série de amplificações as estirpes de referência isoladas em Itália (CFBP7286), e no Japão (CFBP 4909^T). Uma testemunha negativa, em que o ADN foi substituído por água ultrapura esterilizada, esteve sempre contemplada, tendo por objetivo verificar a ausência de contaminações por ADN exógeno. As amplificações foram feitas utilizando um amplificador Biometra ou um amplificador Perkin Elmer 2400. O programa utilizado consistiu num ciclo inicial de 95°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 65°C e 30 segundos a 72°C, terminando com um ciclo de 5 minutos a 72°C (Rees-George *et al.*, 2010).

2.5.2.1.2. Amplificação por *Dúplex-PCR* utilizando os primers KN-F/KN-R e AvrDdpx-F/ AvrDdpx-R

A amplificação por *Duplex-PCR* foi realizada utilizando os dois pares de *primers* KN-F (5'-CACGATACATGGGCTTATGC-3'), KN-R (5'-CTTTTCATCCACACACTCCG-3') desenhados por Koh e Nou (2002) e AvrDdpx-F (5'-TTTCGGTGGTAACGTTGGCA-3'), AvrDdpx-R (5'-TTCCGCTAGGTGAAAAATGGG-3') descritos por Gallelli e colaboradores (2011a), que conduzem à amplificação de dois fragmentos de 492 e 226 pb, respetivamente.

Para um volume final da reação de 25 µl, foi utilizado 2,5 µl de KAPA Taq Buffer (1,5mM), 2,5 µl de dNTPs (2mM), 1,25 µl de cada *primer* KN-F e KN-R, 1 µl de cada *primer* AvrDdpx-F e AvrDdpx-R, 0,25 µl de Taq DNA polimerase (Kapa Biosystems, Inc.), 1 µl de suspensão contendo ADN e 14,25 µl de água ultrapura estéril. Como controlo positivo e negativo da reação PCR, seguiu-se o procedimento descrito no ponto anterior.

As amplificações foram feitas utilizando um amplificador Biometra ou um amplificador Perkin Elmer 2400, com o programa de amplificação consistindo num ciclo inicial de 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a

63°C e 50 segundos a 72°C, terminando com um ciclo final de 5 minutos a 72°C (Gallelli *et al.*,2011a).

2.5.2.2. Caracterização molecular de isolados de Psa

A caracterização molecular dos isolados (Quadro 2) foram realizados utilizando os pares de *primers* e os protocolos referidos seguidamente nos Quadro 4 a 6. Foram caracterizadas molecularmente as 23 estirpes referidas anteriormente, tendo sido utilizados os protocolos publicado por Balestra e colaboradores (2013), Biondi e colaboradores (2013), Ferrante e Scortichini (2010), Ferrante e Scortichini (2009), Louws e colaboradores (1994), Rees-George e colaboradores (2010); Sarkar e Guttman (2004) e Templeton e colaboradores (2005).

Quadro 4. Sequência dos *primers* utilizados, região amplificada e tamanho dos fragmentos amplificados.

<i>Primer</i>	<i>Gene / Região amplificada</i>	<i>Tamanho do produto amplificado (pb)</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>Referência</i>
Psa F Psa R	<i>hopZ3</i>	311	CAGAGGCGCTAACGAGGAAA CGAGCATACATCAACAGGTCA	
Europe F Europe R	PPHGI-1	733	TGGTGATCGTCTGGATGTGT ATTATGCTCCTGGCTCATGG	Balestra et al., 2013
China F China R	PPHGI-1	609	GGAGTTCAGCAACTGACG CGCTCAAGATCCTTTTCCAT	
J/K F J/K R	PPHGI-1	254	AGCAACGGTGGTTTGTTC AAATGTTGCCAGCCAAGTC	
Psa F3 Psa R4	16–23S rRNA gene ITS	175	ACCTGGTGAAGTTGGTCAGAGC CGCACCTTCAATCAGGATG	Rees-George et al., 2010
P.s. ITSF1 P.s. ITS R2	16S–23S rRNA	880	GTGATTCATGACTGGGGTGA ATAACCCCAAGCAATCTGGT	
B1 B2	<i>ompP1</i>	631	GTGATTATCGGCACTGACGG CAAGCACACCATTGGTCATTGA	Biondi et al., 2013
cts-Fp cts-Rp	<i>cts</i>	530	AGTTGATCATCGAGGGCGCWGCC TGATCGGTTTGATCTCGCACGG	Sarkar e Guttman, 2004
ArgK-F3 ArgK-R	<i>tox-argK</i>	800	TCCCCCGGGAGGAAATTC AATGAA GATTA AACTGCAGTCAGGGGACGACTGTCT C	Templeton et al., 2005
CFLF CFLR	<i>cfl</i>	650	GCGCTCCCTCGCACTT GGTATTGGCGGGGGTGC	Bereswill et al., 1994
avrD1-F avrD1-R	<i>avrD1</i>	581	CGATGGTTTCAAACATGTGG TGTGCGTGACTGACAAGTGA	Ferrante e Scortichini, 2010

Quadro 5. Condições químicas das reações de amplificação num volume total de 25 µl

Primers	Reagentes	Volume (µl)	Referência
Psa F/R Europe F/R China F/R Japan/Korea F/R	Master Mix	12,5	Balestra <i>et al.</i> , 2013
	PsaF / R (10µM)	0,375 (x2)	
	EuropeF / R (10µM)	1 (x2)	
	ChinaF / R (10µM)	0,75 (x2)	
	J/K-F / R (10µM)	0,75 (x2)	
	ADN	1	
Psa F3 Psa R4	H ₂ O	16,3	Rees-George <i>et al.</i> , 2010
	KAPA Taq Buffer	2,5	
	dNTPs (2mM)	2,5	
	PsaF3 / R4 (10µM)	1,3 (x2)	
	Taq	0,1	
	ADN	1	
P.s. ITSF1 P.s. ITS2	H ₂ O	16,3	Rees-George <i>et al.</i> , 2010
	KAPA Taq Buffer	2,5	
	dNTPs	2,5	
	P.s. ITSF1 / R2	1,3 (x2)	
	Taq	0,1	
	ADN	1	
B1 B2	H ₂ O	11,5	Biondi <i>et al.</i> , 2013
	KAPA Taq Buffer	5	
	dNTPs	5	
	B1 / B2	1 (x2)	
	Taq	0,5	
	ADN	1	
cts-Fp cts-Rp	H ₂ O*	23	Sarkar e Guttman, 2004
	cts-Fp / Rp	0,5 (x2)	
	ADN	1	
ArgK-F3 ArgK-R	H ₂ O*	23	Templeton <i>et al.</i> , 2005
	ArgK-F3 / R	0,5 (x2)	
	ADN	1	
CFLF CFLR	H ₂ O**	38,8	Bereswill <i>et al.</i> , 1994
	KAPA Taq Buffer	5	
	MgCl ₂ (50mM)	1,5	
	dNTPs (10mM)	0,5	
	CFLF / R	2 (x2)	
	Taq	0,2	
avrD1-F avrD1-R	H ₂ O*	18	Ferrante e Scortichini, 2010
	avrD1-F / R	0,5 (x2)	
	ADN	1	

* Utilização da mistura de reagentes comercial “puReTaq Ready-To-Go PCR Beads”.

** Volume total da reação: 50 µl

Quadro 6. Condições físicas das reações de amplificação

Reação	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos	Referência
Psa F/R	95	10'	40	Balestra <i>et al.</i> , 2013
Europe F/R	95	30''		
China F/R	60	30''		
Japan/Korea	72	75''		
F/R	72	5'		
	95	2'	30	Rees-George <i>et al.</i> , 2010
Psa F3	95	30''		
Psa R4	65	30''		
	72	30''		
	72	5'		
	95	3'	40	
P.s. ITSF1	94	1'		
P.s. ITSR2	55	1'		
	72	2'		
	72	10'		
	94	5'	35	Biondi <i>et al.</i> , 2013
B1	94	20''		
B2	57	20''		
	72	30''		
	72	10'		
	94	5'	30	Sarkar e Guttman, 2004
cts-Fp	94	2'		
cts-Rp	56	1'		
	72	1'		
	72	10'		
	95	2'	30	Templeton <i>et al.</i> , 2005
ArgK-F3	95	30''		
ArgK-R	65	30''		
	72	30''		
	72	5'		
	93	2'	37	Bereswill <i>et al.</i> , 1994
CFLF	93	1'		
CFLR	67	2'		
	72	2'		
	72	10'		
	95	5'		Ferrante e Scottichini, 2010
avrD1-F	95	1'		
avrD1-R	58	30''		
	72	1'		
	72	5'		

' : minutos; '' : segundos

2.5.3. Eletroforese de fragmentos de ADN

As ampliações obtidas por PCR realizadas no laboratório da ESAPL, foram observadas através da migração de 8 µl de produto PCR adicionados de 2 µl de tampão de carga (Anexo I-14). A eletroforese decorreu em gel de agarose a 1,5% (w/v) (Anexo I-15), preparado em tampão TBE 0,5x (Tris-Borato-EDTA (Sambrook *et al.*, 1989) ao qual se adicionou uma solução de “GelRed Nucleic Acid Stain, 3x in water”. Em cada gel incluiu-se uma escala de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Anexo I-21).

A migração realizou-se a corrente constante (75V) durante aproximadamente 90 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados com luz ultra violeta (Sambrook *et al.*, 1989) e as imagens fotografadas e guardadas para análise.

Nas electroforeses realizadas no laboratório da EFA, utilizou-se um gel de agarose a 2% (w/v) (Anexo I-16), tendo sido depositado em cada poço 5µL de produto de PCR e 2,5µL de tampão de carga (Anexo I-18). Como escala de tamanho molecular foi utilizado “100 bp DNA Ladder RTU” (Anexo I-22). A eletroforese realizou-se a corrente constante de 130V durante aproximadamente 35 minutos numa tina da marca “Wide Mini-Sub Cell GT Cell” da marca Bio Rad ligada à fonte de energia “VWR® Power Supplies 300V”. Os produtos de amplificação foram corados por imersão do gel numa solução “GelRed Nucleic Acid Stain, 3x in water” (Anexo I-24) durante 30, e visualizados com luz ultra violeta (Sambrook *et al.*, 1989). As imagens foram fotografadas e guardadas para análise.

2.6. Análise da diversidade genética

2.6.1. Análise de sequências repetitivas de ADN por BOX-PCR

Foi utilizado o *primer* BOXA1R (5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), de acordo com o protocolo adaptado de Louws e seus colaboradores (1994). A reação de amplificação decorreu num volume final de 25 µl, tendo sido utilizada a mistura de reagentes comercial “puReTaq Ready-To-Go PCR Beads” (GE Healthcare) com a adição de 15 µl de água ultrapura estéril, 5 µl de *primer* a uma concentração de 10 µM e 5 µl de cada suspensão das estirpes bacterianas em estudo. Foram incluídas na análise da diversidade genética 5 estirpes representativas das 4 populações de Psa: CFBP 4909^T (população Psa1), K-Psa2 (população Psa2), CFBP 7286 e 10627 (População Psa3), e 10880 (população Psa4). Foi também utilizado um controle negativo, utilizando água ultra pura estéril no lugar da suspensão bacteriana, de forma a garantir a ausência de contaminações por ADN exógeno.

As amplificações decorreram num amplificador Perkin Elmer 2400, com o programa que consistiu num ciclo inicial de 7 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C e 8 minutos a 65°C, terminando com um ciclo de 15 minutos a 65°C (Louws *et al.*, 1994).

A eletroforese ocorreu em gel de agarose a 2%, utilizando 5 µl de produto de PCR e 2,5 µl de tampão de carga. Como escala de tamanho molecular em cada gel incluiu-se o marcador “100 bp DNA Ladder H3 RTU” (NIPPON Genetics). A eletroforese realizou-se a corrente constante de 100V durante 1 hora e 35 minutos. Os produtos amplificados foram observados após imersão do gel numa solução “GelRed Nucleic Acid Stain, 3x in water” durante cerca de 30 minutos e visualizados sob luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989). As imagens foram fotografadas e guardadas para análise.

2.6.2. Análise do polimorfismo por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism)

O polimorfismo analisado por RFLP utilizou 10 µl do produto PCR amplificado com os primers B1-B2 descrito no ponto 2.5.2.2, ao qual foi adicionado 0,5 µl da enzima *AluI*. Após 48 horas de incubação, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3% (w/v) (Anexo I-17) utilizando 5 µl de produto de PCR e 2,5 µl de tampão de carga. Como escala de tamanho molecular em cada gel incluíram-se os marcadores 100 bp DNA Ladder H3 RTU” (NIPPON Genetics) e HyperLadder™ 25bp (Bioline Reagents Ltd) (Anexo I-23). A eletroforese realizou-se a corrente constante de 90 V durante 1 hora e 30 minutos. Os produtos amplificados foram observados e registados como descrito anteriormente no ponto 2.5.3.

2.6.3. Sequenciação de ADN amplificado e análise filogenética

Para o estudo de análise filogenética selecionaram-se estirpes representativas das populações em estudo e sequenciaram-se os genes *cts* e *ompP1*. O gene *cts* foi amplificado com os *primers* *cts-Fp* e *cts-Rp*, o produto do PCR foi purificado e sequenciado com o *primer* *cts-Fs*, como descrito por Sarkar e Guttman (2004). Foram sequenciadas todas as estirpes presentes no Quadro 2, com exceção das estirpes AL9, Am63, Fv46 e MC589. No caso do gene *ompP1*, procedeu-se à sua amplificação com o par de *primers* B1 e B2, o produto de PCR foi purificado e sequenciado com o *primer* B1, segundo a descrição de Biondi e colaboradores (2013). Entre as estirpes presentes no Quadro 2, foram sequenciadas as estirpes AL13, AL14, AL114a, AL115, Am63, P84, Pn16, VC104b, VV112 e VV113. As reações de purificação e sequenciação foram feitas de acordo com condições indicadas nos Quadros 7 e 8.

Quadro 7. Condições de reação para purificação e sequenciação de ADN

Reação	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Purificação	37	15'	
	80	15'	
Sequenciação	96	1'	
	96	10'	
	50	5'	24
	60	4'	

Quadro 8. Preparação das reações de purificação e sequenciação.

Reação	Reagentes	Quantidade (µl)
Purificação	Produto da reação de PCR	10 µl
	Us77702V	2 µl
Sequenciação	BigDye Terminator	0,8
	KAPA Taq Buffer	1,7
	Primer (5 µM)	0,5
	Produto purificado	7,5

Ao produto da reação de sequenciação adicionaram-se 80 µl de etanol a 76% deixou-se repousar durante 15 minutos e centrifugou-se a 12000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 180 µl de etanol a 70%, seguido de centrifugação a 12000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi excluído e as amostras foram colocadas a 37°C. As amostras foram depois re-suspendidas em 10 µl de formida e foram colocadas na microplaca a ser lida no sequenciador.

A análise foi feita no sequenciador “3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®)” com o programa “Foundation Data Collection Version 3.0” e os resultados foram posteriormente analisados com o programa “Sequencing Analysis 5.3.1”.

2.6.4. Análise das sequências, alinhamento e árvore filogenética

As sequências obtidas foram comparadas por BLAST nucleotídico no *site* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com sequências já existentes na base de dados “Genebank” com o objetivo de averiguar o seu nível de similaridade.

Foram selecionadas sequências semelhantes dos genes em estudo de estirpes de *Psa* com diferentes origens geográficas e de diferentes populações, bem como de outras *Pseudomonas* existentes no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), presentes no Quadro 9. O alinhamento das sequências foi feito utilizando o programa “BioEdit version 7.0.0” e a conversão para formato FASTA utilizando o programa “ClustalX2”. As árvores filogenéticas foram obtidas através da utilização do método *Neighbor-Joining* e parâmetro Kimura-2 no programa MEGA6 (1000 replicações).

Quadro 9. Estirpes bacterianas utilizadas na análise filogenética, origem geográfica, hospedeiro, ano de isolamento e número de acesso GenBank.

Estirpe	Espécie / Patovar / População	Origem geográfica	Hospedeiro	Ano do isolamento	Nº de acesso GenBank
10627	Psa3	NZ (Te Puke)	<i>A. chinensis</i>	2010	JQ934458.1
10880	Psa4	NZ (Motueka)	<i>A. chinensis</i>	2010	JQ934451.1
10988	Psa4	NZ (Hawke's Bay)	<i>A. chinensis</i>	2010	JQ934477.1
CRA-FRU 3.1	Psa3	Itália (Latina)	<i>A. chinensis</i> - Hort16A	2009	JX297572
CRA-FRU 10.22	Psa3	Latina (Itália)	<i>A. chinensis</i> - Hort16A	2008	FN651804.1
EFA 100.2	Psa3	Espanha (Galiza)	<i>A. deliciosa</i> - Hayward	-	KC210878.1
EFA 103.1	Psa3	Espanha (Galiza)	<i>A. deliciosa</i> - Summer	-	KC210879
CFBP 4909 ^{Ta}	Psa1	Japão	-	1989	FN651801.1
KACC 10584	Psa2	Coreia	<i>A. chinensis</i>	1997	JN683505.1
Korea 2	Psa2	Coreia	<i>Actinidia</i> sp.	-	JQ934486.1
NCPPB 3871	Psa1	Itália	<i>A. deliciosa</i>	1992	FN651799.1
ISPaVe 019	Psa1	Itália	<i>A. deliciosa</i> - Hayward	1992	JX297574
PHS-ER 1875.3	Psa3	Itália	<i>A. chinensis</i>	2009	JX297573
Vanneste ^b	Psa3	-	-	-	-
NCPPB 635 ^c	<i>P. viridiflava</i>	Suíça	<i>Phaseolus</i> sp.	1927	FN565210.1
UMAF 0158	<i>P. s. pv. syringae</i>	Espanha		1993	JX878892.1
NCPPB 1437 ^d	<i>P. cannabina</i>	Hungria	<i>Cannabis sativa</i>	1957	FN565208.1
NCPPB 1873 ^e	<i>P. caricapapayae</i>	Brasil	<i>Carica papaya</i>	1966	FN565209.1
NCPPB 3487 ^f	<i>P. avellanae</i>	Grécia	<i>Corylus avellana</i>	1987	FN565203.1
NCPPB 600 ^g	<i>P. s. pv. coronafaciens</i>	Reino Unido	<i>Avena sativa</i>	1958	FN565202.1
K 93001	<i>P. s. pv. theae</i>	-	-	1993	AY610752.1
CFBP 4097 ^h	<i>P. s. pv. theae</i>	Japão	<i>Camellia sinensis</i>	-	JX297575
NCPPB 2563 ⁱ	<i>P. s. pv. tomato</i>	Reino Unido	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1973	FR863686.1

- : Sem informação; NZ: Nova Zelândia.

Designação noutras coleções de culturas: ^a: ATCC 700536, ICMP 9617, NCPPB 3739; ^c:ATCC 13223, CFBP 2107, ICMP 2827, KACC 10391; ^d: CFBP 2341, ICMP 2823; ^e:CFBP 3204, ICMP 2855; ^f: CFBP 10963, CFBP 4060, ICMP 9746; ^g: CFBP 2216, ICMP 3113, KACC 10678; ^h: ICMP 3934; ⁱ: ICMP 4933.

^b: sequência de ADN do gene *cts* presente no artigo publicado por Vanneste e colaboradores (2010)

2.7. Caracterização da patogenicidade

A patogenicidade dos isolados foi testada em plantas de actínídea da cultivar *Hayward* com dois anos, durante o mês de Outubro de 2014. As plantas foram inoculadas com três isolados portugueses do EDM, com diferentes origens geográficas, e com a estirpe italiana CFBP 7286.

As culturas bacterianas a inocular foram obtidas a partir de colónias puras, inoculadas em meio B de King e postas a crescer durante 24 horas, em estufa de incubação a 28°C. Prepararam-se suspensões bacterianas, ajustando-se a concentração do inóculo a 10^8 ufc ml⁻¹ recorrendo à utilização de um espectrofotómetro e efetuando as leituras da densidade ótica a 660 nm.

Para cada estirpe estudada, inocularam-se 3 plantas (uma planta por vaso) por estirpe, pulverizando as folhas com uma suspensão bacteriana. Três plantas inoculados com água destilada esterilizada, mantidos nas mesmas condições das plantas inoculadas, constituíram o controlo negativo.

As plantas foram observadas 15 dias e um mês após inoculação e foram anotados os sintomas observados.

2.8. Extração de bacteriófagos a partir de material vegetal infetado

Com o intuito de extrair bacteriófagos com a capacidade de provocar lise em estirpes de Psa, foram colhidas amostras de folhas de dois pomares infetados com a doença. Após a análise das folhas e comprovada a presença de sintomas de Psa, procedeu-se ao isolamento e purificação das bactérias, seguindo a metodologia descrita anteriormente no ponto 2.1.1.

Para isolamento de bacteriófagos, cada amostra de folhas foi macerada em 30 ml de água ultrapura esterilizada recorrendo a um Stomacher[®]. O macerado foi depois decantado e filtrado com um filtro de 0,2 µm. Para a obtenção de placas fágicas e confirmação da existência de bacteriófagos nas amostras, misturou-se 1 ml do macerado filtrado e 0,3 ml de suspensão bacteriana, que foram inoculados em meio *Tryptophan Soy Broth* (TSB) (Anexo I-19). O meio com o fago e hospedeiro foi depois distribuído em placas com meio *Tryptophan Soy Agar* (TSA) (Anexo I-20), incubadas a 28°C. As placas foram analisadas após 5 dias.

A capacidade dos fagos isolados infetarem estirpes bacterianas isoladas em Portugal, em Itália e no Japão foram testadas utilizando a estirpe portuguesa P84, a estirpe italiana CFBP 7286 e a estirpe tipo japonesa CFBP 4909^T.

3. Resultados

3.1. Caracterização morfológica e cultural

As bactérias identificadas como Psa apresentaram colônias com morfologia bastante semelhante entre si. Após 48 horas de incubação a 28°C em meio B de King, as colônias têm cor esbranquiçada com transparência, lisas e margens circulares. A maior parte das colônias apresenta brilho e dimensões que variam entre 4 e 6 mm de diâmetro (Figura 8A). Apenas a estirpe B65 (Figura 8B) apresentou características mucoides, dimensões superiores (7 a 8 mm de diâmetro) e uma aparência mais baça e amarelada. Relativamente à formação de pigmentos fluorescentes visíveis sob luz ultravioleta ($\lambda = 560 \text{ nm}$), verificou-se que esta é uma característica variável entre as estirpes estudadas.

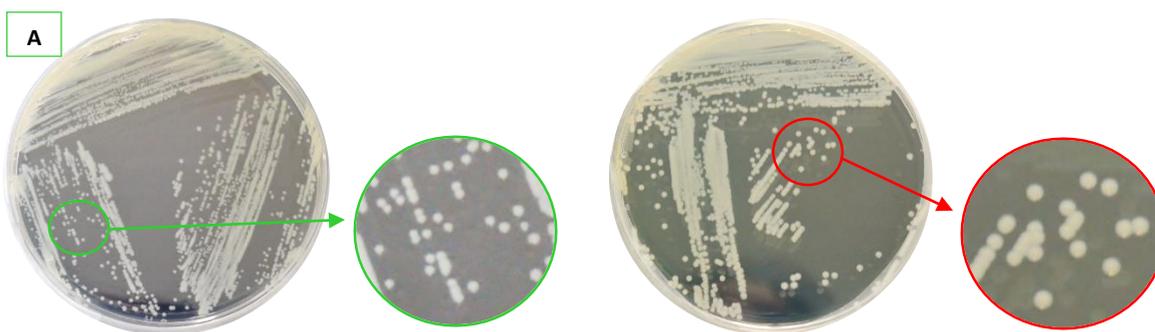


Figura 8. Características morfológicas de colônias de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

3.2. Caracterização bioquímica e fisiológica dos isolados

As provas bioquímicas convencionais e os sistemas de biotipificação são métodos de identificação que se baseiam nas características fenotípicas dos microrganismos isto é, os caracteres fisiológicos e bioquímicos que o microrganismo apresenta.

De acordo com a classificação das bactérias fitopatogênicas fluorescentes proposta por Lelliot *et al.* (1966), todos os isolados estudados pertencem ao grupo LOPAT

la, (positivo para a produção de levana e a reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco; negativo para oxidase, dihidrólise da arginina e atividade pectinilítica).

O resultado da análise de 56 características fisiológicas e bioquímicas de 25 estirpes testadas, utilizando o sistema BIOLOG GENIII (Biolog, 2011) deu origem ao dendrograma apresentado na Figura 9. Da análise desta figura pode constatar-se que para um valor de similaridade de 0,972 se obtêm 2 fena e 3 estirpes não agrupadas. O fenon 1 agrupa 15 estirpes portuguesas e a estirpe italiana CFBP 7286 pertencente à população Psa3. O fenon 2 agrupa 6 estirpes portuguesas. As estirpes B65, AL14 e CFBP 4909^T encontram-se isoladas.

Todas as 25 estirpes testadas apresentaram a capacidade de utilizar sacarose, mio-inositol, glicerol, L-alanina, ácido L-aspártico, ácido L-glutâmico, L-serina, ácido D-glucónico, ácido D-glucurónico, ácido mícico, ácido quínico, ácido D-sacárico, ácido cítrico, ácido D-málico, ácido L-málico, ácido gama-aminoburítico e ácido acético. Estas apresentaram ainda sensibilidade química quando expostas a NaCl 8%, minociclina, cloreto de lítio, butirato de sódio e bromato de sódio. Os substratos para os quais a capacidade de utilização por parte das estirpes estudadas foi variável foram: α -D-glucose, D-manose, D-fucose, inosina, D-sorbitol, D-manitol, D-arabitol, Mio-inositol, D-serina, ácido L-piroglutâmico, pectina, ácido D-galacturónico, ácido D-glucurónico, metil-piruvato, ácido bromo-succínico e ácido acetoacético.

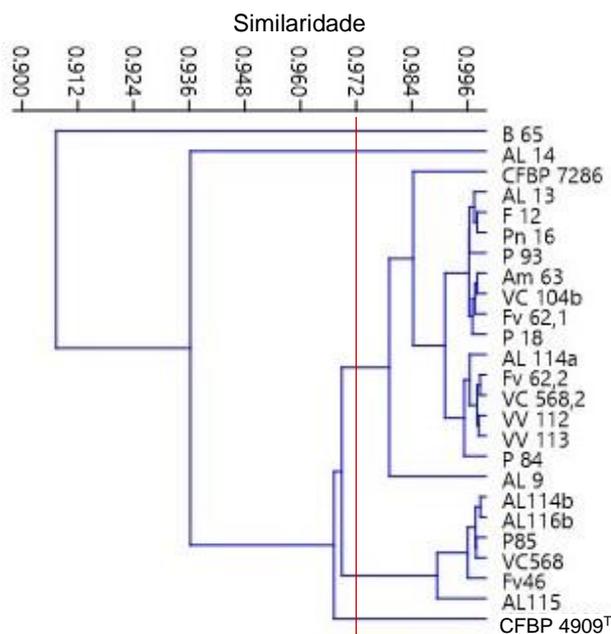


Figura 9. Dendrograma das distâncias fenotípicas entre 25 estirpes testadas para 56 características fenotípicas.

3.3. Caracterização dos ácidos gordos

Os perfis de ácidos gordos das 21 estirpes estudadas com este método foram comparados com os perfis conhecidos de microrganismos existentes na base de dados do sistema MIDI. O resultado desta comparação é apresentado pelo Índice de Similaridade (IS), que representa a proximidade do perfil de ácidos gordos da amostra estudada com os perfis existentes na base de dados.

Com a exceção da estirpe B65, que apresentou IS inferior a 0,500, todas as restantes estirpes estudadas apresentaram um IS superior a 0,700 quando comparadas com os perfis de Psa existentes no sistema, o que permite identificar estas estirpes como *P. syringae* pv. *actinidiae*.

A análise dos perfis de ácidos gordos das estirpes portuguesas isoladas na região EDM e de uma estirpe representante da população de Psa3 isolada em Itália mostrou que existem 3 ácidos gordos que distinguem a estirpe italiana Psa3 da estirpe portuguesa P85. São eles os ácidos gordos 17:0, *Sum In Feature 7* (correspondente ao ácido gordo 18-1 ω 7c, 18-1 ω 9t e/ou 18-1 ω 12t) e *Summed Feature 7* (correspondente ao ácido gordo C(18-1) ω 7c, C(18-1) ω 9t e/ou C(18-1) ω 12t). As estirpes estudadas apresentaram dois picos distintivos para os ácidos gordos 16:0 e *Sum In Feature 3* (que corresponde ao ácido gordo 16-1 ω 7c e/ou 16-1 ω 6c).

3.4. Identificação e caracterização molecular

3.4.1. Identificação por PCR utilizando os *primers* PsaF1-PsaR2

Os resultados das amplificações por PCR com os *primers* PsaF1-PsaR2 e por duplex-PCR das estirpes estudadas estão apresentados nas Figura 10 e Figura 11, respetivamente. Para os *primers* PsaF1-PsaR2, a reação de PCR amplificou o fragmento esperado de 280 pb em todas as estirpes portuguesas estudadas, na estirpe CFBP 4909^T e na estirpe italiana CFBP 7286.

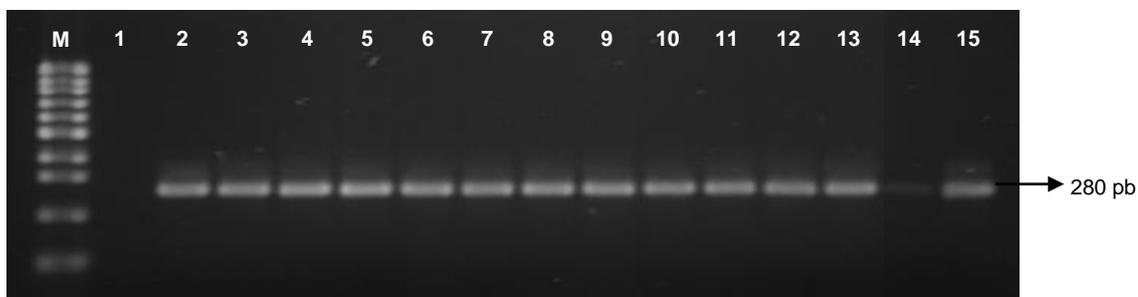


Figura 10. Fragmentos de amplificação obtidos com os *primers* PsaF1/R2 numa reação de PCR, obtidos com as estirpes de *P.s. pv. actinidiae*. Coluna 1: controlo negativo; 2: CFBP 4909^T; 3: CFBP 7286; 4 a 15: Estirpes EDM. M: Marcador molecular (100 bp DNA Ladder, Bioron).

3.4.2. Identificação por Duplex-PCR utilizando os *primers* KN-F/KN-R e avrdDpx-F/R

Na reação de *duplex*-PCR, com os 2 pares de *primers* KN-F/R e avrdDpx-F/R, verificou-se a amplificação dos dois fragmentos esperados de 226 e 492 pb para o conjunto das estirpes estudadas. Foi exceção a estirpe B65 para a qual não houve amplificação de qualquer fragmento quando se utilizaram estes *primers*.

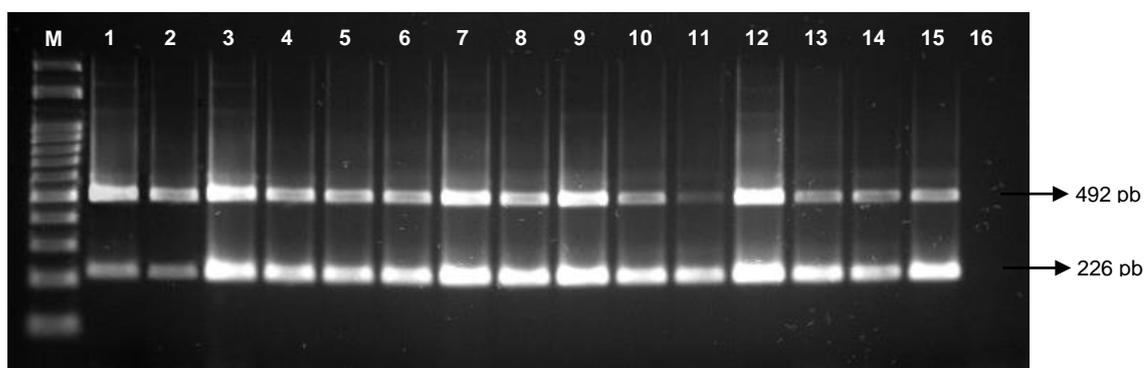


Figura 11. Fragmentos de amplificação obtidos com os *primers* KN-F/R e AvrdDpx-F/R numa reação de Dúplex-PCR, obtidos com as estirpes de *P.s. pv. actinidiae*. Coluna 1: CFBP 4909^T; 2: CFBP 7286; 3 a 15: estirpes EDM.; 16: controlo negativo. M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, NIPPON Genetics).

3.4.3. Caracterização molecular de Psa com os *primers* avrD1-F/avrD1-R, B1/B2, cts-Fp/cts-Rp, PsITSF1/PsITSR2

A caracterização molecular das 23 estirpes referidas anteriormente no Quadro 2 foram realizadas utilizando os pares de *primers* indicados no Quadro 4, tendo sido utilizados os protocolos publicados por Balestra e colaboradores (2013), Biondi e colaboradores (2013), Ferrante e Scortichini (2010), Ferrante e Scortichini (2009), Louws e colaboradores (1994), Rees-George e colaboradores (2010); Sarkar e Guttman (2004) Templeton e colaboradores (2005). Os resultados das amplificações por PCR obtidos para o conjunto das estirpes estudadas estão apresentados no Quadro 10 e Figura 12 Figura 18.

A estirpe italiana CFBP 7286 e todas as estirpes portuguesas isoladas da região EDM estudadas, à exceção da estirpe B65, caracterizaram-se pela amplificação dos fragmentos esperados de 600 pb (*primers* avrD1-F/avrD1-R), 631 pb (*primers* B1/B2), 650 pb (*primers* cts-Fp/cts-Rp), 175 pb (*primers* PsaF3/PsaR4) e 680 pb (*primers* PsITSF1/PsITSR2). A reação multiplex-PCR (Balestra *et al.*, 2013) resultou na amplificação dos dois fragmentos esperados de 311 pb e 733 pb simultaneamente, permitindo caracterizar as estirpes portuguesas isoladas na região EDM como pertencendo à população Psa3.

A reação de PCR com o par de *primers* ArgK-F3/ArgK-R amplificou um fragmento esperado de 800 pb apenas para a estirpe tipo japonesa CFBP 4909^T, como se pode ver na Figura 12. Este resultado mostra que as estirpes isoladas na região EDM não possuem o gene *tox-argK*, presumivelmente responsável pela produção de faseolotoxina. Tal como se pode observar na Figura 18, a reação multiplex-PCR (com os *primers* PsaF/PsaR, EuropeF/EuropR, ChinaF/ChinaR e JapanF/JapanR) amplificou os dois fragmentos esperados de 311 e 733 pb para as estirpes portuguesas estudadas e para a estirpe italiana CFBP 7286, caracterizando-as como pertencentes à população Psa3. No caso da estirpe tipo japonesa, foram amplificados os 2 fragmentos esperados com 254 e 311 pb, caracterizando-a como Psa1.

A estirpe B65 apenas amplificou os fragmentos de ADN esperado com as reações de PCR com os *primers* Cts-Fp/cts-Rp (Figura 15) e PsITS-F1/PsITS-R2 (Figura 17), tendo apresentado também um fragmento ténue de 631 pb com o par de *primers* B1/B2 (Figura 14).

Quadro 10. Resultados das ampliações obtidas por PCR utilizando os *primers* ArgK-F3, ArgK-R; avrD1-F, avrD1-R; B1, B2; Cts-Fp, Cts-Rp; PsaF3, PsaR4; PsITS-F1, PsITS-R2.

<i>Primers</i>	ArgK-F3	avrD1-F	B1	Cts-Fp	PsaF3	PsITS-F1
	ArgK-R	avrD1-R	B2	Cts-Rp	PsaR4	PsITS-R2
Fragmento (pb)	800	581	631	530	175	680
CFBP 4909 ^T	+	+	+	+	+	+
CFBP 7286	-	+	+	+	+	+
Estirpes EDM	-	+	+	+	+	+
B65	-	-	?	+	-	+

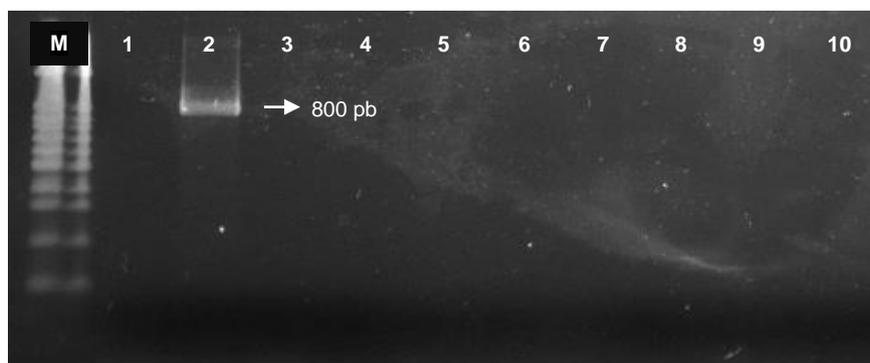


Figura 12. Fragmentos de amplificação obtidos com os *primers* ArgK-F3 / ArgK-R, obtidos com as estirpes de Psa. Coluna 1: controlo negativo; 2: CFBP 4909^T; 3: CFBP 7286; 4 a 10: estirpes EDM. M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, NIPPON Genetics).

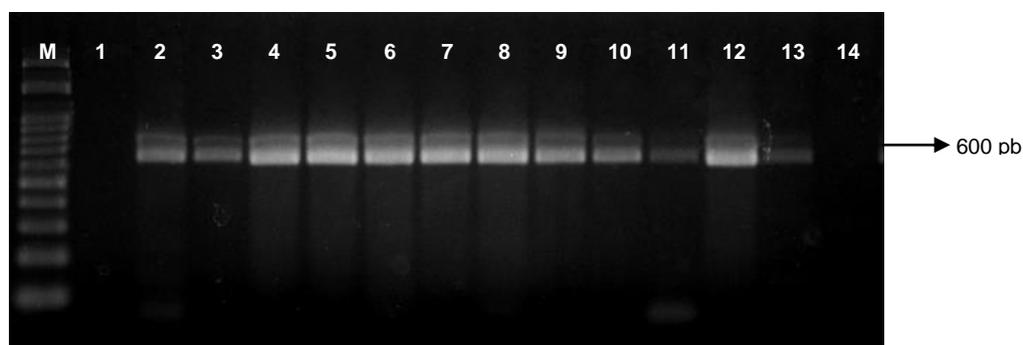


Figura 13. Fragmentos de amplificação obtidos com os *primers* avrD1-F / avrD1-R, obtidos com as estirpes de Psa. Coluna 1: controlo negativo; 2: CFBP 4909^T; 3: CFBP 7286; 4 a 13: Estirpes EDM; 14: B65. M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, NIPPON Genetics).

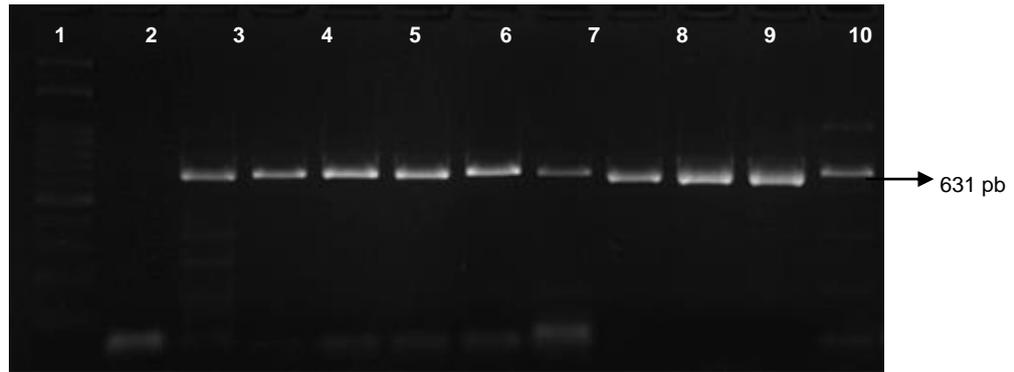


Figura 14. Fragmentos de amplificação obtidos com os *primers* B1/B2, obtidos com as estirpes de Psa. Coluna 1: controlo negativo; 2: CFBP 4909^T; 3: CFBP 7286; 4 a 10: Estirpes EDM. M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, NIPPON Genetics).

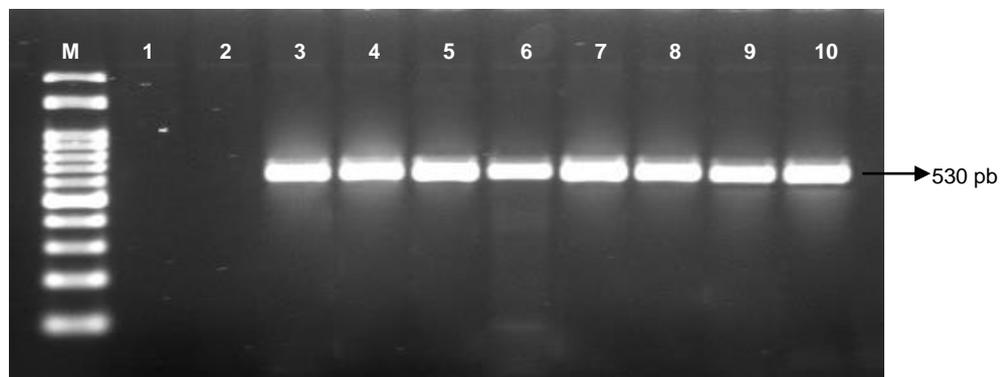


Figura 15. Fragmentos de amplificação obtidos com os *primers* cts-Fp / cts-Rp, obtidos com as estirpes de Psa. Coluna 1 e 2: controlo negativo; 3 a 10: Estirpes EDM. M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, NIPPON Genetics).

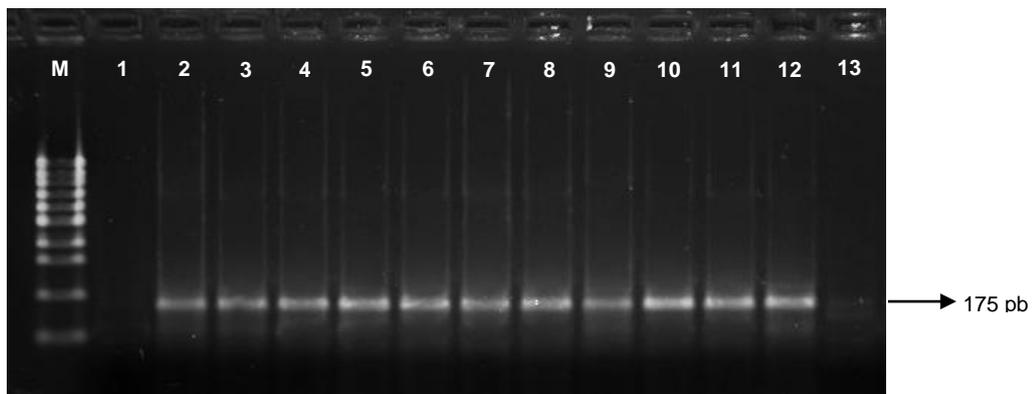


Figura 16. Fragmentos de amplificação obtidos com os *primers* PsaF3/R4 numa reação de PCR, obtidos com as estirpes de *P.s. pv. actinidiae*. Coluna 1: controlo negativo; 2: CFBP 4909^T; 3: CFBP 7286; 4 a 12: Estirpes EDM; 13: B65. M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, Bioron).

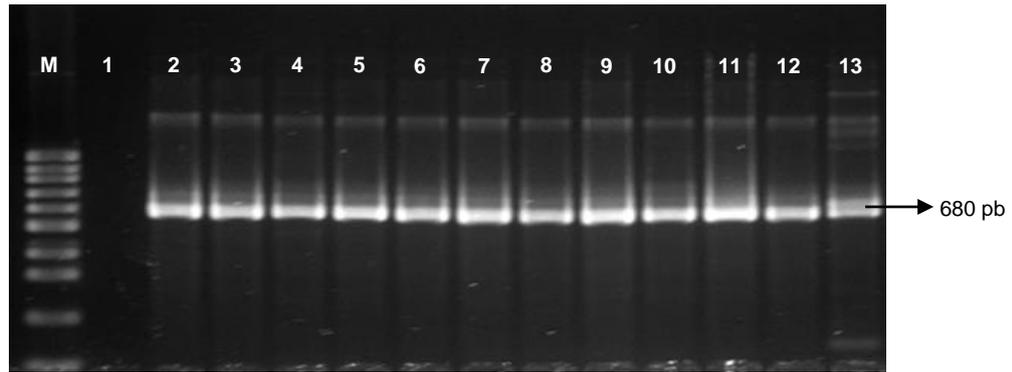


Figura 17. Fragmentos de amplificação obtidos com os *primers* PsITS-F1/R2, obtidos com as estirpes de *P. s. pv. actinidiae*. Coluna 1: controlo negativo; 2: CFBP 4909^T; 3: CFBP 7286; 4 a 12: Estirpes EDM; 13: B65. M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, Bioron).

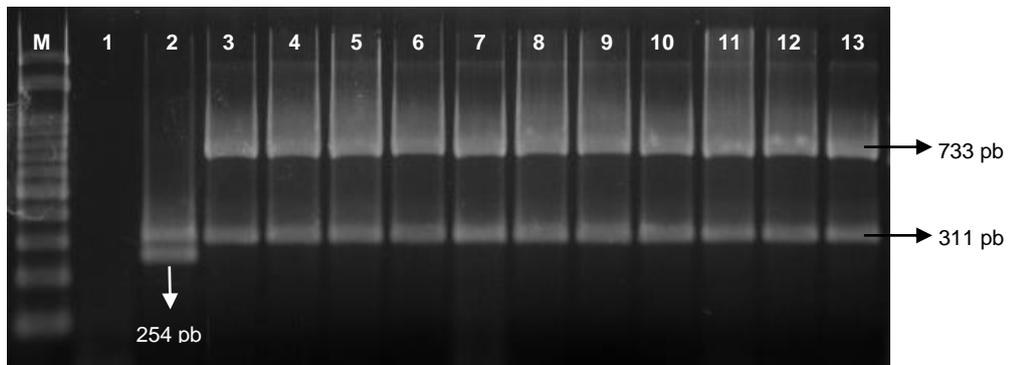


Figura 18. Fragmentos de amplificação obtidos com os *primers* desenhados por Balestra *et al.*, 2013, obtidos com as estirpes de *P. s. pv. actinidiae*. Coluna 1: controlo negativo; 2: CFBP 4909^T; 3: CFBP 7286; 4 a 13: Estirpes EDM. M: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, NIPPON Genetics).

Análise da diversidade genética

3.4.4. Análise de sequências repetitivas de ADN por BOX-PCR

Os padrões electroforéticos gerados pela amplificação das sequências conservadas e repetitivas BOX, obtidas com as 24 estirpes bacterianas estudadas (Quadro 11), deram origem a produtos complexos, com variações no número e tamanho dos fragmentos de ADN amplificados entre duas sequências repetidas. Por um lado, os diferentes amplicões obtidos confirmam que essas sequências repetitivas se apresentam dispersas no genoma das bactérias estudadas e, por outro, que o tamanho e intensidade dos fragmentos é variável quer dentro de estirpes de populações de Psa diferentes mas também entre estirpes da mesma população (Figura 19 Figura 20).

Quadro 11. Estirpes estudadas com o *primer* BOXA1R

Estirpe	PsaF1-PsaR2 Rees-George <i>et al.</i> (2010)	KN-F/R e avrDdpX- F/R Gallelli <i>et al.</i> (2011a)	Origem	População
EDM*	+	+	Portugal	Psa3
B65	+	-	Portugal	-
CFBP 4909 ^T	+	+	Japão	Psa1
K-Psa	+	+	Coreia	Psa2
CFBP 7286	+	+	Itália	Psa3
10627	+	+	Nova Zelândia	Psa3
10880	+	-	Nova Zelândia	Psa4

* Estirpes portuguesas isoladas na região Entre Douro e Minho

A comparação dos padrões de fragmentos de ADN genómico amplificados com o *primer* BOXA1R permite verificar que se obtiveram entre 15 e 20 bandas polimórficas, com tamanhos que variaram entre 216 pb e 4038 pb.

Da análise dos padrões de fragmentos de ADN genómico amplificados, é possível verificar que as quatro populações de Psa apresentam padrões diferentes entre si.

As estirpes representantes das populações Psa1 e Psa2 apresentam um perfil genético muito idêntico, caracterizando-se pela presença de duas bandas distintivas de 300 e 700 pb, e uma banda adicional com cerca de 2500 pb na estirpe da população Psa2 (Figura 19 e Figura 20), que as permite diferenciar das restantes populações de Psa. A estirpe 10880 isolada na Nova Zelândia, pertencente à população Psa4, distingue-se das restantes populações por apresentar 3 bandas, únicas desta população, de 1600, 380 e 300 pb, e ainda pela ausência das bandas de 210 e 1000 pb.

As estirpes isoladas no EDM, com exceção da estirpe B65, apresentam um perfil BOX-PCR semelhante ao da estirpe italiana (CFBP 7286) e da Nova Zelândia (10627) da população Psa3. Este conjunto de estirpes distingue-se das estirpes das restantes populações Psa1, Psa2 e Psa4 por apresentarem duas bandas adicionais de 200 e 750 pb (Figura 19; Figura 20). No entanto, as estirpes CFBP 7286 e 10627 apresentam variabilidade genética entre si, pois a estirpe isolada na Nova Zelândia é caracterizada pela presença de bandas com 300, 350 e 450 pb, ausentes na estirpe italiana. A análise da diversidade genética obtida por BOX-PCR evidencia igualmente a existência de variabilidade no interior da população portuguesa de Psa da região EDM. As estirpes AL114b, AL116, Am63, F12 e F62 caracterizam-se por apresentarem bandas com 300, 350, 450, 2100, 2200, 2400 pb e 2500 pb que as restantes estirpes de Psa3 isoladas em Portugal e em Itália não apresentam e que a estirpe isolada na Nova Zelândia apresenta parte delas (300, 350 e 450 pb). Uma banda de 1000 pb apenas está ausente nas estirpes portuguesas referidas anteriormente.

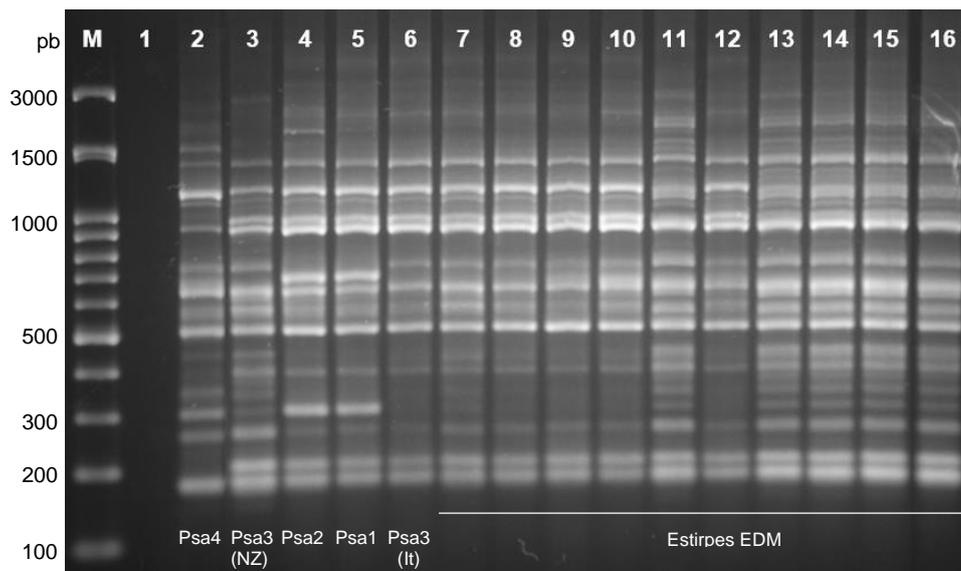


Figura 19. Perfis electroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *P. s. pv. actinidiae* (Psa), através de PCR utilizando o *primer* BOX. Coluna 1: controlo negativo da reação de PCR (H₂O); 2: 10880 (Psa4); 3: 10627 (Psa 3); 4: K-Psa (Psa 2); 5: CFBP 4909^T (Psa1); 6: CFBP 7286 (Psa 3); 7: AL 9; 8: AL 13; 9: AL 14; 10: AL 114a; 11: AL 114b; 12: AL 115; 13: AL 116; 14: Am 63; 15: F 12; 16: Fv 62. M - Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, NIPPON Genetics).

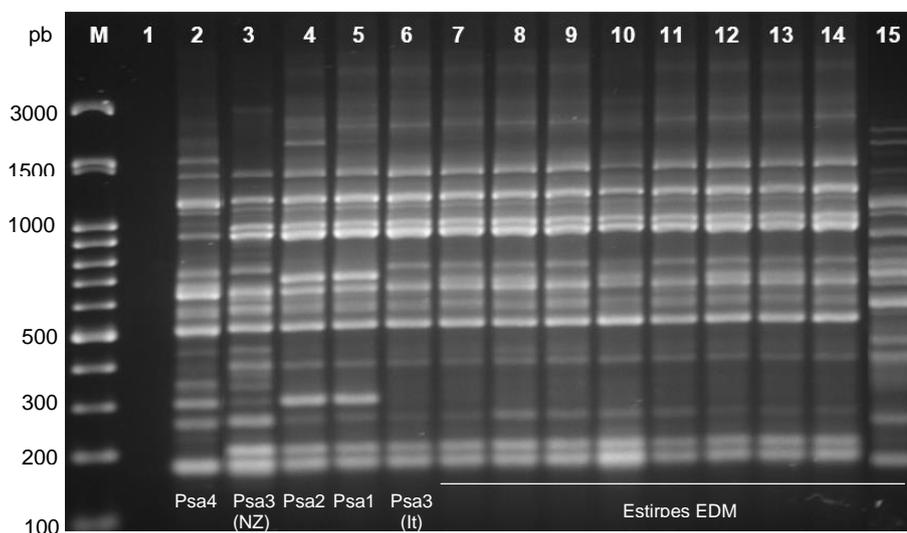


Figura 20. Perfis electroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *P. s. pv. actinidiae* (Psa), através de PCR utilizando o *primer* BOX. Coluna 1: controlo negativo da reação de PCR (H₂O); 2: 10880 (Psa4); 3: 10627 (Psa 3); 4: K-Psa (Psa 2); 5: CFBP 4909^T (Psa1); 6: CFBP 7286; 7: P 18; 8: P 84; 9: P 85; 10: P 93; 11: Pn 16; 12: VC 104b; 13: VV 112; 14: VV 113; 15: B 65. M - Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, NIPPON Genetics).

3.4.5. Análise do polimorfismo por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

O resultado da digestão com a enzima *AluI* dos amplicões obtidos por PCR com o par de *primers* B1/B2, produziu dois perfis distintos apresentados na Figura 21. Tal como descrito por Biondi e colaboradores (2013), os amplicões obtidos com estirpes de Psa da população Psa3 não foram digeridos, tendo sido amplificado um fragmento de 631 pb. A digestão dos amplicões obtidos com estirpes das populações Psa1 (CFBP 4909^T), Psa2 (K-Psa) e Psa4 (10880) produziu um perfil representado por 2 fragmentos de 336 e 295 pb. Nenhum dos amplicões das estirpes isoladas na região EDM foram digeridos, inserindo-se assim no perfil da população Psa3. O isolado B65 apresentou um amplicão mais ténue, tal como aconteceu na migração do produto direto obtido por PCR (Figura 14).

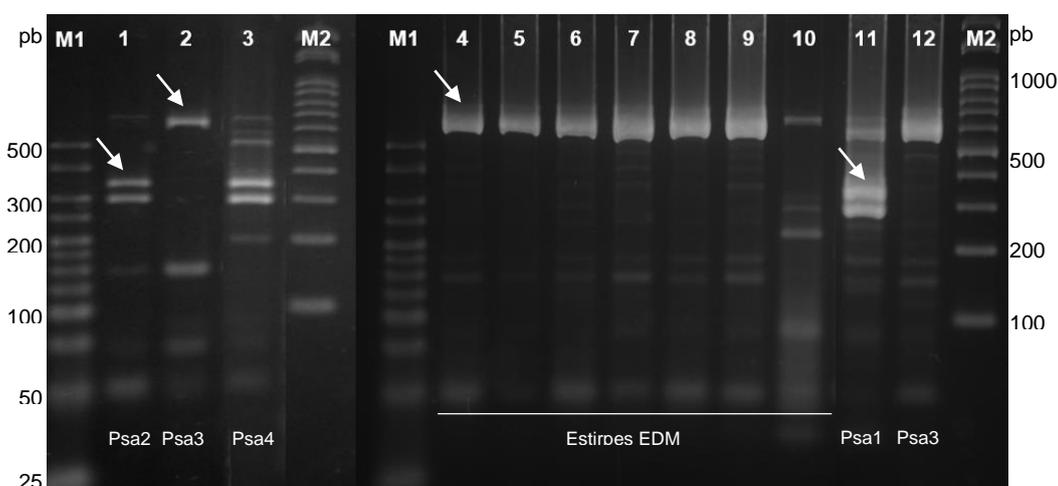


Figura 21. Análise por RFLP do *amplicon* B1/B2 (631 pb) com a enzima *AluI* de estirpes de *P. s. pv. actinidiae*. 1: K-Psa (Psa 2); 2: 10627 (Psa 3); 3: 10880 (Psa4); 4: AL 9; 5: AL 13; 6: AL 14; 7: AL114a; 8: AL114b; 9: AL115; 10: B65; 11: CFBP 4909^T (Psa1); 12: CFBP 7286 (Psa 3). M1: Marcador molecular (HyperLadderTM 25bp, BIOLINE); M2: Marcador molecular (100 pb DNA Ladder, NIPPON Genetics).

3.5. Sequenciação de ADN amplificado e análise filogenética

Os alinhamentos das sequências dos fragmentos de ADN sequenciados, obtido no programa BioEdit (version 7.0.0), apresentam-se nas Figura 22 e Figura 23. A origem e classificação das sequências obtidas a partir do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foram anteriormente indicadas no Quadro 9.

Na Figura 22 está apresentado o alinhamento das sequências do gene *cts* das estirpes CFBP 4909^T (população Psa1), KACC10584 (população Psa2), “Vanneste” (população Psa3) e P85 representativa dos 19 isolados sequenciados da região EDM. A estirpe P85, bem como as restantes estirpes estudadas, apresentaram uma citosina nas posições 239 e 419, correspondendo à população Psa3. Esta classificação está descrita no artigo publicado por Vanneste e colaboradores (2010) que, embora seja referido que o nucleótido que varia entre as populações de Psa se encontre na posição 420, quando os nucleótidos da sequência são contados constata-se que se trata da posição 419.

O alinhamento das sequências do gene *ompP1* das estirpes NCPPB 3873 (Psa1), JQ 934486.1 (Psa2), CRA-FRU 3.1 (Psa3), 10880 (Psa4) e P85 (representativa das 11 estirpes portuguesas do EDM sequenciadas) está apresentado na Figura 23. A análise do alinhamento das sequências permite observar que existe similaridade entre as estirpes NCPPB 3873 e JQ 934486.1 e também entre as estirpes CRA-FRU 3.1 e P85, evidenciando a semelhança entre as estirpes estudadas e a população Psa3. O resultado do alinhamento das sequências de nucleótidos deste gene evidenciam a existência de 5 diferenças de nucleótidos entre as estirpes da população Psa1 e Psa3, mostrando a variabilidade existente entre elas.

```

      5      15      25      35      45      55      65      75      85
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CFBP4909T
KACC10584 TACGCGGTCTGACCGCCACCGGCCGCTTCACATTTGACCCCTGGTTTCATGTCCACGGCCTCTTGCGAGTCGAAGATCACCTACATCGATG
Vanneste TAGCGGTCTGACCGCCACCGGCCGCTTCACATTTGACCCCTGGTTTCATGTCCACGGCCTCTTGCGAGTCGAAGATCACCTACATCGATG
P85 -----TTGCGAGTCGAAGATCACCTACATCGATG

      95      105     115     125     135     145     155     165     175
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CFBP4909T
KACC10584 -----TGCACCGCGGCTACCCGATCGAACAACTGGCCGAGCAGTCCGATTATCTCGAGACCTGCTACCTGTTGCTCA
Vanneste GTGACAACGGAATTCTGCTGCACCGCGGCTACCCGATCGAACAACTGGCCGAGCAGTCCGATTATCTCGAGACCTGCTACCTGTTGCTCA
P85 GTGACAACGGAATTCTGCTGCACCGCGGCTACCCGATCGAACAACTGGCCGAGCAGTCCGATTATCTCGAGACCTGCTACCTGTTGCTCA

      185     195     205     215     225     235     245     255     265
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CFBP4909T
KACC10584 ACGGCGAGCTGCCAACCGCCGAACAGAAAGCCAGTTCGTGGCCGTGGTCAAGAACCACACGATGGTTCACGAACAACCTCAAGACCTTCT
Vanneste ACGGCGAGCTGCCAACCGCCGAACAGAAAGCCAGTTCGTGGCCGTGGTCAAGAACCACACGATGGTTCACGAACAACCTCAAGACCTTCT
P85 ACGGCGAGCTGCCAACCGCCGAACAGAAAGCCAGTTCGTGGCCGTGGTCAAGAACCACACGATGGTTCACGAACAACCTCAAGACCTTCT

      275     285     295     305     315     325     335     345     355
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CFBP4909T
KACC10584 TCAACGGCTTTGCGCGTGACGCCACCCGATGGCCGTCATGTGCGGTGTAGTCGGCGCCCTGTGCGCGTCTACCACGATTGCGTGGACA
Vanneste TCAACGGCTTTGCGCGTGACGCCACCCGATGGCCGTCATGTGCGGTGTAGTCGGCGCCCTGTGCGCGTCTACCACGATTGCGTGGACA
P85 TCAACGGCTTTGCGCGTGACGCCACCCGATGGCCGTCATGTGCGGTGTAGTCGGCGCCCTGTGCGCGTCTACCACGATTGCGTGGACA

      365     375     385     395     405     415     425     435     445
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CFBP4909T
KACC10584 TCAATAACCCGAGCACC CGCAAATTTGCGGCTGTACGCCTGGTCGCCAAGATGCCGACACTGGCAGCGATGGTCTACAAGTACTCCATGG
Vanneste TCAATAACCCGAGCACC CGCAAATTTGCGGCTGTACGCCTGGTCGCCAAGATGCCGACACTGGCAGCGATGGTCTACAAGTACTCCATGG
P85 TCAATAACCCGAGCACC CGCAAATTTGCGGCTGTACGCCTGGTCGCCAAGATGCCGACACTGGCAGCGATGGTCTACAAGTACTCCATGG

      455     465     475     485     495     505     515     525     535
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CFBP4909T
KACC10584 GCCAACCCATGATGTACCCGCGCAACGACCTCAGCTACGCCGAAAACCTCCTGCACATGATGTTCAACACGCCGTGCGGAGAT--...
Vanneste GCCAACCCATGATGTACCCGCGCAACGACCTCAGCTACGCCGAAAACCTCCTGCACATGATGTTCAACACGCCGTGCGGAGATCA...
P85 GCCAACCCATGATGTACCCGCGCAACGACCTCAGCTACGCCGAAAACCTCCTGCACATGATGTTCAACACGCCGTGCGGAGAT--...

```

Figura 22. Comparação de sequências de ADN do gene *cts* de isolados de *P. syringae* pv. *actinidiae*. CFBP 4909^T (população Psal); KACC 10584 (população Psal 2); Vanneste (população Psal 3); P 85.

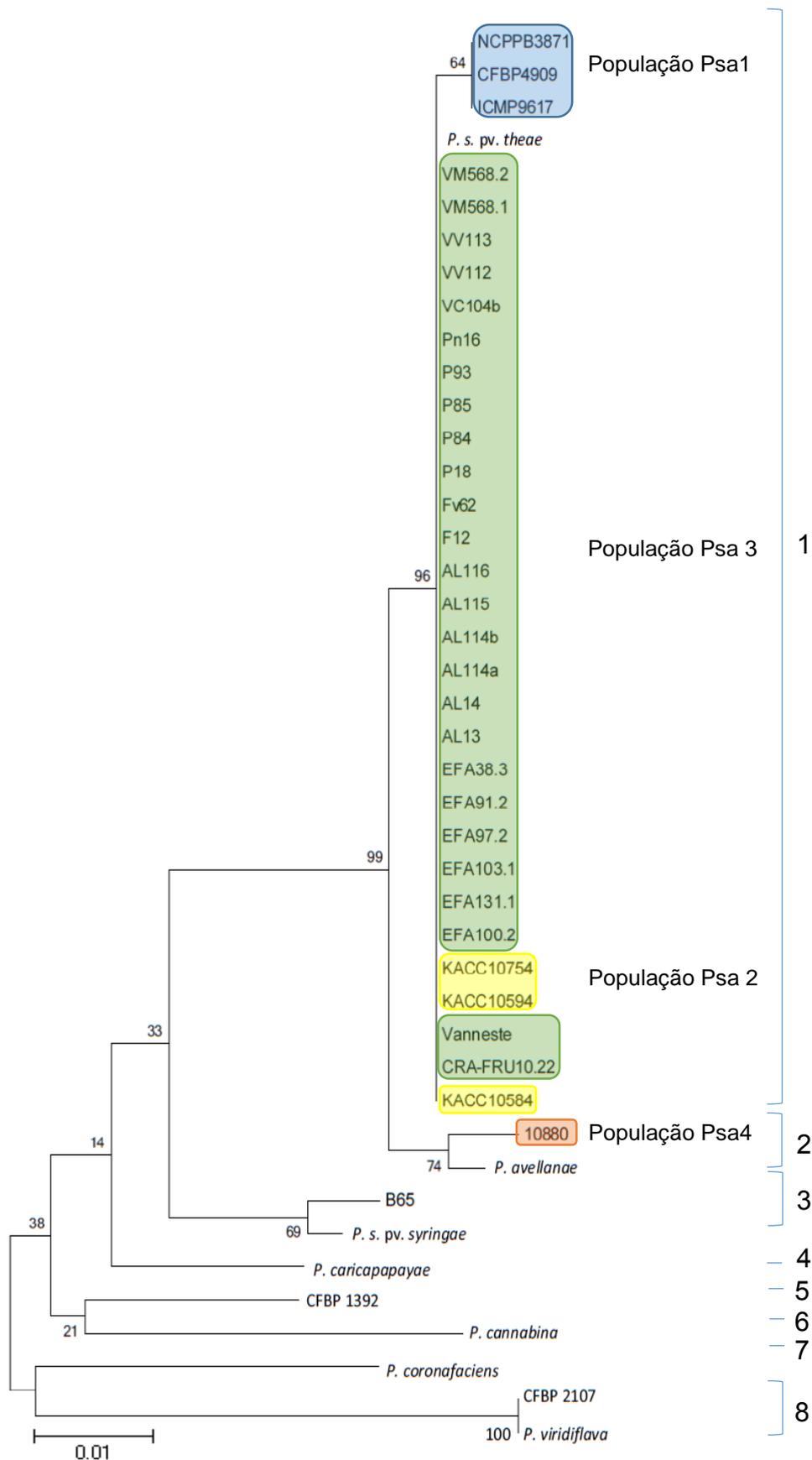


Figura 24. Árvore filogenética obtida com a sequenciação do gene *cts* das estirpes de *Pseudomonas* estudadas através da utilização do método *Neighbor-Joining* e parâmetro *Kimura-2* (MEGA6). A escala é de 0,01 substituições de nucleótidos por local.

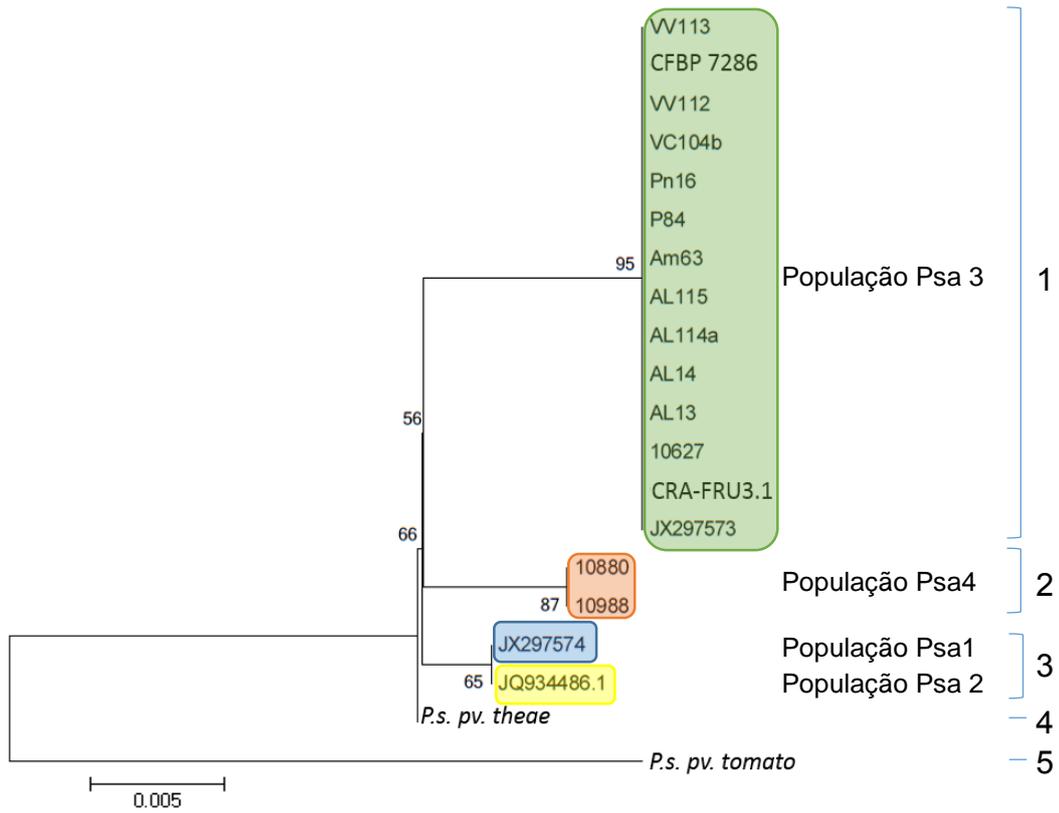


Figura 25. Árvore NJ (*Neighbour-joining*) de estirpes de *Pseudomonas* a partir das sequências de ADN do gene *ompP1* através da utilização do parâmetro Kimura-2 (MEGA6). A escala é de 0,00 substituições de nucleótidos por local.

Quadro 12. Número do grupo e número de estirpes de cada grupo obtidos pela análise da árvore filogenética obtida a partir do gene *cts*.

Grupo	Nº de estirpes	Estirpes
1	33	NCPPB 3871, CFBP 4909 ^T , ICMP 9617 (Psa1); AL13, AL14, AL114a, AL114b, AL115, AL116, F12, Fv62, P18, P84, P85, P93, Pn16, VC104b, VV112, VV113, VM568.1, VM568.2; EFA 38.3, EFA 91.2, EFA 97.2, EFA 100.2, EFA 103.1, EFA 131.1, Vanneste, CRA-FRU 10.22 (Psa3); KACC 10754, KACC 10594, KACC 10584 (Psa2); <i>P. s. pv. theae</i>
2	2	10880 (Psa4), <i>P. avellanae</i>
3	2	B65, <i>P. s. pv. syringae</i>
4	1	<i>P. caricapapayae</i>
5	1	CFBP 1392
6	1	<i>P. cannabina</i>
7	1	<i>P. coronafaciens</i>
8	2	CFBP 2107, <i>P. viridiflava</i>

Quadro 13. Número do grupo e número de estirpes de cada grupo obtidos pela análise da árvore filogenética obtida a partir do gene *ompP1*.

Grupo	Nº de estirpes	Estirpe
1	14	AL13, AL14, AL114a, AL115, Am63, P84, Pn16, VC104b, VV112, VV113 CFBP 7286, CRA-FRU 3.1, JX297573 (Psa3)
2	2	10880, 10988 (Psa4)
3	2	JX 297574 (Psa1) JQ 934486.1 (Psa2)
4	1	<i>P. s. pv. theae</i>
5	1	<i>P. s. pv. tomato</i>

A árvore filogenética obtida com a sequenciação do gene *cts* das estirpes estudadas está apresentada na Figura 24. Da análise da figura, resulta o agrupamento das estirpes em 4 grupos principais, havendo 4 estirpes isoladas. No grupo 1 estão agrupadas todas as estirpes da população Psa1, Psa2 e Psa3, as

estirpes isoladas na região EDM (com exceção da estirpe B65) e a estirpe *P. s. pv. theae*. No grupo 2 encontram-se as estirpes Psa4 e *P. avellanae*; no grupo 3 as estirpes B65 e *P. s. pv. syringae*. Finalmente no grupo 8 agrupam-se as estirpes *P. viridiflava*.

A árvore filogenética obtida através da análise do gene *ompP1* das estirpes estudadas está apresentada na Figura 25. As estirpes estão agrupadas em 3 grupos, apresentando 2 estirpes isoladas. O grupo 1 é composto pelas estirpes da população Psa3 e das estirpes em estudo. As estirpes da população Psa4 representam o grupo 2 e as das populações Psa1 e Psa2 estão agrupadas no grupo 3.

3.6. Caracterização da patogenicidade

Os resultados obtidos relativos à patogenicidade do conjunto de bactérias testadas mostraram que todos os isolados foram patogênicos em actínea. Os sintomas causados pelas estirpes P85, VV112 e CFBP 7286 foram idênticos aos previamente descritos por outros autores (Gallelli *et al.*, 2011a; Vanneste *et al.*, 2013). Os sintomas caracterizaram-se pela formação de manchas necróticas rodeadas por halo amarelo nas folhas pulverizadas com a suspensão bacteriana após 15 dias da inoculação (Figura 1).



Figura 26. Resultados dos testes de patogenicidade após 15 dias de inoculação.

3.7. Extração de bacteriófagos a partir de material vegetal infetado

Os resultados da pesquisa de fagos em folhas de actínídea com sintomas típicos do cancro da actínídea, provenientes de dois pomares da região do EDM, mostram que se obteve a formação de placas fágicas, que permitiram isolar e purificar os fagos (Figura 27).

Os fagos isolados de estirpes portuguesas de Psa deram origem à formação de placas fágicas quando foram co-inoculados com a estirpe italiana CFBP 7286 (população Psa3). No entanto o resultado foi negativo quando estes mesmos fagos foram testados com a estirpe japonesa CFBP 4909^T (população Psa1). Estes resultados mostram que existem bacteriófagos presentes naturalmente nos pomares de actínídea com capacidade de provocar a lise celular de estirpes portuguesas de Psa e da estirpe italiana CFBP 7286.

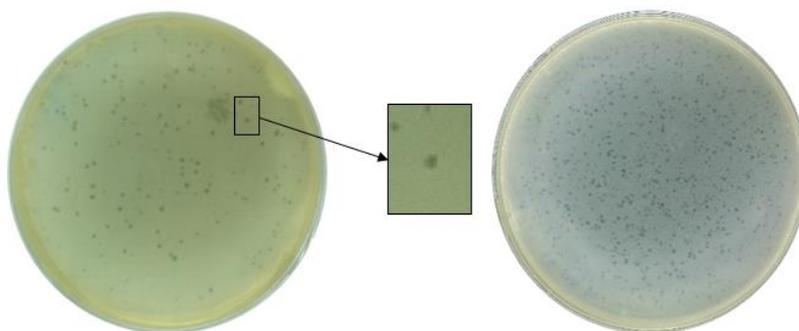


Figura 27. Formação de placas fágicas.

4. Discussão e Conclusão

A identificação das bactérias isoladas na região EDM foi feita através da análise das suas características morfológicas, culturais, bioquímicas, fisiológicas, perfil de ácidos gordos e moleculares, de acordo com as diretivas provisórias da EPPO para *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, e muito recentemente publicadas (EPPO, 2014). A caracterização de 23 estirpes de Psa portuguesas isoladas de pomares da região Entre Douro e Minho mostrou que 22 delas pertencem à população Psa3, a população mais virulenta, atualmente responsável pelo surto da doença na Europa e na Nova Zelândia. Apenas no caso de uma estirpe, a sua caracterização não foi conclusiva, indicando os resultados que se poderá tratar de uma estirpe da população Psa4 (*P. s.* pv. *actinidifoliorum* pv. nov.).

Da análise dos perfis dos ácidos gordos e comparação pelo sistema MIDI com perfis conhecidos de bactérias de Psa pertencentes à população Psa3, foram obtidos Índices de Similaridade (IS) superiores a 0,700 para as estirpes analisadas, confirmando assim a sua identidade (Kunitsky *et al.*, 2006). A semelhança bioquímica e fisiológica entre as estirpes de Psa isoladas em Portugal, a estirpe tipo de Psa CFBP 4909^T (japonesa) e a estirpe CFBP 7286 (italiana) foi ainda confirmada através do sistema BIOLOG (Biolog, 2011), tendo sido obtidos perfis semelhantes. Da análise da capacidade de utilização de fontes de carbono, através do sistema BIOLOG (Biolog, 2011), foi ainda observada a existência de variabilidade fenotípica entre as estirpes de Psa portuguesas.

A caracterização molecular das estirpes do EDM permitiu conhecer a estrutura da população estudada. A prevalência das populações de Psa (Psa1, Psa2, Psa3 e Psa4) num país ou numa região tem uma grande importância, pois sabe-se que as estirpes destas diferentes populações apresentam virulência diferente e, conseqüentemente, os danos e prejuízos causados nos pomares são também diferentes. Para se obter essa informação existem diversos procedimentos que têm vindo a ser desenvolvidos e que foram aplicados neste estudo, tais como reações de PCR e multiplex-PCR, RFLP, BOX-PCR e análise filogenética por sequenciação genética. Assim, através da reação de PCR com o par de *primers* ArgK-F3/ArgK-R

foi confirmada a ausência do gene *tox-argK*, responsável pela produção de faseolotoxina, nas 23 estirpes estudadas isoladas da região do EDM, excluindo assim a possibilidade de estas estirpes pertencerem à população Psa1 (Marcelletti *et al.*, 2011; Chapman *et al.*, 2012; Scortichini *et al.*, 2012; Abelleira *et al.*, 2014; Cameron e Sarojini, 2014). Por outro lado, a análise da reação de multiplex-PCR, descrita por Balestra e colaboradores (2013), utilizando os *primers* PsaF/PsaR, EuropeF/EuropR, ChinaF/ChinaR e JapanF/JapanR permitiu mostrar que 22 das 23 estirpes portuguesas estudadas pertencem à população Psa3 (Balestra *et al.*, 2013).

A análise do polimorfismo por RFLP após digestão com a enzima *AluI* dos amplicões obtidos por PCR com o par de *primers* B1/B2, desenvolvido por Biondi e colaboradores (2013), permite distinguir as estirpes pertencentes da população Psa3 das restantes populações (Psa1, Psa2 e Psa4), uma vez que as estirpes da população Psa3 são as únicas em que não ocorre digestão do amplicão (Biondi *et al.*, 2013). A obtenção de um único amplicão com 631 pb em 22 das 23 estirpes de Psa isoladas na região do EDM, permitiu confirmar que estas são idênticas à população Psa3, pois apresentaram o mesmo perfil das estirpes italiana e da Nova Zelândia incluídas neste estudo.

Na análise das sequências repetitivas de ADN por BOX-PCR nas estirpes estudadas (presentes no Quadro 11), foi confirmado que as quatro populações de Psa apresentam padrões distintos entre si e que, com exceção da estirpe B65, as estirpes isoladas no EDM apresentam um perfil genético semelhante aos das estirpes da população Psa3 utilizadas neste estudo (CFBP 7286 e 10627), sendo portanto caracterizadas como pertencentes a esta população. A análise dos perfis BOX-PCR evidenciou a existência de variabilidade genética entre as estirpes portuguesas de Psa isoladas na região do EDM, e entre estas e as duas estirpes da população Psa3 CFBP 7286 (isolada em Itália) e 10627 (isolada na Nova Zelândia). Na maior parte das estirpes do EDM foi observado um perfil igual ao da estirpe italiana CFBP 7286. No entanto, as estirpes AL114b, AL116, Am63, F12 e F62 apresentam 3 fragmentos de ADN adicionais (300, 350, 450 pb) presentes também na estirpe da Nova Zelândia (10627), que não estão presentes nas restantes estirpes portuguesas e na estirpe italiana estudada.

Neste estudo, procedeu-se também à sequenciação dos genes *cts* e *ompP1* de 19 e 11 estirpes isoladas na região EDM, respetivamente. A partir das sequências obtidas, juntamente com as sequências dos genes em estudo exportadas do GenBank (Quadro 9), foi feita a comparação dos nucleótidos das sequências. Esta análise evidenciou a semelhança genética existente entre as estirpes isoladas na região do EDM e as estirpes italianas da população Psa3 estudadas.

O gene *cts* é um gene *housekeeping* (com funções importantes na sobrevivência da célula) que faz parte do genoma “core” de *P. syringae* (Vanneste *et al.*, 2010). Este é um dos quatro genes *housekeeping* selecionados para análises por MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*) para descrever as relações evolutivas entre estirpes de diferentes patovares de *Pseudomonas syringae*. Diversos estudos já mostraram que as relações entre *P. syringae* podem ser determinadas, até certo ponto, usando apenas a sequência de ADN do gene *cts* (Vanneste, *et al.*, 2013b), gene que foi analisado no presente trabalho. Resultados sobre a análise da sequência de ADN do gene *cts* publicados por Vanneste *et al.* (2010), mostraram que as estirpes de Psa estudadas por aqueles autores foram divididas em dois haplotipos, o haplotipo A e o haplotipo I. O haplotipo A, que incluía as estirpes de Psa isoladas na Coreia (população Psa2), no Japão e em Itália durante o surto de 1992 (população Psa1) foi caracterizado por apresentar uma tirosina na posição 239 e uma adenina na posição 419. O haplotipo I, que incluía apenas as estirpes isoladas em Itália durante o atual surto da doença (população Psa3), foi caracterizado por apresentar uma citosina em ambas as posições mencionadas. No presente estudo, as estirpes portuguesas da região do EDM estudadas, apresentaram uma citosina em ambas as posições, o que nos levou a classificá-las como pertencentes à população Psa3. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho com a estirpe coreana KACC 10584 estudada (população Psa2), mostrou que esta também apresentou a mesma sequência de nucleótidos que as estirpes da população Psa3. Assim, e tal como foi já descrito noutros artigos recentemente publicados (Vanneste *et al.*, 2013b; Abelleira *et al.*, 2014) concluímos que a análise do gene *cts* não é apropriado para diferenciar as populações de Psa. Por fim refere-se que a análise filogenética do gene *cts* evidenciou a proximidade entre as estirpes

das populações de Psa2, Psa3 e *P. s. pv. theae*, tendo sido incluídas num só grupo (grupo 2).

A estirpe B65 isolada na região do EDM apresentou características morfológicas, culturais e moleculares distintas das restantes estirpes estudadas. A sua identificação como *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* foi obtida pela amplificação por PCR com os *primers* PsaF1/PsaR2 e P.s.ITS-F1/P.s.ITS-R2 e pelo facto da sequência parcial do gene ribossomal 16S-23S ter uma homologia de 100% com *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* utilizando o algoritmo MEGABLAST do *software* BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov). As características morfológicas e culturais desta estirpe aproximam-se das características das estirpes de Psa pertencentes à população Psa4. Adicionalmente, os resultados das amplificações obtidas por duplex-PCR (Gallelli *et al.*, 2011a), multiplex-PCR (Balestra *et al.*, 2013) e com o par de *primers* avrD1-F/avrD1-R foi também idêntica aos resultados obtidos para a estirpe representativa da população Psa4. Quando analisado o perfil de ácidos gordos da estirpe B65, e comparado com as estirpes de Psa3 presentes no sistema MIDI, o Índice de Similaridade (IS) foi inferior a 0,500, tal como aconteceu para uma estirpe pertencente à população Psa4 também analisada anteriormente pela equipa (dados não publicados). Estes resultados indicam que esta estirpe não pertence à população Psa3, podendo pertencer a uma das restantes populações (Psa1, Psa2 ou Psa4), apresentando, no entanto, resultados que a parecem aproximar da população Psa4 (atual *P. s. pv. actinidifoliorum*), pelo que se conclui que é necessário realizar novos estudos para clarificar a caracterização da estirpe B65.

Relativamente ao estudo de estratégias para controlar esta doença, foi pesquisada a presença de fagos com capacidade de provocar lise celular em estirpes de Psa em pomares de actinídea infetados com a doença da região do EDM. Os resultados obtidos mostraram que existem realmente bacteriófagos nestes pomares de actinídea com a capacidade de provocar lise celular em estirpes de Psa portuguesas e na estirpe italiana CFBP 7286. A utilização de bacteriófagos no controlo do cancro bacteriano da actinídea, tal como já é feito na cultura do tomateiro para o controlo de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, pode vir a ser parte da solução deste problema,

inclusivamente em pomares certificados no Modo de Produção Biológico. Serão necessários estudos mais aprofundados nesta área, para se obter conhecimentos sobre este meio de proteção contra o cancro da actínídea.

Com este estudo, conclui-se que a população de Psa que prevalece na região Entre Douro e Minho é a população Psa3, a mais virulenta e responsável pelo atual surto da doença na Europa e na Nova Zelândia. Sendo a Beira Litoral uma região onde a produção de kiwi também tem grande importância, será importante realizar um estudo idêntico para a caracterização da população de Psa presente nesta região.

5. Bibliografía

- Abelleira, A., Ares, A., Aguín, O., Picoaga, A., López, M. M. e Mansilla, P., 2014. Current situation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Galicia (northwest Spain). *Plant Pathology*, 63, 691–699.
- Abelleira, A., López, M. M., Peñalver, J., Aguín, O., Mansilla, J. P., Picoaga, A. e García, M. J., 2011. First Report of Bacterial Canker of Kiwifruit Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Spain. *Plant Disease*, 95, 1583–1583.
- Andolfi, A., Ferrante, P., Petriccione, M., Cimmino, A., Evidente, A. e Scortichini, M., 2014. Production of phytotoxic metabolites by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* the causal agent of bacterial canker of kiwifruit. *Journal of Plant Pathology*, 96, 1, 169–176.
- Balestra, G. M., Renzi, M. e Mazzaglia, A., 2010. First report of bacterial canker of *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Portugal. *New Disease Reports*, 22, 1-10.
- Balestra, G. M., Taratufolo, M. C., Vinatzer, B. A. e Mazzaglia, A., 2013. A multiplex PCR assay for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and differentiation of populations with different geographic origin. *Plant Disease*, 97, 4, 472–478.
- Bartko, J. J., 1966. The intraclass correlation coefficient as a measure of reliability. *Psychological Reports*, 19, 3–11.
- Bastas, K. K., e Karakaya, A., 2012. First Report of Bacterial Canker of Kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Turkey. *Plant Disease*, 96, 3, 452–452.
- Bereswill, S., Bugert, P., Volksch, B., Ullrich, M., Bender, C. L., e Geiderl, K., 1994. Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. *Applied and environmental microbiology*, 60, 8, 2924–2930.
- Biolog, Inc., 2008. *GEN III MicroPlate™, Instructions for use*, 8 pp.
- Biolog, Inc., 2011. *Microbial identification: state-of-the-science performance with unmatched power & versatility*, 12 pp.
- Biondi, E., Galeone, A., Kuzmanović, N., Ardizzi, S., Lucchese, C. e Bertaccini, A., 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* detection in kiwifruit plant tissue and bleeding sap. *Annals of Applied Biology*, 162, 60–70.
- Burdon, J. e Lallu, N., 2011. Kiwifruit (*Actinidia* spp.). In *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits, Vol. 3: Cocona to mango.*, Eds. Yahia, E. M., Elsevier, 326-343.

Butler, M. I., Stockwell, P. A., Black, M. A., Day, R. C., Lamont, I. L. e Poulter, R. T. M., 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong to different clones that originated in China. *PloS one*, 8.

Cameron, A. e Sarojini, V., 2014. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives. *Plant Pathology*, 63, 1–11.

Cameron, A., Zoysa, G. H. e Sarojini, V., 2014. Antimicrobial peptides against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *Erwinia amylovora*: Chemical synthesis, secondary structure, efficacy, and mechanistic investigations. *Biopolymers*, 102, 1, 88–96.

Chapman, J. R., Taylor, R. K., Weir, B. S., Romberg, M. K., Vanneste, J. L., Luck, J. e Alexander, B. J. R., 2012. Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytopathology*, 102, 11, 1034–1044.

Cheng, H., Lj, Y., Wan, S., Zhan, J., Ping, Q., Guo, L. e Jiahua, X., 1995. Pathogenic identification of kiwifruit bacterial canker in Anhui. *Journal of Anhui Agricultural University*, 22, 219–223.

Coleman, W. B., 2007. An overview of nucleic acid chemistry, structure, and function: The foundations of Molecular Biology. In *Molecular diagnostics: For the clinical laboratorian*. Coleman, W. B. e Tsongalis, G. J., Springer Science & Business Media, 13-22.

Cunty, A., Poliakoff, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Lemaire, C., Jacques, M. a., Manceau, C. e Vanneste, J. L., 2014. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathology*, 64, 582-596.

DGAV, 2013. *Plano de Ação Nacional para o Controlo da Pseudomonas syringae pv. actinidiae do Kiwi (PSA)*. Direção Geral da Alimentação e Veterinária, 21 pp.

EPPO, 2011a. *First report of Pseudomonas syringae pv. actinidiae in Chile*. EPPO Reporting Service no. 3, 2011/055, European and Mediterranean Plant Protection Organization, 4.

EPPO, 2011b. *First report of Pseudomonas syringae pv. actinidiae in Australia*. EPPO Reporting Service no. 6 Paris, 2011-06-01, European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2.

EPPO, 2011c. *First report of Pseudomonas syringae pv. actinidiae in Switzerland*. EPPO Reporting Service n. 8, Paris 2011-08-01, European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2.

EPPO, 2012. *Pest Risk Analysis for Pseudomonas syringae pv. Actinidiae*. European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris, 50 pp.

EPPO, 2014. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. EPPO Bulletin, 44, 3, 360-375.

Everett, K. R., Taylor, R. K., Romberg, M. K., Rees-George, J., Fullerton, R. A., Vanneste, J. L. e Manning, M. A., 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes*, 6, 1, 67–71.

FAOSTAT, 2015. *Food and agriculture organization of the United Nations - Statistic division*. Site disponível: FAOSTAT, URL: faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E. Consultado em 20 maio 2015.

Félix, A. e Cavaco, M., 2004. Caracterização do ecossistema agrário da cultura da actinídea (*Actinidia deliciosa* A. CHEV.) (Actinidiaceae). In *VII - Encontro Nacional de Protecção Integrada*, Escola Superior Agrária de Coimbra, 1–8.

Ferguson, A., 2013. *Nutritional Benefits of Kiwifruit*. Academic Press, 341 pp.

Ferrante, P., Fiorillo, E., Marcelletti, S., Marocchi, F., Mastroleo, M., Simeoni, S. e Scortichini, M., 2012. The importance of the main colonization and penetration sites of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and prevailing weather conditions in the development of epidemics in yellow kiwifruit, recently observed in central Italy. *Journal of Plant Pathology*, 94, 2, 455–461.

Ferrante, P. e Scortichini, M., 2009. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. *Journal of Phytopathology*, 157, 11-12, 768–770.

Ferrante, P. e Scortichini, M., 2010. Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathology*, 59, 5, 954–962.

Ferrante, P. e Scortichini, M., 2011. Molecular and phenotypic variability among *Pseudomonas avellanae*, *P. syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *theae*: the genomospecies 8 sensu Gardan *et al.* (1999). *Journal of Plant Pathology*, 93, 659–666.

Ferrante, P. e Scortichini, M., 2014. Frost promotes the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* plants. *Plant Pathology*, 63, 1, 12–19.

Frampton, R. A., Taylor, C., Holguín Moreno, A. V, Visnovsky, S. B., Petty, N. K., Pitman, A. R. e Fineran, P. C., 2014. Identification of bacteriophages for the biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 2216–2228.

Gallelli, A., Aurora, A. L. e Loreti, S., 2011a. Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols., 93, 2, 425–435.

Gallelli, A., Talocci, S., L'Aurora e A., Loreti, S., 2011b. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of bacterial canker of kiwifruit, from symptomless fruits and twigs, and from pollen. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 3, 462–472.

Garcia, C. V., Quek, S., Stevenson, R. J. e Winz, R. A., 2012. Kiwifruit flavour: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 24, 82–91.

Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont e F., Grimont, P. A., 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International journal of systematic bacteriology*, 49, 469–78.

Gormez, A. e Sahin, F., 2012. Determination of the pathogenic and non-pathogenic bacteria on stone fruits grown in Northeast Anatolia region of Turkey. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34, 42–50.

Grimont, P. A. D., Vancanneyt, M., Lefèvre, M., Vandemeulebroecke, K., Vauterin, L., Brosch, R., Kersters, K. e Grimont, F., 1996. Ability of Biolog and Biotype-100 systems to reveal the taxonomic diversity of the *Pseudomonads*. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 510–527.

INE, I. P., 2007. *Estatísticas Agrícolas 2006*. Lisboa, Portugal, 117 pp.

INE, I. P., 2008. *Estatísticas Agrícolas 2007*. Lisboa, Portugal, 115 pp.

INE, I. P., 2009. *Estatísticas Agrícolas 2008*. Lisboa, Portugal, 113 pp.

INE, I. P., 2010. *Estatísticas Agrícolas 2009*. Lisboa, Portugal, 125 pp.

INE, I. P., 2011. *Estatísticas Agrícolas 2010*. Lisboa, Portugal, 118 pp.

INE, I. P., 2012. *Estatísticas Agrícolas 2011*. Lisboa, Portugal, 171 pp.

INE, I. P., 2013. *Estatísticas Agrícolas 2012*. Lisboa, Portugal, 180 pp.

INE, I. P., 2013. *Estatísticas Agrícolas 2013*. Lisboa, Portugal, 168 pp.

Khandan, H. e Worner, S., 2013. Predicting the potential global distribution of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa). *New Zealand Plant*, 66, 184–193.

King, E. O., Ward, M. K. e Raney, D. E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 44, 301–7.

Koh, H. S., Kim, G. H., Lee, Y. S., Koh, Y. J. e Jung, J. S., 2014. Molecular characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated in Korea and a Multiplex PCR assay for haplotype differentiation. *Plant Pathology*, 30, 96–101.

Koh, Y. J., Kim, G. H., Jung, J. S., Lee, Y. S. e Hur, J. S., 2010. Outbreak of bacterial canker on Hort16A (*Actinidia chinensis* Planchon) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 38, 275–282.

Koh, Y. J. e Nou, I. S., 2002. DNA markers for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Molecules and cells*, 13, 309–14.

Kunitsky, C., Osterhout, G. e Sasser, M., 2006. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock Microbial Identification System. In: *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, vol. 3, Miller, M. J., PDA/DHI Publishing, 18 pp.

Lelliott, R. A., Billing, E. e Hayward, A. C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 29, 470–89.

Lelliott, R. A. e Stead, D. E., 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. British Society for Plant Pathology, 216 pp.

Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., e Bruijn, F. J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and environmental microbiology*, 60, 2286–95.

Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., Firrao, G. e Scortichini, M., 2011. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* draft genomes comparison reveal strain-specific features involved in adaptation and virulence to *Actinidia* species. *PloS one*, 6, 11, 1–17.

Marcelletti, S. e Scortichini, M., 2011. Clonal outbreaks of bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 93, 479–483.

Marques, A. S. A., Marchaisson, A., Gardan, L. e Samson, R., 2008. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group., 115, 106–115.

Mazarei, M. e Mostofipour, P., 1994. First report of bacterial canker of kiwifruit in Iran. *Plant Pathology*, 43, 1055–1056.

Mazzaglia, A., Renzi, M. e Balestra, G. M., 2011. Comparison and utilization of different PCR-based approaches for molecular typing of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains from Italy. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33, 8–18.

Mazzaglia, A., Studholme, D. J., Taratufolo, M. C., Cai, R., Almeida, N. F., Goodman, T., Guttman, D. S., Vinatzer, B. A. e Balestra, G. M., 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage. *PloS one*, 7, 1–11.

Mellano, M. e Cooksey, D., 2004. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Journal of bacteriology*, 170, 2879–83.

MIDI Inc., 2012. *Sherlock® Microbial Identification System, Version 6.2*. MIS operating manual September 2012, 18 pp.

Mohan, S. K. e Schaad, N. W., 1987. An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *The American Phytopathological Society*, 77, 1390–1395.

Moreira, J. F. e Coutinho, C., 2011. Circular nº19. *Avisos Agrícolas - Estação de avisos de Entre Douro e Minho*, 1-11.

Moreira, J. F. e Coutinho, C., 2014. Circular nº:17/2014. *Avisos Agrícolas – Estação de avisos de Entre Douro e Minho*, 1-6.

Moura, L., 2005. *Diversidade genética e fenotípica de P. corrugata e P. mediterranea, agentes da medula negra do tomateiro. Importância da colonização assintomática e da temperatura no desenvolvimento da doença*. Tese de Doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 291 pp.

Moura, L., 2013. O cancro bacteriano do Kiwi causado por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Vida Rural (março 2014)*, 36–38.

Moura, L., Garcia, E., Aguín, O.; Ares, A.; Abelleira, A.; Mansilla, P., 2014. Identificação e caracterização de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) na Região Entre Douro e Minho. *1º simpósio SCAP e 7º Congresso da SPF - Novos desafios na proteção das plantas*, Oeiras. *in press*.

NCBI, 2014. *Taxonomy browser (Actinidia)*. Site disponível: NCBI, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=3624&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. Consultado em 11 jul. 2014.

Pattemore, D., Goodwin, M., Vanneste, J., McBrydie, H., Yorston, W., Yu, J. e Felman, C., 2013. The presence and survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on honey bees (*Apis mellifera*) that have been in infected kiwifruit (*Actinidia* sp.) orchards. *Plant & Food Research*, 8554, 1–12.

Rees-George, J., Vanneste, J. L., Cornish, D. A., Pushparajah, I. P. S., Yu, J., Templeton, M. D. e Everett, K. R., 2010. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathology*, 59, 3, 453–464.

Reglinski, T., Vanneste, J. L., Wurms, K., Gould, E., Spinelli, F. e Rikkerink, E., 2013. Using fundamental knowledge of induced resistance to develop control strategies for bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Frontiers in plant science*, 4, 24.

Renzi, M., Copini, P., Taddei, A. R., Rossetti, A., Gallipoli, L., Mazzaglia, A. e Balestra, G. M., 2012a. Bacterial canker on kiwifruit in Italy: anatomical changes in the wood and in the primary infection sites. *Phytopathology*, 102, 9, 827–40.

Renzi, M., Mazzaglia, A. e Balestra, G. M., 2012b. Widespread distribution of kiwifruit bacterial canker caused by the European *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* genotype in the main production areas of Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 402–409.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor laboratory Press, 545 pp.

Sarkar, S. F. e Guttman, D. S., 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied and environmental microbiology*, 70, 1999–2012.

Saux, M., 2006a. *Strain CFBP 4909*. Site disponível: Center international de ressources microbiennes, URL: <http://www.straininfo.net/strains/761283/browser>. Consultado em 06 jun. 2015.

Saux, M., 2006b. *Strain CFBP 7286*. Site disponível: Center international de ressources microbiennes, URL: http://www-intranet.angers.inra.fr/cfbp/resultnum_e.php?r0=7286. Consultado em 06 jun. 2015.

Scortichini, M., 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology*, 43, 1035–1038.

Scortichini, M., Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione e M., Firrao, G., 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Molecular plant pathology*, 13, 631–40.

Serizawa, S. e Ichikawa, T., 1993. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit, 3: The seasonal changes of bacterial population in lesions and of its exudation from lesion. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 59, 46.

Slabbinck, B., De Baets, B., Dawyndt, P. e De Vos, P., 2009. Towards large-scale FAME-based bacterial species identification using machine learning techniques. *Systematic and applied microbiology*, 32, 163–76.

Sneath, P. H. e Sokal, R. R., 1973. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification* (2^o ed). WH Freeman, 573 pp.

Spinelli, F., Donati, I., Vanneste, J., Costa, M., Gardini, L. e Costa, G., 2011. Real-time monitoring of the pathogenic interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* and *Actinidia* species. In *VII International Symposium on Kiwifruit*, Costa, G. e Ferguson, International Society for Horticultural Science, Faenza, 461-465.

Stead, D. E., 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 281–295.

Stefani, E., e Giovanardi, D., 2011. Dissemination of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through pollen and its epiphytic life on leaves and fruits. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 489–496.

Suslow, T. V., 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72, 917.

Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S. e Goto, M., 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: The causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, 55, 437–444.

Templeton, M. D., Reinhardt, L. A., Collyer, C. A., Mitchell, R. E. e Cleland, W. W., 2005. Kinetic analysis of the L-ornithine transcarbamoylase from *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* that is resistant to the transition state analogue (R)-N delta-(N'-sulfodiaminophosphinyl)-L-ornithine. *Biochemistry*, 44, 4408–15.

Tontou, R., Giovanardi, D. e Stefani, E., 2014. Pollen as a possible pathway for the dissemination of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and bacterial canker of kiwifruit. *Phytopathologia Mediterranea*, 53, 1–10.

Vanneste, J. L., 2013a. Development of control strategies for *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Plant & Food Research*, 37 pp.

Vanneste, J. L., 2013b. Recent progress on detecting, understanding and controlling *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a short review. *New Zealand Plant Protection*, 66, 170–177.

Vanneste, J. L., Cornish, D. A., Yu, J. e Rivoal, C., 2011a. Presence of the effector gene hop A1 in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated from France and Italy. *New Zealand Plant Protection*, 64, 252–258.

Vanneste, J. L., Giovanardi, J., Yu, J., Cornish, D. A., Kay, C., Spinelli, F. e Stefani, E., 2011b. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit pollen samples. *New Zealand Plant Protection*, 64, 246–251.

Vanneste, J. L., Moffat, B. J. e Oldham, J. M., 2012. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on *Cryptomeria japonica*, a non-host plant used as shelter belts in kiwifruit orchards. *New Zealand Plant Protection*, 65, 1–7.

Vanneste, J. L., Oldham, J. M., Clark, G. e Felman, C. M., 2013a. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in non-kiwifruit green compost. *New Zealand Plant Protection*, 66, 178–183.

Vanneste, J. L., Poliakoff, F., Audusseau, C., Cornish, D. a., Paillard, S., Rivoal, C. e Yu, J., 2011c. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in France. *Plant Disease*, 95, 10, 1311–1311.

Vanneste, J. L., Yu, J. e Cornish, D. A., 2011d. Recent advances in the characterisation and control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker on kiwifruit. . In *VII International Symposium on Kiwifruit*, Costa, G. e Ferguson, International Society for Horticultural Science, Faenza, 443-455.

Vanneste, J. L., Yu, J. e Cornish, D. A., 2013b. Identification, virulence, and distribution of two biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. *Plant Disease*, 97, 708–719.

Vanneste, J. L., Yu, J., Cornish, D. A., Max, S. e Clark, G., 2011e. Presence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, on symptomatic and asymptomatic tissues of kiwifruit. *New Zealand Plant Protection*, 64, 241-245.

Vanneste, J. L., Yu, J., Cornish, D. A. e Zydenbos, S. M., 2010. Molecular characterisations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated from the recent outbreak of bacterial canker on kiwifruit in Italy. *New Zealand Plant Protection*, 63, 7–14.

Walker, J. e Rapley, R., 2009. *Molecular Biology and Biotechnology*. The Royal Society of Chemistry, 585 pp.

Yan, J., Cui, Y., Ding, J., Zhou, L., Cheng, Z. e Zhang, M., 2013. Isolation and identification of the causal pathogens for kiwifruit bacterial canker and the isolation of the antagonistic endophytic fungi from kiwifruit in Sichuan, China. *Journal of Agricultural Science*, 5, 7, 262-268.

Anexo I – Meios de cultura e reagentes utilizados

1. Meio de cultura B de King modificado (KBC) (Mohan *et al.*, 1987)

Reagentes	Quantidade
Meio B de King	37 g
Glicerina	10 ml
Água destilada	900 ml
Ácido bórico (1,5 %)	100 ml
Ciclohexamida em 12,5% de metanol	8 ml
Cefalexina (10 mg/ml)	8 ml

2. Meio de cultura B de King (King *et al.*, 1954)

Reagentes	Quantidade
Meio B de King	37 g
Glicerina	10 ml
Água destilada	900 ml

3. Meio GYCA (Moura, 2005)

Reagentes	Quantidade
Estrato de Levedura	5,0 g
Glucose	5,0 g
Carbonato de cálcio	40,0 g
Agar bacteriológico	15,0 g
Água destilada	1000 ml

4. Hidróxido de Potássio (3%) (Suslow, 1982)

Reagentes	Quantidade
KOH (hidróxido de potássio)	3,0 g
Água destilada	100 ml

5. Meio para o teste à produção de Levana

Reagentes	Quantidade
Extrato de levedura	2 g
<i>Bio-Gelitona</i>	5 g
Sacarose	50 g
Agar bacteriológico	15 g
Água destilada	1000 ml

6. Reagente para teste de oxidase (1%)

Reagentes	Quantidade
$C_{10}H_{18}Cl_2N_2$	1,0 g
Água destilada	100 ml

7. Meio utilizado para o teste da Hidrólise da Arginina

Reagentes	Quantidades
Bacto Peptona	1,0 g
Cloreto de Sódio (NaCl)	5,0 g
K_2HPO_4 (dipotássio hidrogenofosfato anydro)	0,3 g
Agar bacteriológico	3,0 g
Vermelho de fenol	0,01 g
Arginina mono hidrocloreto (HCl)	10,0 g
Água destilada	1000 ml

8. Meio de Paton para o teste da atividade pectinolítica (Lelliott e Stead, 1987)

Base		Camada superior	
Reagentes	Quantidades	Reagentes	Quantidades
Peptona	5,0 g	Polipectato de sódio	2,0 g
Lab-lemco	5,0 g	Etilenodiaminotetraacético Sal Dissódico (EDTA Na ₂ Sal)	0,01 g
Lactato de cálcio	5,0 g	Azul de bromotimol	Suficiente para colorar
Agar bacteriológico	12,0 g	Água destilada	100 ml
Água destilada	1.		

9. Meio TSBA (Trypticase Soy Broth Agar)

Reagentes	Quantidade
<i>Trypticase soy broth</i>	30 g
Agar granulado	15 g
Água destilada	1000 ml

10. Reagente de Saponificação

Reagentes	Quantidade
Hidróxido de sódio (NaOH)	45 g
Metanol	150 ml
Água destilada	150 ml

11. Reagente de Metilação

Reagentes	Quantidade
Ácido clorídrico	325 ml
Metanol	275 ml

12. Solvente de extração

Reagentes	Quantidade
Exano	200 ml
Éter metil-terc-butílico	200 ml

13. Base de lavagem

Reagentes	Quantidade
Hidróxido de sódio	10,8 g
Água destilada	900 ml

14. Tampão de carga

Reagentes	Quantidade
Sacarose	40 g
Azul de bromofenol	100 ml
Água destilada	0,25 g

15. Gel de Agarose (1,5%)

Reagentes	Quantidade
TBE 0,5x	100 ml
Agarose	1,5 g
<i>gelRed Nucleic Acid</i>	10 µl

16. Gel de Agarose (2%)

Reagentes	Quantidade
TBE 0,5x	80 ml
Agarose	1,6 g

17. Gel de Agarose (3%)

Reagentes	Quantidade
TBE 0,5x	80 ml
Agarose	2,4 g

18. Tampão de carga

Reagentes	Quantidade
Sacarose	40 g
Azul de bromofenol	100 ml
Água destilada	0,25 g

19. Tryptophan Soy Broth (TSB)

Reagentes	Quantidade
Tryptophan Soy Broth (TSB)	30 g
Agar bacteriológico	6 ml
Água destilada	1000 ml

20. Tryptophan Soy Agar (TSA)

Reagentes	Quantidade
Tryptophan Soy Agar (TSA)	30 g
Água destilada	1000 ml

21. Marcador 1Kb DNA Ladder

Marca: gal company

Escala: 100-1500

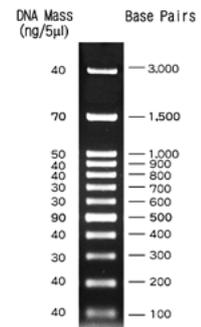
Nº de bandas: 11

22. 100bp DNA Ladder RTU (NIPPON Genetics)

Marca: NIPPON Genetics

Escala: 100-3000 pares de bases

Número de bandas: 12

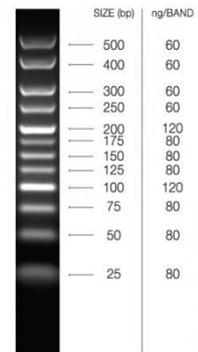


23. HyperLadder™ 25bp

Marca: BIOLINE

Escala: 25-500 pares de bases

Número de bandas: 12



ANEXO II – Sistema Biolog

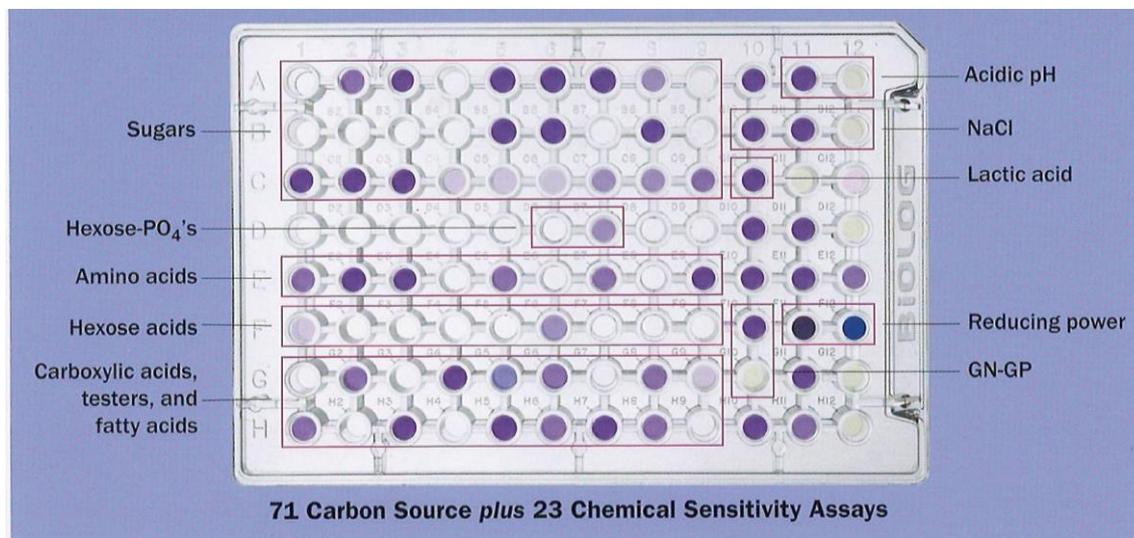


Figura 1. Conjunto de testes fenotípicos presentes numa microplaca de Biolog GEN III (Biolog, 2011).

A1 Negative Control	A2 Dextrin	A3 D-Maltose	A4 D-Trehalose	A5 D-Cellobiose	A6 Gentiobiose	A7 Sucrose	A8 D-Turanose	A9 Stachyose	A10 Positive Control	A11 pH 6	A12 pH 5
B1 D-Raffinose	B2 α -D-Lactose	B3 D-Melibiose	B4 β -Methyl-D-Glucoside	B5 D-Salicin	B6 N-Acetyl-D-Glucosamine	B7 N-Acetyl- β -D-Mannosamine	B8 N-Acetyl-D-Galactosamine	B9 N-Acetyl Neuraminic Acid	B10 1% NaCl	B11 4% NaCl	B12 8% NaCl
C1 α -D-Glucose	C2 D-Mannose	C3 D-Fructose	C4 D-Galactose	C5 3-Methyl Glucose	C6 D-Fucose	C7 L-Fucose	C8 L-Rhamnose	C9 Inosine	C10 1% Sodium Lactate	C11 Fusidic Acid	C12 D-Serine
D1 D-Sorbitol	D2 D-Mannitol	D3 D-Arabitol	D4 myo-Inositol	D5 Glycerol	D6 D-Glucose-6-PO4	D7 D-Fructose-6-PO4	D8 D-Aspartic Acid	D9 D-Serine	D10 Troleandomycin	D11 Rifamycin SV	D12 Minocycline
E1 Gelatin	E2 Glycyl-L-Proline	E3 L-Alanine	E4 L-Arginine	E5 L-Aspartic Acid	E6 L-Glutamic Acid	E7 L-Histidine	E8 L-Pyroglytamic Acid	E9 L-Serine	E10 Lincomycin	E11 Guanidine HCl	E12 Niaproof 4
F1 Pectin	F2 D-Galacturonic Acid	F3 L-Galactonic Acid Lactone	F4 D-Gluconic Acid	F5 D-Glucuronic Acid	F6 Glucuronamide	F7 Mucic Acid	F8 Quinic Acid	F9 D-Saccharic Acid	F10 Vancomycin	F11 Tetrazolium Violet	F12 Tetrazolium Blue
G1 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	G2 Methyl Pyruvate	G3 D-Lactic Acid Methyl Ester	G4 L-Lactic Acid	G5 Citric Acid	G6 α -Keto-Glutaric Acid	G7 D-Malic Acid	G8 L-Malic Acid	G9 Bromo-Succinic Acid	G10 Nalidixic Acid	G11 Lithium Chloride	G12 Potassium Tellurite
H1 Tween 40	H2 γ -Amino-Butyric Acid	H3 α -Hydroxy-Butyric Acid	H4 β -Hydroxy-D,L-Butyric Acid	H5 α -Keto-Butyric Acid	H6 Acetoacetic Acid	H7 Propionic Acid	H8 Acetic Acid	H9 Formic Acid	H10 Aztreonam	H11 Sodium Butyrate	H12 Sodium Bromate

Figura 2. Testes fenotípicos presentes numa microplaca de Biolog GEN III (Biolog, 2011)

