



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE REAÇÃO ISOTÉRMICA DO TIPO
LAMP USANDO GENÔMICA COMPARATIVA PARA A
DETECÇÃO DO PATÓGENO BACTERIANO *Erwinia psidii***

ALICE MARIA SILVA DE CARVALHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA/DF

MAIO/2024

ALICE MARIA SILVA DE CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO DE REAÇÃO ISOTÉRMICA DO TIPO LAMP USANDO
GENÔMICA COMPARATIVA PARA A DETECÇÃO DO PATÓGENO
BACTERIANO *Erwinia psidii***

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia.

Orientador

Maurício Rossato

BRASÍLIA

DISTRITO FEDERAL - BRASIL

2024

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho ao meu marido Ian e a nossa filha Luísa,
vocês foram minha força para chegar até aqui.*

“Nós iremos ocasionalmente nos lembrar de que o que pensamos ser a nossa maior fraqueza, pode ser a nossa maior força. E que a pessoa mais improvável, pode alterar o curso da história.”

Sarah J Maas

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me direcionado e sustentado até aqui, e em toda a minha trajetória acadêmica.

Agradeço ao meu marido, Ian, por todo o trabalho em conjunto, todos os ensinamentos, por sua amizade, amor, cuidado e companheirismo, sem os quais eu não teria obtido sucesso nessa jornada.

Agradeço aos meus pais, Janeide e Flávio, por todo amor, por ter acreditado no meu potencial, se dedicado e investido, ao longo de minha vida, ao meu crescimento pessoal e desenvolvimento profissional.

Agradeço às minhas irmãs, Amanda e Ana Sophia, por estarem ao meu lado em todas as situações e momentos, me proporcionando força para concluir mais essa etapa em minha vida.

Agradeço ao meu orientador e professor doutor Maurício Rossato, que acreditou em meu potencial. Pela sua paciência e compreensão. E, por todos os direcionamentos e orientações ao longo de todo o meu trabalho. Vi nele alguém de um coração tão grande, amável e que busca ajudar a todos e, com certeza, levarei os ensinamentos passados por ele, por toda a minha vida.

Agradeço às minhas amigas Ana Vigília e Daniele, obrigada por todo apoio, ajuda, conselhos, risadas, amor e companheirismo. Vocês tornaram essa jornada acadêmica mais leve e me ensinaram muito sobre amizade verdadeira, serei eternamente grata a Agronomia por ter me dado esta família.

Agradeço todo o corpo docente da Universidade Federal de Brasília, por todo o ensinamento e trocas de experiências passadas ao longo desses anos de curso.

Agradeço a todos os colegas do departamento de pós-graduação em fitopatologia da Universidade de Brasília, pelo bom convívio, companheirismo e auxílio no meu desenvolvimento de novos conhecimentos. Em especial, agradeço os meus colegas do laboratório de bacteriologia: Luciellen, Angelica, Julieth e Erivaldo.

Agradeço a CAPES por financiar o presente projeto de pesquisa.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Professor Maurício Rossato**, com apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

**DESENVOLVIMENTO DE REAÇÃO ISOTÉRMICA DO TIPO LAMP USANDO
GENÔMICA COMPARATIVA PARA A DETECÇÃO DO PATÓGENO
BACTERIANO *Erwinia psidii***

ALICE MARIA SILVA DE CARVALHO

TESE OU DISSERTAÇÃO APROVADA em 09/05/2024 por:

Dra. Angela Mehta dos Reis

Examinador interno

Dra. Adriane Wendland Ferreira

Examinador externo

Prof. Dr. Maurício Rossato

Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL

2024

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	9
GENERAL ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Culturas da goiaba e do eucalipto	12
2.2. Histórico e distribuição	14
2.3. O agente causal, Error! Bookmark not defined.	
2.4. Doença e sintomatologia	17
2.5. Hospedeiras	19
2.6. Ciclo da doença e epidemiologia	19
2.7. Diagnose	21
2.8. Controle	25
2.9. 20	
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS	29
4.1. Objetivo Geral	29
4.2. Objetivos específicos	29
5. MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1. Recuperação de bactéria preservada em água destilada estéril	29
5.2. Extração de DNA	29
5.3. Seleção de regiões genômicas e desenho de 24	
5.4. Ensaio LAMP	32
5.5. Teste de sensibilidade	34
6. RESULTADOS	34
6.1. Seleção de regiões genômicas e desenho de 28	
6.2. Otimização do ensaio LAMP	38
6.3. Sensibilidade	43
7. DISCUSSÃO	44
8. CONCLUSÃO	50
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Symptoms caused by *Erwinia psidii* in guava and eucalyptus seedlings. Photo: Pollyane da Silva Hermenegildo. 18
- Figura 2.** Representation of the wilt dieback cycle caused by *Erwinia psidii*. A) Propagative material: Wounds or natural openings, infected seedlings, plant residues. B) Pathogen entry under favorable conditions. C) Colonization of host plant tissues with longitudinal cuts showing leaf colonization, where: C.1 = ep = epidermis, pp = palisade parenchyma, sp = spongy parenchyma, cv = conducting vessels (red - xylem, blue - phloem). C.2 = Colonization of parenchyma tissues. C.3 = Colonization in xylem vessels, ob = vessel obstruction; g = biofilm. D) Symptoms. 21
- Figura 3.** Fluxograma representando o processo de desenvolvimento e seleção dos conjuntos de primers LAMP. 30
- Figura 4.** Representação esquemática do processo de amplificação e subsequente liberação de prótons H⁺ na reação LAMP. Etapa 1 - Reação está com todos os seus reagentes ainda na coloração rosa do vermelho fenol devido o pH elevado. Etapa 2 - reação com DNA mole, Bst dna polimerase, primers e dNTPs que serão submetidos a temperatura de 65 °C. Etapa 3 - Liberação de íons de hidrogênio durante a síntese da fita complementar ao DNA molde durante a reação isotérmica. Etapa 4 - A liberação de íons de hidrogênio acidifica a reação ocasionando a mudança de cor da reação de rosa para amarelo. 33
- Figura 5.** Representação esquemática da posição e sequência dos primers LAMP desenhados dentro das sequências de nucleotídeos. Em amarelo os primers externos (F3, B3) e em laranja os primers internos (FIP, BIP). 37
- Figura 6.** Ensaio LAMP utilizando a proporção de primers 4:1 sem primers loop a temperatura de 60 °C em diferentes intervalos de tempo com o DNA do isolado tipo de *Erwinia psidii*, IBSBF 435. O produto de amplificação do DNA foi visualizado pela mudança de cor do corante indicador de pH (esquerda) e por eletroforese em gel de agarose (direita). M: DNA Ladder 1 kb Plus (Invitrogen), NC: Controle negativo. 39
- Figura 7.** Ensaio LAMP utilizando a proporção de primers 4:1 sem primers loop a temperatura de 65 °C em diferentes intervalos de tempo com o DNA do isolado tipo de *Erwinia psidii*, IBSBF 435. O produto de amplificação do DNA foi visualizado pela mudança de cor do corante indicador de pH (esquerda) e por eletroforese em gel de agarose (direita). M: DNA Ladder 1 kb Plus (Invitrogen), NC: Controle negativo. 40
- Figura 8.** Ensaio LAMP utilizando a proporção de primers 4:1 com primers loop em diferentes intervalos de tempo com o DNA do isolado tipo de *Erwinia psidii*, IBSBF 435. O produto de amplificação do DNA foi visualizado pela mudança de cor do corante indicador de pH (esquerda) e por eletroforese em gel de agarose (direita). M: DNA Ladder 1 kb Plus (Invitrogen), NC: Controle negativo. 42
- Figura 9.** Ensaio LAMP utilizando a proporção de primers 8:1 com primers loop em diferentes intervalos de tempo com o DNA do isolado tipo de *Erwinia psidii*, IBSBF 435. O produto de amplificação do DNA foi visualizado pela mudança de cor do corante indicador de pH (esquerda) e por eletroforese em gel de agarose (direita). M: DNA Ladder 1 kb Plus (Invitrogen), NC: Controle negativo. 43
- Figura 10.** Sensibilidade do ensaio LAMP utilizando diferentes diluições do DNA genômico do isolado tipo de *Erwinia psidii*, IBSBF 435, variando de 10 ng μL^{-1} a 1×10^{-5} ng μL^{-1} . O produto da amplificação do DNA foi visualizado pela mudança de cor do corante indicador de pH. NC: Controle negativo. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista das sequências genômicas dos fitopatógenos usados para a análise comparativa e busca por regiões exclusivas para <i>Erwinia psidii</i> .	31
Tabela 2. Conjuntos de primers LAMP desenhados para <i>Erwinia psidii</i> e suas sequências.	35
Tabela 3. Identificação das sequências alvo utilizadas para desenho dos conjuntos de primers e seus resultado do Primer Blast.	38

RESUMO GERAL

CARVALHO, Alice Maria Silva de. **Desenvolvimento de reação isotérmica do tipo LAMP usando genômica comparativa para a detecção do patógeno bacteriano *Erwinia psidii***. 2024. Número de páginas (68p). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A seca dos ponteiros, doença bacteriana causada por *Erwinia psidii*, é considerada uma importante doença da cultura da goiabeira (*Psidium guajava* L.) e do eucalipto (*Eucalyptus* spp.), chegando a causar entre 30 e 85% de perdas, é um dos principais fatores limitantes da produção. Uma vez que a principal forma de disseminação da doença é através de material vegetal propagativo assintomático, métodos sensíveis, rápidos e acurados para a detecção do patógeno em plantas assintomáticas são necessários para a diagnose precoce. Assim, o objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de um ensaio de detecção molecular de amplificação isotérmica (LAMP) para detecção de *Erwinia psidii* na cultura da goiaba e do eucalipto. Em busca de regiões genômicas exclusivas para *E. psidii*, foi realizada a análise de genômica comparativa com o *software* RUCS, comparando as sequências do alvo juntamente com as regiões de diversos agentes fitopatogênicos que acometem as culturas da goiaba e do eucalipto. Das 842 regiões exclusivas, somente as cinco com maior potencial foram usadas para o desenho de conjuntos de *primers*. Além dessas, a região *recA*, anteriormente usada para o desenvolvimento de *primers* específicos para PCR convencional e qPCR, também foi selecionada. Os sete conjuntos de *primers* foram desenhados na plataforma NEB® LAMP Primer Design Tool. A verificação de compatibilidade dos *primers* foi realizada utilizando o isolado tipo IBSBF435, onde foram avaliadas duas temperaturas (60 e 65 °C) e seis intervalos de tempo (30, 40, 50, 55, 60 e 75 minutos). A temperatura de 65 °C, com mudança de cor para quatro dos sete conjuntos, a partir de 50 minutos. Em seguida, foi realizado um ensaio para examinar a proporção entre *primers* internos e externos para aprimorar o LAMP. A proporção 8:1 (mais diluído) foi capaz de resultar em amplificação três dos quatro conjuntos, enquanto na concentração de 4:1, todos os quatro conjuntos foram capazes de amplificação. A sensibilidade do conjunto de *primers* mais promissor (*Ep19*) foi testada com seis diluições do DNA extraído do isolado tipo, entre 10 e 1×10^{-5} ng. μL^{-1} . O ensaio alcançou a sensibilidade para detectar até 1×10^{-4} ng. μL^{-1} . O ensaio LAMP desenvolvido neste estudo demonstrou ser um método rápido e eficaz para a detecção de *Erwinia psidii* em laboratório, além de detectar o DNA de *E. psidii* em baixas concentrações, demonstrando uma alta sensibilidade.

Palavras-chave: amplificação isothermal mediada por loop, diagnose, seca dos ponteiros.

Orientador – Maurício Rossato – Universidade de Brasília

GENERAL ABSTRACT

CARVALHO, Alice Maria Silva de. **Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) reaction using comparative genomics for the detection of the bacterial pathogen *Erwinia psidii***. 2024. Number of pages (68p) Dissertation (Master in Plant Pathology) Universidade de Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

The bacterial disease known as "dieback" or "wilt dieback", caused by *Erwinia psidii*, is considered a significant threat to both guava (*Psidium guajava* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus* spp.) crops, causing losses ranging from 30 to 85%. It is one of the main limiting factors in production. Since the primary mode of disease transmission is through asymptomatic propagative plant material, sensitive, rapid, and accurate methods for detecting the pathogen in asymptomatic plants are necessary for early diagnosis. Therefore, the objective of this study is to develop a molecular detection assay using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the detection of *Erwinia psidii* in guava and eucalyptus crops. Comparative genomic analysis using the RUCS software was conducted to identify unique genomic regions specific to *E. psidii*, comparing target sequences with regions of various phytopathogenic agents affecting guava and eucalyptus crops. Among the 842 unique regions identified, only the top five with the highest potential were used for primer set design. Additionally, the *recA* region, previously used for developing specific primers for conventional PCR and qPCR, was also selected. Seven primer sets were designed using the NEB® LAMP Primer Design Tool. Primer compatibility verification was performed using the IBSBF435 isolate, evaluating two temperatures (60 and 65 °C) and six time intervals (30, 40, 50, 55, 60, and 75 minutes). At 65 °C, color change occurred for four out of the seven primer sets after 50 minutes. Subsequently, an assay was conducted to examine the ratio between internal and external primers to optimize LAMP. The ratio of 8:1 (more diluted) resulted in amplification of three out of the four primer sets, while at a ratio of 4:1, all four primer sets were able to amplify. The sensitivity of the most promising primer set (Ep19) was tested with seven dilutions of DNA extracted from the isolate, ranging from 10 to 1×10^{-5} ng. μL^{-1} . The assay achieved sensitivity to detect up to 1×10^{-4} ng. μL^{-1} . O ensaio alcançou a sensibilidade para detectar até 1×10^{-4} ng. μL^{-1} . The LAMP assay developed in this study has proven to be a rapid and effective method for detecting *Erwinia psidii* in the laboratory, as well as detecting *E. psidii* DNA at low concentrations, demonstrating high sensitivity.

Keywords: Diagnosis, dieback, loop-mediated isothermal amplification.

Advisor: Maurício Rossato – Universidade de Brasília.

INTRODUÇÃO GERAL

A *Erwinia psidii* é o agente etiológico da seca dos ponteiros, doença que acomete a goiabeira (*Psidium guajava* L.) e o eucalipto (*Eucalyptus* sp.). Caracterizada como uma bactéria Gram-negativa, bastonetiforme com flagelos peritríquios, foi estabelecida como espécie nova em 1987 após cinco do início da observação de sintomas relacionados a seca dos ponteiros em goiabeira no estado de São Paulo. Posteriormente a doença se disseminou para os estados do Espírito Santo, Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais, estando presente em quase todos os estados produtores de goiaba. Em 2011, a bactéria foi identificada causando a seca dos ponteiros em eucalipto.

Na goiabeira, os sintomas incluem murcha e escurecimento dos ramos, folhas e flores, com seca dos ponteiros e necrose dos frutos. Embora a planta raramente morra, a perda de frutos é significativa. No eucalipto, observa-se bronzeamento das nervuras foliares, morte das folhas, lesões encharcadas e descoloração do xilema. A murcha pode afetar toda a copa, especialmente em clones suscetíveis, levando à morte de plantas jovens e redução do crescimento.

Estima-se que a doença pode causar perdas entre 30 e 85% de perdas em ambas as culturas. Sabendo que a principal forma de disseminação da doença é através de material propagativo contaminado, o monitoramento da doença e prevenção da entrada do patógeno torna-se fundamental. Deste modo, visando alcançar o desenvolvimento de um método de detecção rápido, sensível, específico e de baixo custo, o LAMP, *loop-mediated isothermal amplification*, se apresenta como uma técnica promissora para determinação precoce da presença de *Erwinia psidii* em plantas de goiaba e eucalipto.

CAPÍTULO 1

***Erwinia psidii*, a host jumping pathogen in expansion through South America**

1. INTRODUCTION

The guava (*Psidium guajava* L.) is a fruit of great importance in the national market, standing out for its fresh consumption and its use in the agro-industry for the production of juices, sweets, preserves, pulps, and other processed products. Meanwhile, eucalyptus (*Eucalyptus* spp.) is the main species used in Brazil's plantation tree industry, a sector that has stood out due to exponential growth. This has made the country the second-largest producer of cellulose in the world, as well as one of the top 10 paper producers globally. Despite the economic and social importance of these plant species, there are challenges affecting their productivity, particularly plant diseases.

Diseases affecting both genera of the Myrtaceae family can be caused by various etiological agents, such as fungi and bacteria. These pathogens affect the stem, leaves, and fruits, directly compromising production. Notable diseases affecting these crops include wilt dieback, myrtle rust, anthracnose, bacterial spot, and bacterial wilt of eucalyptus.

Wilt dieback is caused by *Erwinia psidii*, a Gram-negative bacterium initially detected in guava and later in eucalyptus, and it can affect other species in the Myrtaceae family. Its symptoms directly affect fruits and stems, as well as other plant organs that indirectly influence yield, posing a threat to productivity in orchards and planted forest areas. The bacterium typically presents its symptoms within the first two years after planting seedlings in the field. During this period, symptoms can be more severe, leading to sudden wilting and plant death.

Therefore, early detection of the pathogen is crucial, especially since there is currently no effective control for *Erwinia psidii*. Detection methods such as nutritional tests, serological tests, and molecular techniques like PCR, BIO-PCR, IC-PCR, and qPCR have been used for this purpose.

1.1. Cultures of Guava and Eucalyptus

The botanical family Myrtaceae comprises approximately 102 genera and 3024 species distributed across various regions of the world, predominantly in the Americas and Oceania. Among these genera, notable examples include *Psidium* and *Eucalyptus* (Mânica et al. 2000). The genus *Psidium* is believed to have originated in the Americas, with the guava tree (*Psidium guajava* L.) being the most prominent species within this genus, owing to its significant economic importance attributed to fruit production (Mânica et al. 2000). The genus *Eucalyptus* is native to Australia, Tasmania, and other islands in Oceania, and has been extensively exploited by the timber industry (IBÁ, 2022). Presently, the most cultivated eucalyptus species include *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, hybrids such as *E. urograndis* (*E. grandis* x *E. urophylla*), *E. dunnii*, *E. camaldulensis*, and *E. pellita* (Resende et al. 2022).

Horticulture stands out as a prominent sector within agriculture, with Brazil internationally recognized as the third largest fruit producer globally and the leading producer of red guavas. Guava production is particularly notable in the Brazilian market due to its substantial consumption *in natura*. Additionally, the fruit is extensively utilized in the food processing industry for the production of juices, sweets, pulps, jams, and preserves (Freitas & Borém, 2021). In 2022, Brazilian guava production surpassed 500 thousand tons, with a production value of approximately 1.1 million Brazilian reais (IBGE, 2024).

Exports of guava do not hold significant positions in the market, as guava is a fruit with limited commercialization in the global agricultural scenario. This is attributed to the preference of consumers in European Union and North American countries for guavas with white pulp, whereas Brazilian production predominantly consists of guavas with red pulp. Additionally, guava is considered an exotic fruit and is marketed at high prices. Consequently, processed products derived from guava also have a limited market, being regarded as exotic items (Freitas & Borém, 2021).

Eucalyptus production has experienced exponential growth owing to the high demands in cellulose production, charcoal production, and wood panel manufacturing (Resende et al. 2022). The economic significance of eucalyptus is primarily derived from its high productivity, versatility of use, and generation of high-quality products (IBÁ, 2022; Resende et al. 2022).

The forest-based industry in Brazil has experienced exponential growth, with a cultivated area of approximately 9.93 million hectares consisting of planted trees harvested and replanted in previously degraded areas (IBÁ, 2022). Moreover, it is forecasted that between 2022 and 2028, this sector will receive over 60 billion Brazilian reais in investments. The planted tree segment has seen a growth of 6.3%, surpassing the national GDP, with a production value of approximately R\$260 billion (IBÁ, 2023).

Among the species constituting the planted forest area, eucalyptus cultivation accounts for 76%, pine for 19%, and other woody species for 5%. Brazil ranks first in the global export of cellulose, the main product of planted forests, reaching a value of 8.4 billion dollars in 2022 (IBÁ, 2023).

However, the increased exploitation of these plantations and the expansion of cultivated areas to warm and humid locations contribute to the rise of infections caused by phytopathogenic agents (Mânica et al. 2000; Resende et al. 2022). Among the diseases affecting guava and eucalyptus, wilt dieback is noteworthy, a bacteriosis caused by *Erwinia psidii*, which is highlighted as one of the main limiting factors of production as it directly affects the commercial segment of the plant (Manica et al. 2000; Resende et al. 2022). It is estimated that losses in eucalyptus can range between 30 and 50% of plants dying in the stand (Arriel et al. 2014; Borges-Junior et al. 2020), while in guava, it causes losses of around 60 to 85% (Romeiro et al. 1994; Oliveira et al. 2000). Although not yet described in other guava-producing countries, it is considered a potential risk for India, Egypt, Mexico, and Pakistan (Janse, 2012).

1.2. Historical Background and Distribution

Since 1982, a new bacterial disease of previously unknown etiology was observed in guava orchards in the municipalities of Valinhos and Pindamonhangaba in the state of São Paulo (Rodrigues Neto et al. 1987). In 1987, for the identification of the etiological agent, phenotypic characterization and biochemical and nutritional tests were conducted, including Gram staining, catalase production, pectate degradation, hypersensitivity reaction in tobacco leaves, acid production from mannitol and raffinose, nitrate reduction to nitrite, and urease production (Rodrigues Neto et al. 1987). Based on these results, the bacterium was compared with *Erwinia amylovora*, *Brenneria rubrifaciens* (syn. *E. rubrifaciens*), *Brenneria salicis* (syn. *E. salicis*), *E. tracheiphilia*, *Brenneria nigrifluens* (syn. *E. nigrifluens*), *E. nolandii*, *E. mallotivora*, and *Lonsdalea quercina* (syn. *E. quercina*), which supported the hypothesis that it was a new species (Rodrigues Neto et al. 1987). Thus, it was proposed that the bacterium would be a new species belonging to the genus *Erwinia*, and the species *Erwinia psidii* was proposed as the etiological agent of wilt dieback (Rodrigues Neto et al. 1987).

Subsequently, the occurrence of this new bacterial pathogen was reported in Minas Gerais (Romeiro et al. 1994), Espírito Santo (Oliveira et al. 2000), the Federal District (Uesugi et al. 2001), Paraná (Coelho et al. 2002), and Goiás (Coelho et al. 2002).

In 2009, eucalyptus plants in Brazil and Uruguay began to show symptoms of wilt dieback, leaf death, and the presence of a whitish exudate when the stem was cut transversely (Alfenas et al. 2009; Coutinho et al. 2011). However, it was not possible to determine the etiology of the wilt dieback, and the cause was attributed to abiotic factors (Alfenas et al. 2009). Two years later, the same symptoms were reported in eucalyptus plants in Argentina and Uruguay (Coutinho et al. 2011). Thus, bacterial strains were isolated from the exudate present in symptomatic plants of *Eucalyptus grandis*, *E. dunnii*, *E. globulus*, and *E. maidenii*, and subsequently characterized for Gram staining, Hugh-Leifson test using oxidative fermentative

medium, hypersensitivity reaction in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. samsun), pathogenicity test using seedlings of *Eucalyptus grandis*, and sequencing of the 16S rRNA, *gyrB*, and *rpoB* genes (Coutinho et al. 2011). From this procedure, it was found that the pathogen responsible for the disease in eucalyptus was *E. psidii* (Coutinho et al. 2011).

In 2014, the occurrence of *E. psidii* was confirmed in eucalyptus crops in Três Lagoas (MS), Lençóis Paulistas (SP), Guaíba, and Rosário do Sul (RS) in Brazil (Arriel et al. 2014). For this purpose, bacterial strains were isolated from symptomatic plants and characterized for partial sequence of the 16S rRNA gene, phylogenetic analyses of the housekeeping genes *gapA*, *recA*, and *rpoB*, as well as biochemical tests, hypersensitivity reaction in tobacco (*Nicotiana tabacum*), and pathogenicity test with seedlings of the hybrid *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (Arriel et al. 2014).

Subsequently, the presence of *Erwinia psidii* was reported in Malaysia associated with papaya dieback (Chai et al. 2017), although only the partial sequence of the 16S rRNA gene was used for identification, an unreliable method for species determination (Gao et al. 2017). In addition, Caires et al. (2019) performed tests by controlled inoculation in seedlings of various botanical species and did not observe symptoms caused by *Erwinia psidii* in papaya. Also, there are already other species of *Erwinia* which can infected papaya plants, as *E. papaya* (Maktar et al. 2008) and *E. mallotivora* (Noriha et al. 2010).

1.3. The Causal Agent, *Erwinia psidii*

The bacterium *Erwinia psidii* belongs to the Kingdom Bacteria, Phylum Pseudomonadota, Class Gammaproteobacteria, Order Enterobacterales, Family Erwiniaceae, and genus *Erwinia* (Garrity et al. 2001). Morphologically, the cells are rod-shaped with peritrichous flagella, and colonies appear whitish, circular, and shiny, with edges that may vary from smooth to rough (Rodrigues Neto et al. 1987). Biochemically, it is described as Gram-

negative, facultatively anaerobic, non-pectolytic, with a negative reaction to hypersensitivity on tobacco leaves. Average growth occurs between 48 and 72 hours (Rodrigues Neto et al. 1987). It has positive results for acid production from mannitol and negative results for raffinose, in addition to showing positive catalase production (Rodrigues Neto et al. 1987).

The complete genome was sequenced using the NovaSeq 6000 Illumina platform (Hermenegildo et al. 2019). Currently, four complete genomes are available in GenBank (RHHM01, RQSA01, RQRZ01, RQSB01). The genome size averages around 4.5 Mb with a G+C content of approximately 51%, comprising a single chromosome with no detected presence of plasmids (Hermenegildo et al. 2019).

Analysis of *E. psidii* genomes identified complete sets of virulence-associated genes. By comparing them with effector genes previously described in various species of phytopathogenic bacteria, evolutionary relationships between *E. psidii* and other phytopathogenic bacteria were established, including potential horizontal gene transfer events with *Pantoea agglomerans* (Pereira et al. 2021). In a subsequent study, the clustering of *hrp/hrc* genes and effectors in *E. psidii* genomes was investigated, highlighting their integrity and greater similarity to *E. amylovora* regarding organization and genetic composition. Furthermore, some proteins from the T3SE families identified in the genomes of the four *E. psidii* strains analyzed had already been characterized as T3SE effectors in other bacterial species (Alves et al. 2023). It is important to note that variations in effector gene sequences among *E. psidii* species were observed, which could explain the different levels of aggressiveness of *E. psidii* isolates on eucalyptus clones (Pereira et al. 2021; Alves et al. 2023).

1.4. Disease and Symptomatology

The disease, wilt dieback, can cause a variety of symptoms among its hosts, with symptoms typically observed on leaves, stems, shoots, floral buds, and young or mature fruits.

In guava trees, initially, symptoms emerge at the tips of new branches and shoots, which suddenly wilt, leading to a darkened coloration (Coelho et al. 2002). On leaves, symptoms begin with the central vein, causing a darkening of the leaf blade, which expands throughout the leaf, progressing to progressive drying. This symptom of darkening of the medulla, followed by tissue destruction and darkening in the stems, along with wilting, occurs when the bacterium enters, multiplies, and moves through the xylem vessels. Subsequently, wilt dieback and loss of apical dominance (Rodrigues Neto et al. 1987).

Necrosis and mummification of flowers and fruits are typical symptoms of wilt dieback (Coelho et al. 2002), however, the presence of mummified fruits can occur without the observation of symptoms on branches and leaves (Coelho et al. 2002). Guava plants affected by bacterial disease, even severely, rarely die; however, the damage caused by fruit loss is quite significant (Oliveira et al. 2000; Uesugi et al. 2001).

In eucalyptus, initially, bronzing of the petiole and leaf veins is observed, culminating in the death of the infected leaves (Arriel et al. 2014). Wet lesions adjacent to the central leaf veins are also observed (Arriel et al. 2014). On recently infected young branches, macroscopic and microscopic bacterial exudate can be noted, as well as discoloration of the xylem (Arriel et al. 2014). Death of the main shoot leads to loss of apical dominance, resulting in reduced growth (Arriel et al. 2014). In highly susceptible clones, wilting of the entire canopy can occur due to intense colonization of the xylem vessels by the bacterium (Arriel et al. 2014) (Figure 1).

Occasionally, the symptom of wilting occurs, resulting in the death of field plants at 2 to 3 months of age (Arriel et al. 2014). It is also possible to observe plants with yellowed leaves, wilting, and upward defoliation at the baseline, progressing to drying and death of the trees (Arriel et al. 2014). Through cross-sections of the stem, darkening of the internal wood tissues

resulting from the infection is observable, and after a few minutes of cutting, macroscopic bacterial exudate is observed (Arriel et al. 2014).

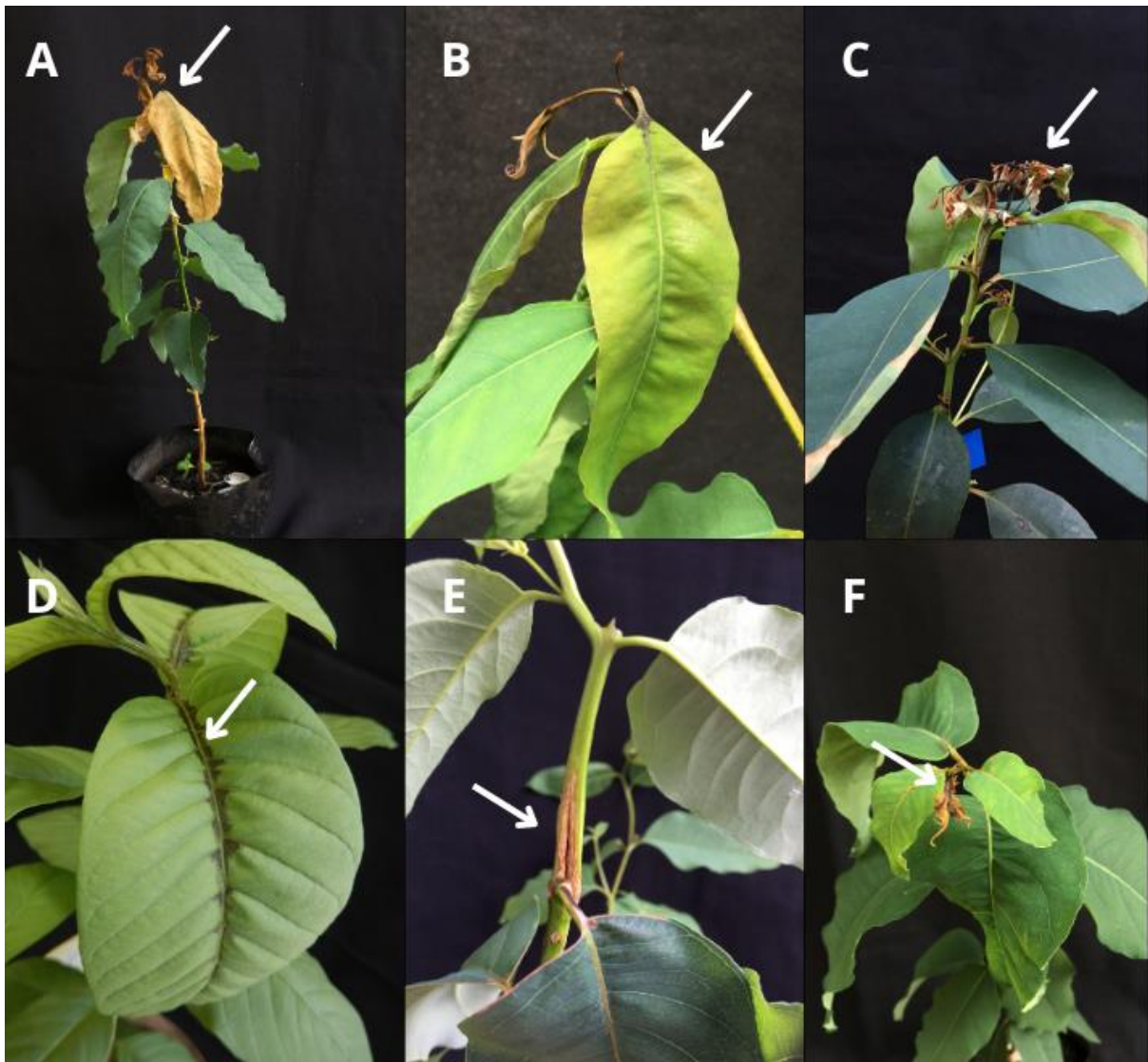


Figure 1. Symptoms caused by *Erwinia psidii* in guava and eucalyptus seedlings. A, B, C, and F) Symptoms of drying, wilting of the youngest leaves in eucalyptus seedlings, and loss of apical dominance. D) Central vein with darkening and reddish-brown coloration in guava leaf. E) Lesion and necrosis of the stem in guava seedling. Photo: Pollyane da Silva Hermenegildo.

1.5. Hosts

The bacterium has been detected in other species of the Myrtaceae family when artificially inoculated, such as strawberry guava (*Psidium cattleianum*), rose apple (*Eugenia jambolana*),

and broad-leaved paperbark (*Melaleuca viridiflora*), which can act as a source of inoculum (Rodrigues Neto et al. 1987). Studies conducted using species from various genera of the Myrtaceae family and other species from botanical families as Caricaceae, Rutaceae, Rubiaceae, Onagraceae, Rosaceae, Solanaceae, Melastomataceae, and Vitaceae demonstrated that only Myrtaceae species exhibited symptoms when inoculated with *E. psidii* (Caires et al. 2019). These species include *Acca selowiana*, *Eugenia involucrata*, *Eugenia uniflora*, *Eugenia pyriformis*, *Plinia cauliflora*, *Plinia edulis*, *Psidium guineense*, *Siphoneugena densiflora*, and *Syzygium jambos* (Caires et al. 2019). Despite this pathogen also being associated with papaya dieback in Malaysia (Chai et al. 2017), as mentioned previously, was not properly confirmed.

These results indicate that *E. psidii* is pathogenic only to plants of the Myrtaceae family, which is not surprising given its recent association with *Eucalyptus* and *Psidium* species (Caires et al. 2019). It is believed that there has not yet been a long period of coevolution between the pathogen and its host plants, which is supported by the low genetic diversity observed in the population of *E. psidii* from Brazilian states that are the main eucalyptus producers (Hermenegildo et al. 2021).

1.6. Disease cycle and epidemiology

The primary source of inoculum is contaminated propagative material, especially seedlings that are transported for orchard establishment and still asymptomatic planted forest areas (Teixeira et al. 2009; Montoya-Estrada et al. 2019). Once the bacterium is established in the crop, in the case of guava, short-distance dissemination occurs between organs of the same plant, from one plant to neighboring ones, and between orchards of neighboring properties, mainly through the use of pruning shears (Romeiro et al. 1994). For eucalyptus, the main form of dissemination is the use of cuttings for clonal propagation. The sharing of agricultural

implements between neighboring properties favors long-distance dissemination (Mânica et al. 2000).

Conditions that favor the dissemination and penetration of the pathogen are temperatures between 32°C and 33°C and high humidity (Rodrigues Neto et al. 1987; Marques et al. 2007). Regarding the penetration of the bacterium, in guava, it occurs through natural openings or through wounds caused by cultural practices such as pruning, shoot thinning, abrasions by sand grains, insects, or natural injuries (Teixeira et al. 2008; Montoya-Estrada et al. 2019). It is known that in eucalyptus, it can invade both the xylem and the parenchyma, forming an organized biofilm that influences the development of disease symptoms (Caires et al. 2020). The presence of bacterial exudate is observed when making a cross-section of the stem (Arriel et al. 2014).

Regarding movement, studies have shown that *E. psidii* can move both upward and downward from the point of infection, both in guava seedlings and eucalyptus (Macagnan & Ferreira, 2018; Caires et al. 2020; Hermenegildo et al. 2022). Additionally, confocal microscopy analyses using a transformed isolate expressing the green fluorescent protein gfp revealed that when the bacterium is inoculated via root, it can penetrate primary and secondary roots and reach the xylem, although typical disease symptoms are not observed (Montoya-Estrada et al. 2019).

An assessment of the survival of the bacterium on the phylloplane, in soil, and in leaf litter showed the bacterium remained viable for approximately 40 to 60 days on the phylloplane of eucalyptus (Lanna-Filho et al. 2021). In non-sterilized soil, the persistence was only 15 days, while in sterilized soil, the bacterium was detected for 135 days. As for the survival of in leaf litter, the bacterium remained viable for 90 days. Between 5 to 15 cm depth, *E. psidii* was detected for 75 days in sterilized soil and 45 days in non-sterilized soil (Lanna-Filho et al. 2021). These data suggest that the bacterium has an epiphytic phase, which may result in a

potential secondary inoculum source, being disseminated in eucalyptus forests (Lanna-Filho et al. 2021).

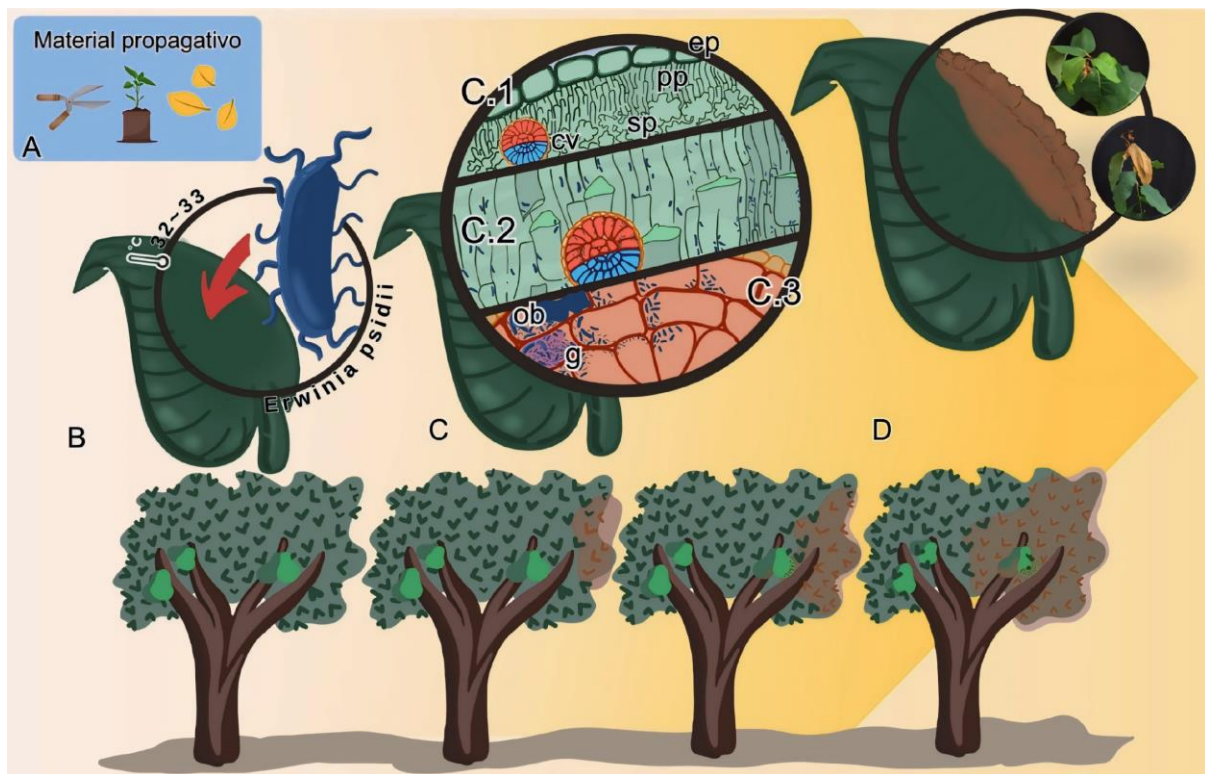


Figure 2. Representation of the wilt dieback cycle caused by *Erwinia psidii*. A) Propagative material: Wounds or natural openings, infected seedlings, plant residues. B) Pathogen entry under favorable conditions. C) Colonization of host plant tissues with longitudinal cuts showing leaf colonization, where: C.1 = ep = epidermis, pp = palisade parenchyma, sp = spongy parenchyma, cv = conducting vessels (red - xylem, blue - phloem). C.2 = Colonization of parenchyma tissues. C.3 = Colonization in xylem vessels, ob = vessel obstruction; g = biofilm. D) Symptoms.

1.7. Diagnosis

Knowing that the main means of disseminating wilt dieback is through contaminated propagative material, the most effective control measure is the acquisition of healthy plantlets (Freitas & Borém, 2021). For this purpose, diagnostic tools have proven to be a crucial element

for the control and reduction of *E. psidii* dissemination. Several biochemical, nutritional, serological, and molecular tests have been developed and employed along the years (Rodrigues Neto et al. 1987; Teixeira et al. 2008; Silva et al. 2015; Silva et al. 2016; Montoya-Estrada et al. 2019; Hermenegildo et al. 2022). Among the biochemical and nutritional tests, there is a minimum list of procedures for detection, including: Gram staining, oxidation-fermentation, catalase production, inoculation in a host, pectate degradation, induction of hypersensitivity in tobacco leaves, soft rot of potato, production of acid from mannitol and raffinose, reduction of nitrate to nitrite, and urease production (Rodrigues Neto et al. 1987).

Methods based on serological tests operate on the principle of the union of macromolecules (antibody) to the same type of inducer of their production (antigen) (Tortora et al. 2005). The immunodiffusion technique is conducted in an agar matrix, either on a microscope slide or in a Petri dish. If there is specificity between the antigen and the antibody, a precipitation line will be visible between the application points (Tortora et al. 2005).

A method for the detection of *E. psidii* involving the enrichment of the bacterial population in guava leaf extract, followed by double radial immunodiffusion with the antisera As15-1, was developed (Teixeira et al. 2008). However, this method has low sensitivity, with an ideal concentration of detectable bacterial suspension with the As15-1 antibody being 10^8 CFU/g of tissue (Teixeira et al. 2008). There is a need for a prior enrichment step in culture medium, which complicates the process and requires more time for analysis (Teixeira et al. 2008). Overall, it was possible to detect the pathogen between 36 and 60 hours (Teixeira et al. 2008). The occurrence of false negatives was also demonstrated, which is a major disadvantage for the technique since the purpose of early diagnosis is to prevent the entry of contaminated propagative material (Teixeira et al. 2008).

The technique does not distinguish between viable and non-viable cells, thus not identifying the real danger of pathogen dissemination (Teixeira et al. 2008); may yield false

positive results, as cross-reactivity occurred with saprophytic isolates from the guava bacteria present on the plant (Saettler et al. 1989; López et al. 2009). These issues highlight the need of use of another diagnostic method to confirm the presence of the pathogen (Teixeira et al. 2008).

Subsequently, another serological method using polyclonal antibody was developed for *E. psidii* detection. The agglutination assay with polyclonal antibody is characterized by the formation of visible aggregates, which occurs when specific antibodies interact with insoluble particles presenting antigenic determinants on their surface. For *E. psidii* isolates associated with eucalyptus and guava, a polyclonal antibody, anti-EP, was produced (Montoya-Estrada et al. 2019). This method demonstrated remarkable specificity and sensitivity, capable of distinguishing the presence of *E. psidii* without reacting with other pathogenic bacteria to eucalyptus such as *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas axonopodis*, as well as non-phytopathogenic bacteria present in the eucalyptus microbiota (Montoya-Estrada et al. 2019). The detection threshold of the technique was 10^5 CFU mL⁻¹. However, its application is restricted to pure or mixed cultures, requiring bacterial isolation from plant tissue (Montoya-Estrada et al. 2019).

Polymerase Chain Reaction (PCR) is a technology that involves amplifying a specific region of DNA through exponential enrichment of a fragment (Mullis et al. 1986). This technique has been widely used for pathogen detection due to its sensitivity and specificity. From conventional PCR, various variations of this technique have been developed to enhance it to meet the needs of scientific research, including immunocapture PCR (IC-PCR) (Jansen et al. 1990; Wetzel et al. 1992), PCR using bacterial colonies as template (BIO-PCR) (Schaad et al. 1995), and quantitative PCR (qPCR) (Higuchi et al. 1993).

For the identification of *E. psidii*, a pair of specific primers, Ep2L/Ep2R, were developed, designed from the polymorphism present in the recombinase A (*recA*) gene, which are employed in conventional PCR, BIO-PCR, and IC-PCR methods (Silva et al. 2015). In

immunocapture-PCR, a specific antiserum, such as the polyclonal antiserum As14.1 (Teixeira et al. 2008), is used to perform a preliminary serological test and subsequently proceed with conventional PCR (Silva et al. 2015). However, in the study conducted, IC-PCR was found to be the least sensitive method among the existing PCR variations (Silva et al. 2015).

The BIO-PCR technique includes a step of bacterial cell multiplication through incubation in culture medium before performing conventional PCR (Schaad et al. 1995). It was found that for the detection of *E. psidii*, BIO-PCR was 10 times more sensitive than conventional PCR due this isolation/enrichment step (Silva et al. 2015). However, this method hinders reproducibility due to the number of necessary steps and the time required for enrichment in culture medium (Silva et al. 2015).

For conventional PCR, guava leaves of the Pedro Sato variety inoculated with cell suspensions ranging from 10^6 to 10 CFU/mL were used (Silva et al. 2016). However, the bacteria were not detected using macerated leaf extract for PCR due to the phenolic compounds present in guava leaves that inhibited the reaction (Silva et al. 2016). The problem was solved when an antioxidant buffer was used to dilute the leaf extract (Silva et al. 2016).

Another derivation of PCR widely used for the diagnosis of phytopathogenic bacteria is real-time PCR, known as qPCR (Freitas et al. 2021; Eichmeier et al. 2019). In contrast to conventional PCR, in qPCR, the methodology of conventional PCR is combined with a detection and quantification mechanism through fluorescence emission (Matias, 2021). Thus, the reaction products are analyzed during each amplification cycle, since the emitted fluorescence signal is proportional to the amount of amplicons (Oliveira et al. 2016).

The primers Ep148_F/Ep148_R were also developed based on the sequence of the *recA* gene for the elaboration of a SYBR Green fluorescence-specific qPCR method for *E. psidii* detection (Hermenegildo et al. 2022). qPCR was found to be 1000 times (bacterial cell

suspensions) and 100 times (purified DNA) more sensitive in detecting *E. psidii* than conventional PCR when Ep148_F/Ep148_R were used (Hermenegildo et al. 2022). The qPCR method enabled the detection of *E. psidii* in asymptomatic guava samples (Hermenegildo et al. 2022).

1.8. Disease management

The primary control measure is based on the principle of exclusion, that is, preventing the entry of the pathogen into the area (Freitas & Borém, 2021). Given that the main means of dissemination of wilt dieback caused by *E. psidii* occurs through contaminated propagative material, obtaining healthy seedlings becomes crucial for disease control (Teixeira et al. 2009; Montoya-Estrada et al. 2019). However, if the disease is already established in the orchard, control becomes more challenging. Nevertheless, there are palliative measures to prevent dissemination within orchards and nurseries. These include care for water quality and irrigation management, avoiding overhead irrigation systems, with micro-sprinklers or drip irrigation being preferable (Junqueira, 2002). Canopy management to allow good aeration, pruning of all branches of affected plants with removal and burning in the orchard, avoiding continuous pruning that induces sprouting during hot and humid periods (Tomita et al. 2016; Freitas & Borém, 2021).

Other measures include the application of copper paste at branch cutting sites, pruning during the hottest hours of the day, during dry periods without rain, the use of windbreaks around plants, disinfection of pruning tools in a solution of water and sodium hypochlorite or quaternary ammonia, application of nitrogen fertilizers according to soil and foliar analysis at the appropriate time, and avoiding planting in poorly drained soils or those prone to waterlogging (Junqueira, 2001).

Studies have been conducted regarding the use of copper fungicides in the control of bacterial plant diseases (Silva & Lopes, 1995). However, these compounds can cause symptoms of phytotoxicity (Puccinin et al. 2005). Rezende et al. (2008) conducted studies on the phytotoxicity and control efficiency of copper sulfate; copper oxychloride, and copper hydroxide, demonstrating that considering phytotoxicity and wilt dieback control, copper sulfate is not a recommended product, with copper oxychloride and copper hydroxide being preferable. However, spraying is not recommended when fruits reach about 3 cm due its sensitivity to copper (Freitas & Borém, 2021). However, due to the size of the trees and the extensive cultivation areas, most of these measures are unfeasible for eucalyptus cultivation (Arriel et al. 2014).

The search for resistant plant material is a promising approach for disease control, despite the main varieties of guava trees and eucalyptus species being highly susceptible (Rezende, 2016; Caires et al. 2019). Caires et al. (2019) demonstrated the potential of *Corymbia henryi*, *C. maculata*, *Eucalyptus thozetiana*, *E. cloeziana*, *E. viminalis*, *E. dalrympleana*, and *E. pilularis* as potential sources of resistance found for eucalyptus, as these were highly resistant to the pathogen. White-fleshed guava varieties show greater tolerance to wilt dieback compared to red-fleshed varieties, which may indicate a possible source of resistance (Piccinin et al. 2005).

CAPÍTULO 2

Detecção de *Erwinia psidii* por LAMP usando genômica comparativa

RESUMO

CARVALHO, Alice Maria Silva de. **Detecção de *Erwinia psidii* por LAMP usando genômica comparativa**. 2024. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

As doenças causadas por fitopatógenos representam um desafio significativo para a produção agrícola devido ao avanço das culturas e à expansão das áreas plantadas. A seca dos ponteiros é uma das principais doenças do eucalipto e da goiabeira, podendo resultar em perdas substanciais. A diagnose de doenças em plantas desempenha um papel crucial na prevenção e controle dessas doenças, na gestão integrada de pragas e doenças, na otimização dos recursos agrícolas, na pesquisa e desenvolvimento, e na minimização das perdas de produção. A técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) oferece uma forma rápida, precisa, sensível e específica de realizar a diagnose de doenças. O uso da genômica comparativa no desenvolvimento da técnica LAMP traz vantagens, como a identificação de sequências conservadas e exclusivas, resultando em primers mais precisos e confiáveis para a detecção de patógenos em plantas. O objetivo deste estudo consiste no desenvolvimento de um ensaio de detecção molecular de amplificação isotérmica por Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) para detecção de *Erwinia psidii*. Realizou-se uma análise de genômica comparativa utilizando o software RUCS para identificar regiões genômicas exclusivas de *E. psidii*. Comparamos as sequências alvo com as de vários fitopatógenos que afetam goiaba e eucalipto, identificando 842 regiões exclusivas. Selecionamos cinco dessas regiões com maior potencial, além da região *recA*, previamente usada em PCR convencional e qPCR, para o design de primers. Desenhamos sete conjuntos de primers na plataforma NEB® LAMP Primer Design Tool e os testamos com o isolado tipo IBSBF435, variando temperaturas (60 e 65 °C) e intervalos de tempo. A 65 °C, quatro conjuntos apresentaram mudança de cor após 50 minutos. Ajustamos a proporção de primers internos e externos, observando que a proporção 8:1 resultou na amplificação de três conjuntos e 4:1 de todos os quatro conjuntos. Avaliamos a sensibilidade do conjunto mais promissor (Ep19), detectando DNA até uma concentração de 1×10^{-4} ng/ μ L. O ensaio LAMP desenvolvido mostrou-se rápido, eficaz e altamente sensível para a detecção de *E. psidii*, inclusive em baixas concentrações de DNA.

1. INTRODUÇÃO

Erwinia psidii foi identificada pela primeira vez em 1987 no estado de São Paulo, Brasil, causando a seca dos ponteiros na goiaba (*Psidium guajava* L.). Esse patógeno impacta ramos, brotos e frutos, reduzindo significativamente a produção da cultura. Até 2011, *E. psidii* estava associada apenas à goiaba, mas depois foi confirmada como causadora de doenças em brotos e caules de *Eucalyptus* spp. no Uruguai e na Argentina. Em 2014, foi relatada causando murcha e seca em *Eucalyptus* spp. no Brasil.

No Brasil, o crestamento bacteriano da goiaba se espalhou do estado de São Paulo para outras regiões ao longo dos anos, provavelmente através do transporte de material vegetal de propagação assintomático. Plantas jovens assintomáticas frequentemente apresentavam sintomas após dois anos do estabelecimento do pomar, período necessário para a frutificação da goiaba. Portanto, é crucial desenvolver métodos de detecção rápidos e eficazes para evitar a disseminação de *E. psidii* por meio de material vegetal contaminado. As ferramentas disponíveis para detecção e/ou identificação da bactéria incluem testes bioquímicos e nutricionais, sorologia com um anticorpo policlonal específico e teste de aglutinação, além de detecção molecular via PCR, Bio-PCR, IC-PCR e qPCR.

Como plantas assintomáticas frequentemente contêm populações bacterianas muito baixas em seus tecidos, métodos de detecção de alta sensibilidade são necessários para uma identificação eficaz. Assim, a amplificação isotérmica mediada por loop se apresenta como um potencial método de detecção para *Erwinia psidii*.

Desenvolvida por Notomi et al. (2000), a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é um método de detecção de DNA que ocorre a uma temperatura constante, ao contrário da PCR. Inicialmente aplicada para detectar o vírus da hepatite B (HBV), utiliza dois conjuntos de primers: internos (BIP e FIP) e externos (F3 e B3), garantindo alta especificidade. A adição dos primers de loop (loop F e loop B) posteriormente otimizou o método, reduzindo

o tempo de reação. A enzima Bst polimerase, derivada da bactéria *Geobacillus stearothermophilus*, permite a reação isotérmica devido à sua alta atividade de deslocamento de fita.

O processo de LAMP tem três fases principais: não cíclica, cíclica e de alongação. Na fase não cíclica, após a abertura da dupla fita de DNA, os primers F2 e F3 se ligam à fita molde, iniciando a síntese de novas fitas. A Bst polimerase desloca e sintetiza novas fitas, formando estruturas de loop nas extremidades, encerrando essa fase. Na fase cíclica, os primers FIP e BIP se ligam aos loops, permitindo a síntese contínua e a amplificação da sequência alvo. Na fase de alongação, formam-se longas cadeias de DNA conectadas por loops, criando fragmentos de diversos tamanhos.

O LAMP oferece várias vantagens: é isotérmico, simplificando o processo em comparação com a PCR; tem alta sensibilidade, detectando pequenas quantidades de material genético; é rápido, com resultados visíveis rapidamente; e é de baixo custo, devido à menor necessidade de equipamentos sofisticados. No entanto, também apresenta limitações: requer um conjunto específico de primers e condições precisas, é sensível à contaminação por ácidos nucleicos, e não distingue entre células vivas e mortas. Apesar dessas limitações, o LAMP é uma ferramenta valiosa para diagnóstico e pesquisa devido à sua rapidez e sensibilidade.

2. JUSTIFICATIVA

As culturas da goiaba e do eucalipto apresentam grande valor econômico e social no Brasil, com o país posicionado como um dos maiores produtores de ambas as culturas, além do crescimento exponencial e retorno financeiro. Considerada uma doença emergente, a seca dos ponteiros se caracteriza como principal doença da goiabeira no Distrito Federal, ganhando importância na eucaliptocultura. Essa doença pode causar de 30% a 85% de perdas, sendo mais severa nos estágios iniciais de desenvolvimento das mudas.

Sabendo que a principal forma de disseminação da doença é através de material propagativo contaminado e que ainda não há controle eficaz para a doença, a diagnose precoce é uma ferramenta de grande valor para reduzir a disseminação da bactéria. Portanto, o desenvolvimento de um método como o LAMP que é acurado, sensível sendo capaz de detectar a bactéria em pequenas quantidades, específico e prático, poderá auxiliar no diagnóstico e subsequente manejo da seca dos ponteiros tanto no laboratório quanto no campo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo consiste no desenvolvimento de um ensaio de detecção molecular de amplificação isotérmica por Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) para detecção de *Erwinia psidii*.

3.2. Objetivos específicos

- Seleção de regiões exclusivas através de análise de genômica comparativa;
- Obter conjuntos de *primers* LAMP;
- Otimizar as condições para a reação LAMP para a detecção específica do patógeno;
- Analisar a sensibilidade dos conjuntos de *primers* LAMP.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Recuperação de bactéria preservada em água destilada estéril

O isolado tipo IBSBF 435 de *Erwinia psidii* da coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal foi reativado pelo depósito 1 µL da suspensão estoque em placa de Petri contendo meio 523 (Kado e Heskett, 1970). Posteriormente, as placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas para promover o crescimento das colônias bacterianas. Colônias típicas foram repicadas para placas com meio 523 e mantidas sob as mesmas condições.

4.2. Extração de DNA

O DNA genômico do isolado tipo IBSBF 435 foi com o kit PureLink Genomic DNA da Invitrogen®. A concentração do DNA foi quantificada com o espectrofotômetro Nanodrop® e ajustada para a concentração final de 25 ng μL^{-1} .

4.3. Seleção de regiões genômicas e desenho de *primers* LAMP

As sequências utilizadas na análise genômicas comparativas foram obtidas do GenBank (NCBI), tanto do gênero *Erwinia*, como de outras espécies que infectam eucalipto e goiabeira, como os gêneros: *Ralstonia*, *Pantoea eucalypti*, *Xanthomonas citri* (Tabela 1). A seleção de regiões genômicas exclusivas foi realizada no *software* RUCS (Thomsen et al. 2017), a partir disso foi realizada uma curadoria das regiões com tamanho superior à 200 pares de bases (pb). Além disso, a sequência do gene *recA* também foi selecionada para o desenho de *primers*, visto que essa região havia sido utilizada anteriormente para desenho de *primers* para PCR e qPCR (Silva et al. 2015; Hermenegildo et al. 2022).

As regiões selecionadas foram usadas na plataforma NEB® LAMP *Primer* Design Tool para desenho dos *primers*. Os conjuntos de *primers* desenhados foram então avaliados para uma diversidade de características, como temperatura de *melting* dos *primers* F3, B3, F2, B2 entre 59 °C e 61 °C; para os *primers* F1c e B1c, 64 °C até 66 °C; o $\Delta G \leq -4$; e conteúdo GC entre 50 e 60%. Primer BLAST (NCBI) foi usado para verificar possíveis *hits* inespecíficos com os *primers* externos (F3/B3). Somente foram sintetizados os conjuntos de *primers* que atenderam todos os critérios descritos (Figura 2).

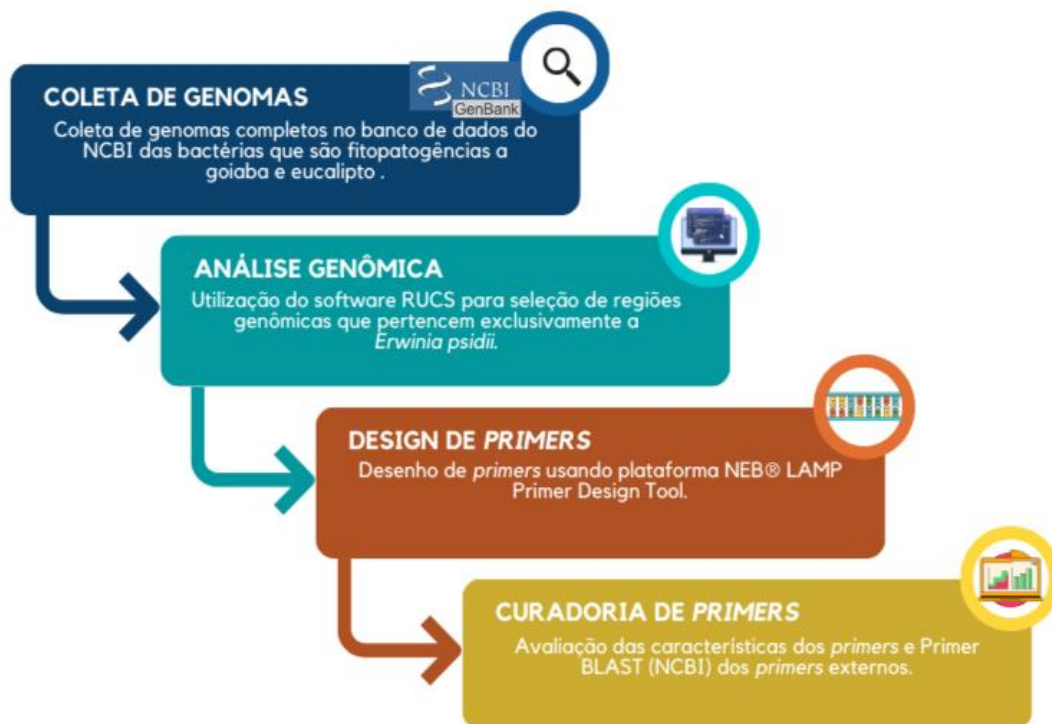


Figura 3. Fluxograma representando o processo de desenvolvimento e seleção dos conjuntos de primers LAMP.

Tabela 1. Lista das sequências genômicas dos fitopatógenos usados para a análise comparativa e busca por regiões exclusivas para *Erwinia psidii*.

<i>Erwinia psidii</i>	Acesso NCBI
	RQSB01000001.1
	RQRZ01000001.1
	RHHM01000001.1
<i>Erwinia amylovora</i>	RQSA01000001.1
	CP066795.1
	CP050263.1
<i>Pantoea eucalypti</i>	CP050244.1
	CP045723.1
	CP045721.1
	CP045720.1
	CP045722.1
	FUWI01000001.1

<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	CP103852.1
	CP103851.1
	CP115958.1
	CP115957.1
<i>Ralstonia solanacearum</i>	NCTK01000001.1
	CP012687.1
	CP012688.1
	CP115946.1
	CP115947.1
	CP115948.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>aurantifolii</i>	CP012003.1
	CP012002.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	CP009029.1
	CP009030.1
	CP009031.1
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>	CP029268.1
	CP029269.1
	CP029267.1
<i>Xanthomonas citri</i>	CP048044.1

4.4. Ensaio LAMP

Para avaliar os conjuntos de *primers* desenhados e estabelecer as condições ideais da reação, foi usado o DNA genômico do isolado tipo de *E. psidii*, IBSBF 435, e o kit WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (New England Biolabs Inc, Massachusetts, EUA). As reações de 25 µL tinham 12,5 µL do master mix, 2,5 µL de mix de *primers* nas diferentes proporções (Tabela suplementar 1), 1 µL de DNA (25 ng µL⁻¹); para completar o volume foi usado água MilliQ. Primeiramente, seis conjuntos de *primers*, sendo cada conjunto compostos pelos *primers* F3, B3, FIP e BIP, foram testados em duas temperaturas (60 °C e 65 °C) e cinco intervalos de tempo (30 min, 45 min, 50 min, 55 min e 60 min), com a proporção de *primers* 4:1 (internos/externos) (Tabela suplementar 2).

Posteriormente, foram adicionados os primers do loop aos três conjuntos que amplificaram o fragmento alvo na reação anterior, visando maior eficiência e velocidade de reação. As

proporções de *primers* testadas foram de 4:1 e 8:1 (internos/externos) (Tabela suplementar 2) a 65 °C e cinco intervalos de tempo (30 min, 45 min, 50 min, 55 min e 60 min). Para o controle negativo foi usado água MilliQ no lugar do DNA. Os resultados foram avaliados em cada intervalo de tempo e a reação só será considerada positiva quando a cor alterou do rosa (vermelho fenol) para amarelo. A confirmação da amplificação será por eletroforese em gel de agarose 2%, corados por GelRed e visualizados em transiluminador UV. Posteriormente, os conjuntos de *primers* com capacidade de alterar a cor da reação foram utilizados para teste de sensibilidade (Figura 3).

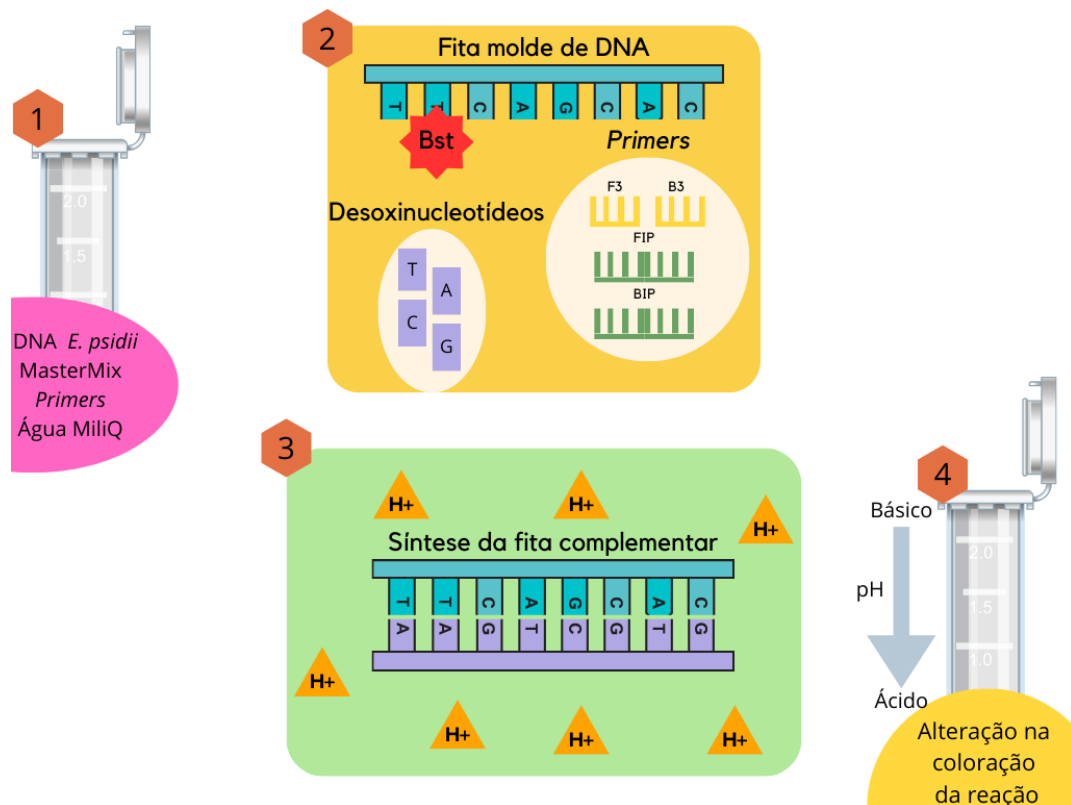


Figura 4. Representação esquemática do processo de amplificação e subsequente liberação de prótons H⁺ na reação LAMP. Etapa 1 - Reação está com todos os seus reagentes ainda na coloração rosa do vermelho fenol devido o pH elevado. Etapa 2 – Reação com DNA mole, Bst dna polimerase, *primers* e dNTPs que serão submetidos a temperatura de 65 °C. Etapa 3 - Liberação de íons de hidrogênio devido a síntese da fita complementar ao DNA molde durante

a reação isotérmica. Etapa 4 - A liberação de íons de hidrogênio acidifica a reação ocasionando a mudança de cor da reação de rosa para amarelo.

4.5. Teste de sensibilidade

Para avaliar a sensibilidade do teste, o DNA genômico do isolado tipo de *Erwinia psidii* foi quantificado utilizando o Qubit (Invitrogen) com o kit Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kit (Invitrogen) e diluído seis vezes, resultando em concentrações que variaram de 10 ng μL^{-1} até 1×10^{-4} ng. μL^{-1} . As reações utilizaram a proporção de primers 8:1, conforme estabelecido na etapa anterior. A avaliação foi realizada nos intervalos de tempo de 30 min, 40 min, 50 min e 60 min.

Os valores das concentrações do DNA genômico foram convertidos de nanogramas por microlitro para cópias por microlitro pela seguinte fórmula abaixo. Foi considerado que o genoma da *E. psidii* tinha cerca de 4,5 Mb de acordo com valores obtidos por Hermenegildo et al. (2019).

$$\text{Copies of target} = \frac{\text{ng of double stranded DNA} \times \text{Avogadro's constant} (6.022 \times 10^{23})}{\text{Length in base pairs} \times 10^9 \times 650 \text{ Daltons}}$$

5. RESULTADOS

5.1. Seleção de regiões genômicas e desenho de primers LAMP

Após a análise realizada no RUCS, foram identificadas 842 sequências correspondentes a regiões exclusivas do genoma de *Erwinia psidii* que apresentaram tamanho superior a 250 pb. As sequências também foram selecionadas quanto a localização no genoma, sendo eliminadas as localizadas em regiões intergênicas e elementos de inserção. Somente quatro sequências foram usadas para a síntese de cinco conjuntos de primers. A região correspondente ao gene *recA*, anteriormente usada para o desenvolvimento de primers para PCR e qPCR (Silva

et al. 2015, Hermegildo et al. 2020) também foi utilizada para desenho e síntese de um conjunto de *primers*, *EpRecA* (Figura 4).

Não foi possível encontrar *primers loop forward* e *backward* para todos os conjuntos avaliados. Para o conjunto de *primers* Ep10, apenas os primers do FL (*forward loop*) foram desenhados, resultando em dois conjuntos: Ep10/5, composto por F3, B3, FIP, BIP e LF5, e o conjunto Ep10/13, formado pelos primers F3, B3, FIP, BIP e FL13. Apenas um dos *primers loop* pôde ser desenhado para o conjunto Ep1, o BL1 (*backward loop*). No caso do conjunto de *primers* Ep19, foi possível desenhar ambos os *primers loop* (Ep19_LF15 e Ep19_LB15) (Tabela 2). Mesmo com o desenho dos *primers* ter sido realizados através de genômica comparativa, o Primer BLAST (NCBI) indicou *hits* inespecíficos somente para os conjuntos Ep10 e Ep83, que foram sintetizados a partir da mesma região (Tabela 3).

Tabela 2. Conjuntos de *primers* LAMP desenhados para *Erwinia psidii* e suas sequências.

Conjuntos	<i>Primers</i>	Sequência (5' - 3')	Tamanho dos <i>primers</i>
Ep1	Ep1_F3	CCAACGGCGTAGAGGATCA	19
	Ep1_B3	TTGCCGGTATCGTGCTGA	18
	Ep1_FIP	TGAAGGGTACAACGGTGCGTTTGCCGTG ATAAGCGTGGT	39
	Ep1_BIP	CGCCTGTTGAACAGAACGTCCGGCTGTC GATGCTAACGTACTION	42
	Ep1_LB1	CAGCTCTTCCTTGATACGTTCGT	23
Ep10/5	Ep10_F3	TGACGTTACGCGTCTTGC	18
	Ep10_B3	GCTACCGGAGGTAAAGGCT	19
	Ep10_FIP	TTCCCTGAAGACGCAGGGACAACAATCT TCCGCTGCCGAAC	41
	Ep10_BIP	CAACCGGCGAAGCCATCGTTAGCTGCAC TCACTGCTACA	39
	Ep10_LF5	TGCTGCCTGTGATGCATCTG	20
Ep10/13	Ep10_F3	TGACGTTACGCGTCTTGC	18
	Ep10_B3	GCTACCGGAGGTAAAGGCT	19

	Ep10_FIP	TTCCCTGAAGACGCAGGGACAACAATCT TCCGCTGCCGAAC	41
	Ep10_BIP	CAACCGGCGAAGCCATCGTTAGCTGCAC TCACTGCTACA	39
	Ep10_LF13	GCCTGTGATGCATCTGATGTGA	22
Ep19	Ep19_F3	TTGGCGACGTTGTGAGTG	18
	Ep19_B3	CTTCTGCGCCTGGTGTG	18
	Ep19_FIP	GCGGAAAAGCCTCAGGGGTATTATGCTG CTGATCAGACGATG	42
	Ep19_BIP	TCCCATCCAGCACATCAAGTGCCTGATGC GTGGCCGTTAT	40
	Ep19_LF15	AAACGGACACGGTGGACGT	19
	Ep19_LB15	GCGTTTTAATTCGTGCTGAATGGC	24
Ep54	Ep54_F3	CCAGGCCAATTTTCAGTCCT	20
	Ep54_B3	CAGCGAACTGCCCGATAC	18
	Ep54_FIP	CGCGAGCTGCAGATCTGATTGACTGGCA ACGTTGCAATG	39
	Ep54_BIP	TACGTTGTATGACGTCCTGCCGAGGTGGT GCAGATGTGGTAT	42
Ep83	Ep83_F3	TGCCGAACAAGGCGTTTA	18
	Ep83_B3	GCACAGCTTTACGCTCACC	19
	Ep83_FIP	AACGATGGCTTCGCCGTTGCCCTGCGTC TTCAGGGAA	38
	Ep83_BIP	TTGCTGCCTGTGATGCATCTGAAGCTACC GGAGGTAAAGGC	41
EpRECA	recA_F3	TAGAAAAGGCCGGTGCGT	18
	recA_B3	AGTTCTCGTTCGCTTCGC	18
	recA_FIP	CCGCCGATTTTCCTTCAGGAAGTACAGC TACAACGGTGACA	42
	recA_BIP	AGATTGAAGCCAAACTGCGTGCCATATC AGCGTCGTCAGCA	41

recA

GTT**CACAGCCCGATACGG**^{F3»}GCGA**GCAGGCGTTGGAAATCTGT**^{F2»}GACGCACTGGCGCGTT
CCGGTGCCGTTGACGTG**ATTATTGTCGACTCCGTGGCCG**^{«F1c}CTCTGACACCAAAGCAG
AAATTG**AAGGGGAAATTGGTGACTCGCA**^{B1c»}CATGGGCCTTGCGGCACGCATGATGAGCC
AGGCGATG**CGTAAGCTGGCGGGTAACT**^{«B2}**GAAGCAGTCCAATACCCTGC**^{«B3}

Ep1

GTT**CCAACGGCGTAGAGGATCA**^{F3»}CC**GCCGTGATAAGCGTGGTG**^{F2»}ACGTTGGCATCGACA
ATACTGGA**AAACGCACCGTTGTACCCTTCA**^{«F1c}TGAAT**CGCCTGTTGAACAGAACGTCCG**^{B1c»}
TTCTTCAGCTCTTCCTTGATACGTTTCGTTAA**AGTACGTTAGCATCGACAGC**^{«B2}CACC
GCCAGCG**TCAGCACGATACCGCAA**^{«B3}TACC

Ep10

CTGAA**TGACGTTACGCGTCTTGC**^{F3»}GCA**CAATCTTCCGCTGCCGAAC**^{F2»}AAGGCGTTTATC
AATGGTCGTT**TTGTCCCTGCGTCTTCAGGGAA**^{«F1c}CACGCTGACCACGCACAATCCGG**CA**
ACCGGCGAAGCCATCGTT^{B1c»}AATATTGCTGCCTGTGATGCATCTGATGTGAA**TGTAGCA**
GTGAGTGCAGCT^{«B2}CGCG**AGCCTTACCTCCGGTAGCT**^{«B3}GGAACAACTGGCTCCGGT

Ep19

CCACCGAACAGCGTGTGAAGGTATAGCGA**TTGGCGACGTTGTGAGTG**^{F3»}CAA**ATGCTG**
CTGATCAGACGATG^{F2»}GACGTCCACCGTGTCCGTTTGGGGTTA**AATACCCCTGAGGCT**^{«F1c}
TTTCCGC^{B1c»}GTGTCAGTA**TCCCATCCAGCACATCAAGTGC**^{B1c»}GCTCTGATTAAGCGTTTAA
ATTGCTGCTGAATGGCTGAT**ATAACGGCCACGCATCAG**^{«B2}GTTTTCACTG**CACACCAGG**
CGCAGAAAG^{«B3}TCAGGGTGGGAAATATGATAATCAAACCTTGCCCTACGCGAGCCGGATC

Ep54

CG**CCAGGCCAATTTTCAGTCCT**^{F3»}TCAGC**CTGGCAACGTTGCAATGC**^{F2»}CTGCTCCACGCC
GGGTAGCAAAGGCCGATGTTCC**TCAATCAGATCTGCAGCTCGCG**^{«F1c}CAATGA**TACGTTG**
TATGACGTCCCTGCCG^{B1c»}GTCTGCCCTTCCCAGGGGAACGTTGC**ATACCACATCTGCAC**
CACCT^{B1c»}GATCGATGCGCATACCGTGG**GTATCGGGCAGTTCGCTG**^{«B2}CGTTTGGAAAGGTC

Ep83

CTGAATGACGTTACGCGTCTTGCGACAATCTTCCGC**TGCCGAACAAGGCGTTA**^{F3»}TC
AATGGTCGTTTTTGT**CCCTGCGTCTTCAGGGAA**^{F2»}CACGCTGACCACGCACAATCCGG**CA**
ACCGGCGAAGCCATCGTT^{«F1c}AATA**TTGCTGCCTGTGATGCATCTGA**^{B1c»}TGTGAATGTAGCA
GTGAGTGCAGCTCGCGCA**GCCTTACCTCCGGTAGCT**^{«B2}GGAACAACTGGCTCCG**GGT**
GAGCGTAAAGCTGTGC^{«B3}TGCTTA

Figura 5. Representação esquemática da posição e sequência dos *primers* LAMP desenhados dentro das sequências de nucleotídeos. Em amarelo os *primers* externos (F3, B3) e em laranja os *primers* internos (FIP, BIP).

Tabela 3. Identificação das sequências alvo utilizadas para desenho dos conjuntos de *primers* e seus resultado do Primer BLAST.

Sequência	Conjuntos correspondentes	Localização	Primer Blast Hit
10_1398_3883	Ep10/Ep83	Aldehyde dehydrogenase	<i>Lithophane leautieri</i>
19_1738_3617	Ep19	TetR amily transcriptional regulator	No hits
1_3457_3230	Ep1	secD – protein translocase subunit SecD	No hits
0_5486_3873	Ep54	HxpB – hexitol phosphatase	No hits
recA	RecA	recA – recombinase A	<i>Erwinia psidii</i>

5.2. Otimização do ensaio LAMP

Nos testes com conjuntos de *primers* sem os *primers loop* a 60 °C, observou-se que o conjunto Ep19 manifestou alteração de cor após 50 minutos de reação, enquanto Ep10 revelou um resultado positivo após 75 minutos de reação (Figura 5). Os conjuntos de *primers* Ep1 e Ep54 apresentaram amplificação na eletroforese em gel de agarose, mesmo sem evidência de mudança de cor nas respectivas reações. Este resultado sugere a ocorrência de amplificação inespecífica a 60 °C, resultando em falsos negativos e comprometendo a confiabilidade desses conjuntos.

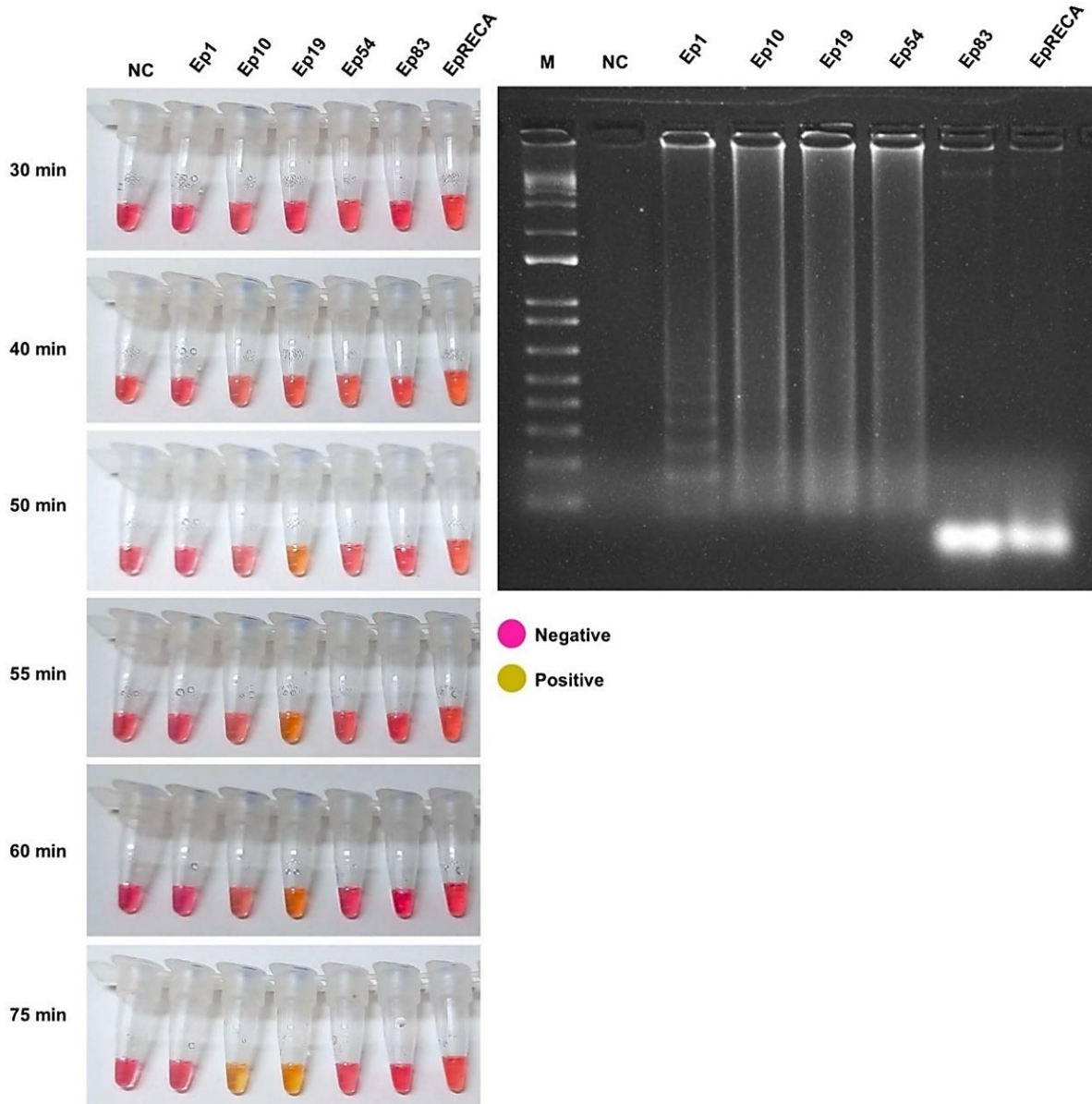


Figura 6. Ensaio LAMP utilizando a proporção de *primers* 4:1 sem *primers* loop a temperatura de 60 °C em diferentes intervalos de tempo com o DNA do isolado tipo de *Erwinia psidii*, IBSBF 435. O produto de amplificação do DNA foi visualizado pela mudança de cor do corante indicador de pH (esquerda) e por eletroforese em gel de agarose (direita). M: DNA Ladder 1 kb Plus (Invitrogen), NC: Controle negativo.

A 65 °C, o conjunto Ep19 resultou em alteração na coloração aos 50 minutos após o início da reação. O conjunto Ep1 exibiram uma performance melhor a 65 °C, mudando de cor aos 60 minutos. Aos 60 minutos, os conjuntos Ep1 e Ep19 apresentavam uma nítida mudança

de cor, indicando um resultado positivo. Aos 75 minutos, conjunto Ep10 resultou como positivo. As alterações de cor foram confirmadas pela eletroforese. Os demais conjuntos testados não demonstraram mudança de cor a essa temperatura (Figura 6). A temperatura de 65 °C foi considerada a mais adequada para as etapas subsequentes.

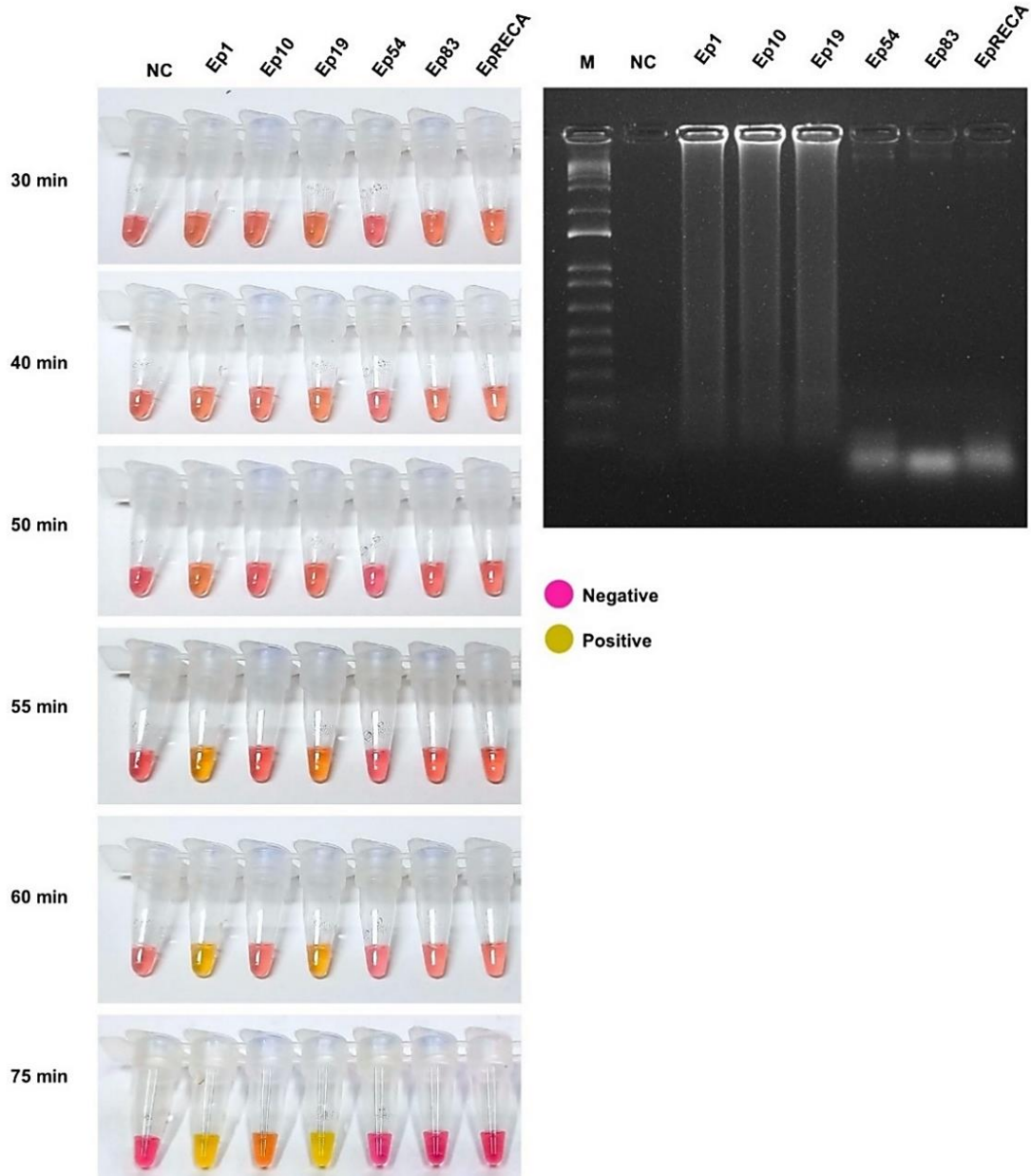


Figura 7. Ensaio LAMP utilizando a proporção de *primers* 4:1 sem *primers* loop a temperatura de 65 °C em diferentes intervalos de tempo com o DNA do isolado tipo de *Erwinia psidii*, IBSBF 435. O produto de amplificação do DNA foi visualizado pela mudança de cor do corante

indicador de pH (esquerda) e por eletroforese em gel de agarose (direita). M: DNA Ladder 1 kb Plus (Invitrogen), NC: Controle negativo.

Os quatro conjuntos de *primers*, Ep1, Ep10/5, Ep10/13 e Ep19, demonstraram resultado positivo ao serem testados com DNA de *Erwinia psidii* na proporção de 4:1 aos 60 minutos de reação. No entanto, apenas os conjuntos Ep10/5, Ep10/13 e Ep19 atingiram completa mudança de cor aos 40 minutos (Figura 7). O LAMP com a proporção de 8:1, não resultou na coloração das reações para o conjunto Ep10/13 com 60 minutos, sugerindo que essa proporção de *primers* não é apropriada para esta reação com este conjunto de *primers* (Figura 8).

Para ambas as proporções de *primers* internos e externos, 4:1 e 8:1, o conjunto Ep19 apresentou resultado positivo com apenas 40 minutos de reação sendo selecionado para as análises posteriores.

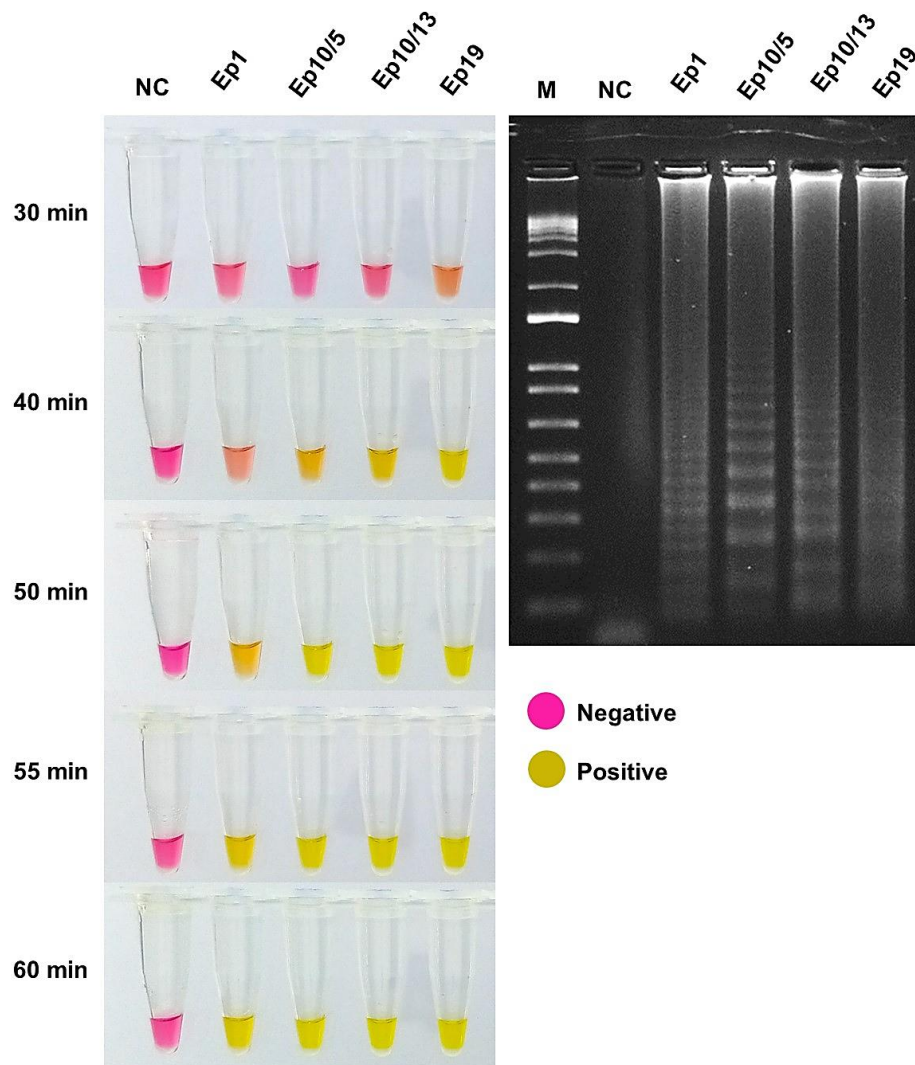


Figura 8. Ensaio LAMP utilizando a proporção de *primers* 4:1 com *primers* loop em diferentes intervalos de tempo com o DNA do isolado tipo de *Erwinia psidii*, IBSBF 435. O produto de amplificação do DNA foi visualizado pela mudança de cor do corante indicador de pH (esquerda) e por eletroforese em gel de agarose (direita). M: DNA Ladder 1 kb Plus (Invitrogen), NC: Controle negativo.

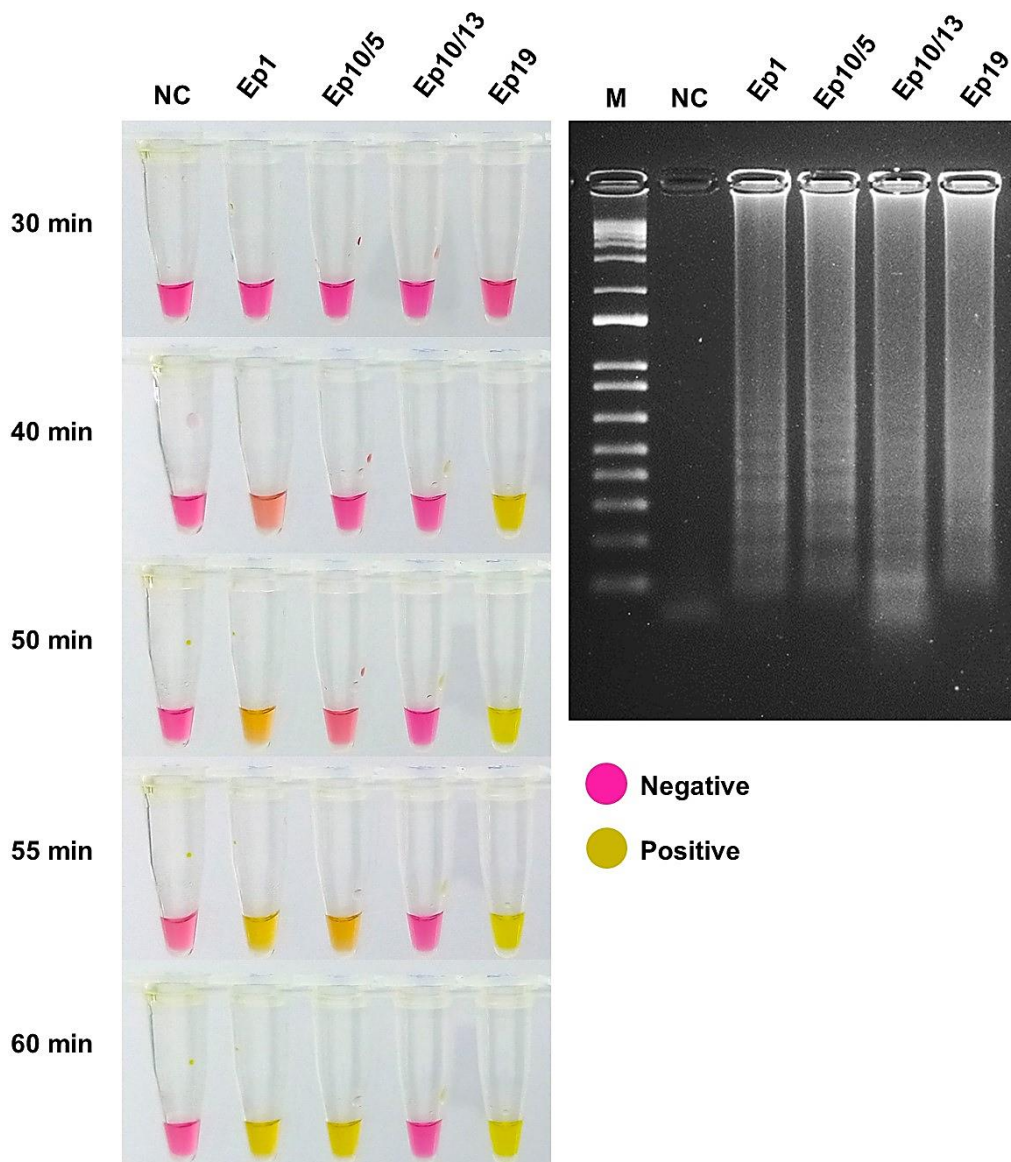


Figura 9. Ensaio LAMP utilizando a proporção de *primers* 8:1 com *primers* loop em diferentes intervalos de tempo com o DNA do isolado tipo de *Erwinia psidii*, IBSBF 435. O produto de amplificação do DNA foi visualizado pela mudança de cor do corante indicador de pH (esquerda) e por eletroforese em gel de agarose (direita). M: DNA Ladder 1 kb Plus (Invitrogen), NC: Controle negativo.

5.3. Sensibilidade

No ensaio de sensibilidade com o conjunto Ep19, as reações nas concentrações de DNA de 10, 1, 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} e 1×10^{-4} ng. μ L $^{-1}$, obtiveram resultado positivo aos 60 minutos. O

limite de detecção de 1×10^{-4} ng. μL^{-1} , foi equivalente a 18 cópias de DNA de *E. psidii*. Enquanto na concentração 1×10^{-5} ng. μL^{-1} não houve mudança de cor o resultado foi negativo, indicando a não detecção do patógeno nessa concentração (Figura 9).

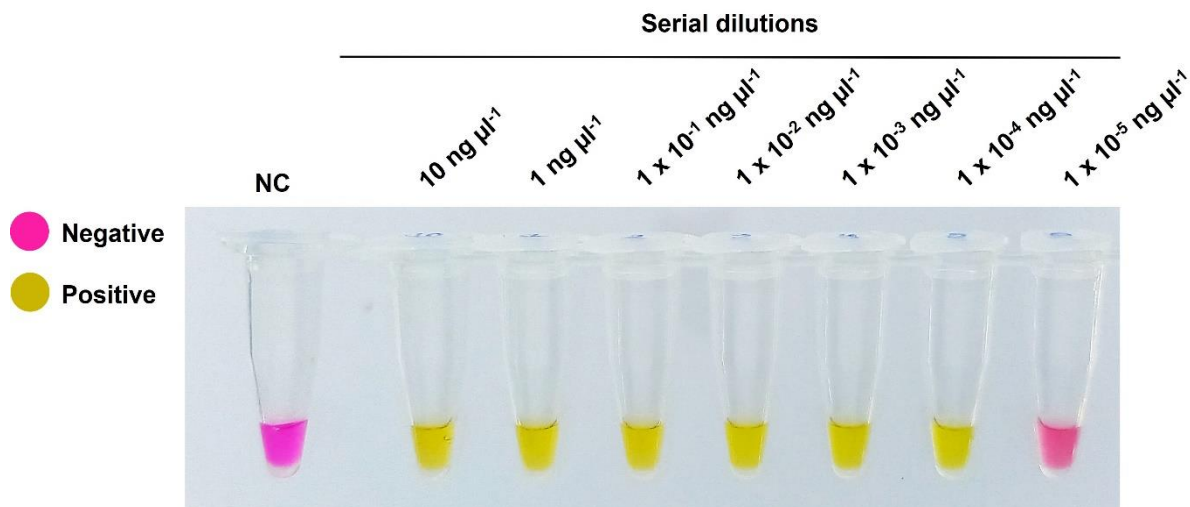


Figura 10. Sensibilidade do ensaio LAMP utilizando diferentes diluições do DNA genômico do isolado tipo de *Erwinia psidii*, IBSBF 435, variando de 10 ng μL^{-1} a 1×10^{-5} ng. μL^{-1} . O produto da amplificação do DNA foi visualizado pela mudança de cor do corante indicador de pH. NC: Controle negativo.

6. DISCUSSÃO

A análise genômica comparativa permitiu a identificação de diversas regiões exclusivas do patógeno alvo. Trabalhos recentes utilizando abordagens genômicas semelhantes, demonstraram a eficácia dessa metodologia ao estabelecer conjuntos de *primers* LAMP baseados em genômica comparativa como feito para o patossistema *Candidatus* Phytoplasma asteri (Alič et al. 2022), *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* em mandioca (Carvalho et al. 2024) e Maize bushy stunt phytoplasma no milho (Egito et al. 2024). Por esse método, pode-se evitar regiões intergênicas, proteínas hipotéticas ou elementos de inserção.

Portanto, optou-se pelo uso do RUCS para a seleção de regiões com potencial para o desenvolvimento dos *primers* LAMP. Este programa possui a vantagem de não se restringir

apenas a regiões codificantes, nem exigir a presença de genes completos na escolha das regiões de interesse. Este fator amplia o leque de possibilidades para a escolha de regiões potencialmente promissoras. Além disso, devido às suas características, essa ferramenta destaca-se como um elemento fundamental para o desenvolvimento de *primers* altamente específicos (Thomsen et al. 2017).

Podendo-se destacar as regiões usadas no presente trabalho como as das enzimas da família aldeído desidrogenase (*Aldehyde dehydrogenase*), que desempenham funções celulares vitais e cuja alteração em suas sequências de nucleotídeos pode resultar no acúmulo de substratos de caráter citotóxico (Shortall et al. 2021); da família de reguladores TetR (*TetR - amily transcriptional regulator*) tem uma forte associação com a resistência a antibióticos e o controle de genes que codificam exportadores de moléculas pequenas (Cuthbertson & Nodwell, 2013); da subunidade de proteína translocase SecD (*secD – protein translocase subunit SecD*) que funciona como o principal facilitador da translocação e inserção das proteínas através da membrana interna dos procariotos (Pogliano & Beckwith, 1994; Plessis et al. 2011). O Primer BLAST (NCBI) foi utilizado para verificação da especificidade *in silico* dos conjuntos de *primers* desenvolvidos, essa ferramenta também foi utilizada para avaliação da especificidade *in silico* de *primers* desenvolvidos para detecção de SARS-CoV-2 (Davi et al. 2021). Sequências de genes previamente descritas têm sido extensivamente utilizadas para desenho de *primers*, pois a existência de estudos anteriores geralmente confere maior confiabilidade na escolha dessas regiões, como no caso do gene *recA* para *E. psidii*. Encontrado no cromossomo bacteriano, foi utilizado na diferenciação entre espécies de *Erwinia* (Waleron et al. 2002) e na realocação de espécies dentro do gênero *Dickeya* (Parkinson et al. 2009). No caso da *E. psidii*, a sequência do gene *recA* foi utilizada para o desenho de *primers* para PCR e qPCR (Silva et al. 2015; Hermenegildo et al. 2022). Entretanto, a ocorrência de amplificação inespecífica foi relatada (Silva et al. 2015; Hermenegildo et al. 2022). A aplicação bem-

sucedida de uma região previamente utilizada para o desenho de *primers* LAMP foi relatada para detecção da *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* e da *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* em feijão comum (Paiva et al. 2020). Essa região está localizada no plasmídeo pA e já havia sido utilizada para o desenvolvimento do par de *primers* X4c/X4e para PCR convencional para detecção dos mesmos patógenos (Audy et al. 1994).

O conjunto de *primers* LAMP desenvolvidos a partir da região *recA* não foram funcionais, uma vez que não houve amplificação da região alvo. Portanto, esse conjunto de *primers* foi eliminado durante os testes. Isto demonstra a dificuldade de uso dessa região para o desenho de *primers* tendo em vista o desenvolvimento de métodos moleculares.

A técnica de amplificação isotérmica mediada por *loop* tem sido amplamente utilizada para a detecção de fitopatógeno devido a rapidez da reação, alta sensibilidade, preço acessível e a capacidade de poder ser realizada a uma temperatura constante. Este estudo demonstra o desenvolvimento do primeiro ensaio LAMP para detecção de *E. psidii*. Ele possui aptidão para ser utilizado para monitorar a doença em laboratório e a possibilidade de ser usado para diagnose em campo.

Um dos principais pontos de destaque do LAMP está relacionado ao tempo de reação. Neste ensaio, foi possível obter um resultado positivo em apenas 40 minutos de reação. Essa duração foi semelhante ao que foi demonstrado em um estudo anterior sobre o LAMP desenvolvido para *Erwinia amylovora*, onde a distinção visual entre positivo e negativo foi alcançada em apenas 45 minutos de reação (Gosch et al. 2012). Essa rápida obtenção de resultados é um fator preponderante em aplicações práticas, onde a eficiência e a rapidez são essenciais para a tomada de decisão. Em comparação a outros métodos de detecção desenvolvidos para *Erwinia psidii*, o LAMP destaca-se pelo seu pouco tempo de reação. Enquanto a imunodifusão radial requer um período de incubação em extrato de folhas de 36 a 60 horas (Teixeira et al. 2008), métodos baseados em PCR, como BIO-PCR e IC-PCR,

demandam um tempo mínimo de reação de 2 horas e 20 minutos, sem contar as etapas prévias e a necessidade de processamento posterior para visualização dos resultados em gel de agarose (Silva et al. 2015; Silva et al. 2016). Em contraste, o LAMP oferece um tempo de reação significativamente mais rápido, embora o tempo exato possa variar dependendo das condições experimentais e das especificidades do protocolo.

É importante salientar que a duração da reação LAMP e a visualização do resultado podem variar, com tempos menores e maiores aos encontrados nesse trabalho. Isso pode ocorrer em decorrência do método de visualização empregado. O ensaio LAMP possibilita a utilização de diferentes abordagens para analisar o resultado do processo de amplificação, os quais inclui: a utilização de eletroforese em gel de agarose (Notomi et al. 2000); observação a olho nu da turbidez da solução da reação em função da formação de precipitado de pirofosfato de magnésio resultante da amplificação do DNA alvo (Fukuta et al. 2003); corantes intercalantes de DNA como brometo de etídeo (Zoheir & Allam 2010), SYBR green I (Parida et al. 2005), iodeto de propídio (Hill et al., 2008) e GelRed (Woźniakowski et al. 2012); indicadores de metal (Tomita et al. 2008; Goto et al. 2009) e de pH (Tanner et al. 2015).

A medição da turbidez da reação LAMP foi utilizada para detectar a *Erwinia amylovora*, embora sua duração tenha sido de 2 horas, um tempo considerável para a metodologia LAMP (Temple & Johnson, 2011). Outras formas de verificação da presença dos amplicons oferecem resultados mais rápidos. Neste caso, os autores recorreram a um medidor de absorvância para confirmar o término da reação. No entanto, nem sempre esse tipo de equipamento está disponível para uso, restando apenas a confirmação visual a olho nu, o que pode ser difícil de realizar.

A utilização de SYBR green I para a visualização dos *amplicons* foi empregado com êxito para a detecção de *Xanthomonas euvesicatoria*, e o resultado foi alcançado aos 20 minutos de reação (Larrea-Sarmiento et al. 2018). Uma duração superior ao observado nesse

trabalho. Contudo, o SYBR green I é um corante mais caro, tornando a reação mais onerosa e muitas vezes inviável. Por outro lado, os corantes indicadores de pH e de metal são rápidos, baratos, funcionais e amplamente usados na literatura para detecção de diferentes fitopatógenos. Em um trabalho visando o desenvolvimento de uma metodologia LAMP usando um kit LAMP colorimétrico com corante indicador de pH (phenol red) para detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas de oliveira, a reação foi finalizada aos 40 minutos (Amoia et al. 2023). Uma metodologia LAMP para detecção do fungo *Bipolaris oryzae* usando um corante indicador de metal (Hidroxinafitol Blue) atingiu o ponto final da reação aos 60 minutos (Lakshmi et al. 2022).

Uma das principais vantagens do LAMP é ser uma reação isotérmica, facilitando a aplicação do método. A temperatura de 65 °C demonstrou ser a ideal para amplificação das regiões-alvo, assim como é recomendado pelo fabricante do kit WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (New England Biolabs Inc, Massachusetts, EUA). Além disso, é uma vantagem sobre o sistema de PCR, o qual necessita da alternância de temperaturas, exigindo um termociclador e não somente um banho maria, diferentemente da metodologia LAMP (Ghosh et al. 2015; Lu et al. 2022).

Tratando-se da diagnose de doenças de plantas, um dos principais desafios é a detecção do patógeno em infecções latentes, devido às baixas populações bacterianas no tecido vegetal. Assim, a detecção de patógenos em plantas assintomáticas é primordial para evitar a disseminação do patógeno, especialmente no caso da *E. psidii*, cuja principal forma de disseminação é através de material propagativo contaminado.

A sensibilidade de um método molecular é um fator determinante para o sucesso no emprego dessa metodologia. Partindo desse princípio, o limite de detecção alcançado neste trabalho foi de 1×10^{-4} ng. μL^{-1} de DNA. Curiosamente, limites de detecção similares foram encontrados para a *Dickeya fangzhongdai*, a 1×10^{-4} ng. μL^{-1} (DeLude et al. 2022), e para a

Erwinia amylovora, com limites de detecção entre $0,8 \times 10^{-4}$ ng. μL^{-1} e 1×10^{-4} ng. μL^{-1} (Gosch et al. 2012). Resultado semelhante de sensibilidade para o LAMP de 1×10^{-4} ng. μL^{-1} foi obtido por Larrea-Sarmiento (2018) e Carvalho et al. (2024) para *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* e *Xanthomonas euvesicatoria*, respectivamente. Em contraposição, outro ensaio LAMP elaborado para *Erwinia amylovora* teve o limite de 5×10^{-4} ng. μL^{-1} , que é cinco vezes menos sensível do que o ensaio desenvolvido para *E. psidii* (Temple & Johnson, 2011). Contudo, um teste LAMP para detecção de *Pantoea agglomerans* infectando plantas de ameixa exibiu uma sensibilidade de 5×10^{-6} ng. μL^{-1} , que foi superior ao obtido neste estudo (Shu et al. 2022).

A PCR convencional desenvolvida para *E. psidii* teve sensibilidade semelhante ao ensaio LAMP elaborado nesse estudo. Todavia, a quantificação do DNA utilizado para a PCR foi realizada através de eletroforese em gel com comparação com o marcador High Mass DNA ladder (Invitrogen®) (Silva et al. 2015). Essa metodologia fornece uma estimativa limitada da concentração de DNA, e não pode ser comparado com o DNA quantificado por métodos mais modernos de espectrofotometria ou fluorometria, como Nanodrop® e Qubit® (De-Souza et al. 2016).

A metodologia LAMP permite a detecção em material vegetal sem tratamento prévio das amostras para remoção de compostos com potencial inibitório da reação, devido à capacidade da *Bst* polimerase de tolerar a presença de substâncias inibidoras, sem comprometer o processo de amplificação (Tomlinson et al. 2010; François et al. 2011; Yang et al. 2014; Amoia et al. 2023). Em contraste, a PCR convencional é afetada pela presença de metabólitos secundários (Russell e Paterson, 2004; Schori et al. 2013).

Mais testes são necessários para confirmar a eficácia e versatilidade do método proposto aqui, como avaliar possível inibição da reação ao usar amostras com tecido vegetal; reprodutibilidade, repetindo as reações; e especificidade com DNA de outros patógenos e possíveis microrganismos de vida livre das hospedeiras conhecidas da bactéria *E. psidii*.

7. CONCLUSÃO

O ensaio LAMP desenvolvido neste estudo demonstrou ser um método rápido e eficaz para a detecção de *Erwinia psidii* em laboratório. Apresenta maior agilidade em comparação aos métodos sorológicos e baseados em PCR, além de detectar o DNA de *E. psidii* em baixas concentrações, demonstrando uma alta sensibilidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfenas AC, Valverde Zauza AA, Mafia RG, de Assis TF (2009). Clonagem e Doenças do Eucalipto. Editora UFV pp. 500.

Alič Š, Dermastia M, Burger J, Dickinson M, Pietersen G, Pietersen, Dreo T (2022). Genome-informed design of a LAMP assay for the specific detection of the strain of ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ *Phytoplasma* occurring in grapevines in South Africa. *Plant Disease* **106**:2927–2939. DOI: <https://doi.org/10.1094/pdis-10-21-2312-re>

Alves FHNS, Pereira IC, Santos SA, Monteiro ALR, Vigidal PMP, Alfenas AC, Badel JL (2023). Comprehensive prediction of plant cytoplasmic and apoplasmic effectors underlying *Erwinia psidii* pathogenicity. *Plant Pathology* **72**:130–143. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13636>

Amoia SS, Loconsole G, Ligorio A, Pantazis AK, Papadakis G, Gizeli E, Minafra A (2023). A colorimetric LAMP detection of *Xylella fastidiosa* in crude alkaline sap of Olive trees in Apulia as a field-based tool for disease containment. *Agriculture* **13**:448. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture13020448>

Arriel DAA, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior N, Souza HP, Alfenas AC (2014). Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. *Forest Pathology* **44**:255–265. DOI: <https://doi.org/10.1111/efp.12087>

Audy P, Laroche A, Saindon G, Huang HC, Gilbertson RL (1994). Detection of the bean common blight bacteria, *xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. *Molecular Plant Pathology* **84**:1185–1192.

Caires NP, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Rodrigues FA, Badel JL, Alfenas AC (2020). Bidirectional colonization and biofilm formation by *Erwinia psidii* in eucalypt plants. *Plant Pathology* **69**:549–558. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13136>

Caires NP, Hermenegildo PS, Guimarães LMS, Mafia RG, Zauza EAV, Borges Júnior N, Badel JL, Alfenas AC (2019). Host range of *Erwinia psidii* and genetic resistance of *Eucalyptus* and *Corymbia* species to this pathogen. *Forest Pathology* **49**. DOI: <https://doi.org/10.1111/efp.12527>

Carvalho ICB, Carvalho AMS, Wendland A, Rossato M (2024) Colorimetric LAMP assay for detection of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* in cassava through genomics: a new approach to an old problem. *Plant Disease*. DOI: <https://doi.org/10.1094/pdis-08-23-1507-re>

Chai W, Gansau JA, Atong M, Kadir J, Poili E, Chong K (2017). First report of *Erwinia psidii* associated with papaya dieback disease in Malaysia. *Malaysian Journal of Microbiology* **13**:20–25

Coelho MSV, Mendes AP, Marques ASA, 2002. Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização. Brasília Distrito Federal. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. *Comunicado Técnico* 59.

Coutinho TA, Brady CL, van der Vaart M, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Perez C, Wingfield MJ (2011). A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* **40**:55–60. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13313-010-0013-y>

Cuthbertson L, Nodwell JR (2013). The TetR family of regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **77**:440–475. DOI: <https://doi.org/10.1128/mubr.00018-13>

Davi MJP, Jeronimo SMB, Lima JPMS, Lanza DCF (2021). Design and in silico validation of polymerase chain reaction primers to detect severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Scientific Reports* **11**:1–10. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91817-9>

De-Souza MT, Brígido MM, Maranhão AQ (org) (2016). Técnicas Básicas em Biologia Molecular. Editora Universidade de Brasília pp. 372.

DeLude A, Wells R, Boomla S, et al (2022). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for specific and rapid detection of *Dickeya fangzhongdai* targeting a unique genomic region. *Scientific Reports* **12**:1–15. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22023-4>

Egito ICS, Rodrigues AA, Carvalho ICB, Costa LF, Rossato M (2024). Specific colorimetric LAMP assay for the detection of maize bushy stunt phytoplasma in corn through comparative genomics. *Tropical Plant Pathology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-024-00638-4>

Eichmeier A, Peňázová E, Pokluda R, Vicente JG (2019). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* through a real-time PCR assay targeting the Zur gene and comparison with detection targeting the hrpF gene. *European Journal of Plant Pathology* **155**:891–902. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01820-0>

Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti EJ, Boehme CC, Notomi T (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **62**:41–48.

Freitas GB, Borém A (eds) (2021) Goiaba: do plantio à colheita. Editora UFV pp. 223.

Freitas RG, Hermenegildo PS, Cascardo RS, Guimarães, Lúcio MS, Santos AS, Badel JL Alfenas-Zerbini P, Alfenas AC (2021). Validation and use of a qPCR protocol to quantify the spread of *Ralstonia solanacearum* in susceptible and resistant eucalypt plants. *Plant Pathology* **70**:1708–1718. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13406>

Zoheir KMA, Allam AA (2010). A rapid method for sexing the bovine embryo. *Animal Reproduction Science*, **119**(1–2), 92–96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.12.013>

Fukuta S, Kato S, Yoshida K, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y (2003). Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *Journal of Virological Methods*, **112**(1–2), 35–40. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00187-3](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00187-3)

Garrity GM, Winters M, Searles DB (2001). Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Michigan State University. 2^a ed.

Gao X, Lin H, Revanna K, Dong Q. (2017). A Bayesian taxonomic classification method for 16S rRNA gene sequences with improved species-level accuracy. *BMC Bioinformatics* 18:247 (2017). DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1670-4>

Ghosh R, Nagavardhini A, Sengupta A, Sharma M (2015). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* - wilt pathogen of chickpea. *BMC research notes* 8: DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-015-0997-z>

Gosch C, Gottsberger RA, Stich K, Fischer TC (2012). Blue EaLAMP—a specific and sensitive method for visual detection of genomic *Erwinia amylovora* DNA. *European Journal of Plant Pathology* 134:835–845. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0059-5>

Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki KI (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques* 46(3):167–172. DOI: <https://doi.org/10.2144/000113072>

Hermenegildo P da S, de Freitas RG, de Souza Cascardo R, Guimarães LMS, Badel JL, Alfenas-Zerbini P, Marques ASA, Alfenas AC, Ferreira, MASV (2022). Sensitive detection, quantification, and monitoring of *Erwinia psidii* colonization of guava plants using intercalating dye-based real-time PCR. *Tropical Plant Pathology* 48:375–383. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-022-00542-9>

Hermenegildo P da S, Guimarães LMS, Badel JL, Marques ASA, Alfenas AC, Ferreira MASV (2021). Improved evaluation of the genetic variability of Brazilian strains of *Erwinia psidii* with newly developed microsatellite markers. *Plant Pathology* 70:922–931. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13343>

Hermenegildo P da S, Santos SA, Guimarães LMS, Pereira IC, Vidigal PMP, Badel JL, Alfenas-Zerbini P, Mafía RG, Ferreira MASV, Alfenas AC (2019). Draft Genome Sequence of *Erwinia psidii*, Causal Agent of Bacterial Blight of Guava (*Psidium guava*) and Dieback of Eucalypt (*Eucalyptus* spp.). *Microbiology Resource Announcements* 8. DOI: <https://doi.org/10.1128/mra.01598-18>

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11**(9):1026-1030.

Hill J, Beriwal S, Chandra I, Paul VK, Kapil A, Singh T, Wadowsky RM, Singh V, Goyal A, Jahnukainen T, Johnson JR, Tarr PI, Vats A (2008). Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**(8), 2800–2804. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00152-08>

IBÁ (2022) Indústria Brasileira de Árvores. Relatório IBÁ (2022). In: Iba.org. <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf>. Acesso em: 25/05/2024.

IBÁ (2023) Indústria Brasileira de Árvores. Relatório IBÁ (2023). In: Iba.org. <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2023-r.pdf>. Acesso em: 25/05/2024.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Agricultura. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/goiaba/br>>. Acesso em: 25/05/2024.

Janse JD (2012). Bacterial diseases that may or do emerge, with (possible) economic damage for europe and the mediterranean basin: notes on epidemiology, risks, prevention and management on first occurrence. *Journal of Plant Pathology* **S4.5-S4.29**

Jansen RW, Siegl G, Lemon SM (1990). Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**:2867–2871. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.87.8.2867>

Junqueira NTV, Andrade LRM, Pereira M, Lima MM, Chaves RC (2001). Doenças da Goiabeira no Cerrado. Planaltina, Embrapa. *Circular Técnica* 15. 25 pp.

Junqueira NTV (2002). Manejo integrado de doenças do maracujazeiro, da mangueira, da goiabeira e das anonáceas. Editora UFV

Kado CL, Heskett MG (1970). Meio Seletivo para Isolamento de *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. *Phytopathology* **60**:969–976.

Lakshmi KRS, Kamalakannan A, Gopalakrishnan C, Rajesh S, Panneerselvam S, Ganapati PS (2022) Loop-mediated isothermal amplification assay: A specific and sensitive tool for the detection of *Bipolaris oryzae* causing brown spot disease in rice. *Phytoparasitica* **50**:543–553. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12600-022-00979-3>

Lanna-Filho R, Bieler FL, Borges Junior N (2021). Survival of *Erwinia psidii* in epiphytic, soil and eucalyptus leaf debris conditions. *Forest Pathology* **51**. DOI: <https://doi.org/10.1111/efp.12710>

Larrea-Sarmiento A, Dhakal U, Boluk G, Fatdal L, Alvarez A, Strayer-Scherer A, Paret M, Jones J, Jenkins D, Arif M (2018). Development of a genome-informed loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and specific detection of *Xanthomonas euvesicatoria*. *Scientific reports* **8**:1–11. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32295-4>

López MM, Llop P, Olmos A, Marco-Noales E, Cambra M, Bertolini E (2009). Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? *Current Issues in Molecular Biology* **11**:13–46. DOI: <https://doi.org/10.21775/cimb.011.013>

Lu C, Dai T, Zhang H, Dandan Z, Yuanchao W, Wanfeng Y, Xiaobo Z (2022). A novel LAMP assay using hot water in vacuum insulated bottle for rapid detection of the soybean red crown rot pathogen *Calonectria ilicicola*. *Australasian plant pathology* **51**:251–259. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13313-022-00855-y>

Macagnan D, Ferreira MASV (2018). Movement of the bacterial blight pathogen *Erwinia psidii* in guava varieties differing in susceptibility. *Tropical Plant Pathology* **43**:577–582. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0236-y>

Maktar NH, Kamis S, Mohd Yusof FZ, Hussain NH (2008). *Erwinia papayae* causing papaya dieback in Malaysia. *Plant Pathology* **57**:774–774. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01877>

Mânica I, Icuma IM, Junqueira NTV, Salvador JO, Moreira A, Malavolta E (2000). Fruticultura Tropical V-6: Goiaba. Editora Cinco Continentes pp. 374.

Marques ASA, Coelho MVS, Ferreira MASV, Damasceno JPS, Mendes AP, Vieira TM (2007). Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. *Revista Brasileira de Fruticultura* **29**:488–493. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-29452007000300016>

Matias F (org) (2021). Práticas e Protocolos Básicos de Biologia Molecular. Editora Blucher pp. 276.

Montoya-Estrada CN, Costa CR, Badel JL, Guimarães LMS, Alfenas, AC (2019). Root infection and aerial colonization of eucalypt host plants by *Erwinia psidii*. *Tropical Plant Pathology* **44**:251–257. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0264-7>

Montoya-Estrada CN, Hermenegildo PS, Alvarez-Romero PI, Badel JL, Guimarães LMS, Alfenas AC (2019). Genetic diversity and aggressiveness of *Erwinia psidii* on *Eucalyptus* spp. in Brazil. *Plant Pathology* **68**:31–41. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12927>

Nagamine K, Hase T, Notomi T (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes* **16**:223–229. DOI: <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>

Noriha MA, Hamidun B, Redzuan RA, Jaganath IBS (2010). *Erwinia mallotivora* sp., a New Pathogen of Papaya (*Carica papaya*) in Peninsular Malaysia. *International Journal of Molecular Sciences* **12**:39–45. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms12010039>

Notomi T (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* **28**:63e–663. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>

Oliveira JR, Ventura JA, Silva IT, Costa H (2000). Ocorrência da bacteriose da goiabeira, causada por *Erwinia psidii*, no estado do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira* **25**: 328.

Oliveira MA, Silva SG, Silva-Pereira I, 2016. Amplificação de DNA por PCR e PCR em tempo real. In: De-Souza MT, Brígido MM, Maranhão AQ (eds) *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*. 2^a ed. *Editora UnB*.

Paiva BAR, Wendland A, Teixeira NC, Ferreira MASV (2020). Rapid Detection of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* and *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* in Common Bean by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Disease* **104**:198–203. DOI: <https://doi.org/10.1094/pdis-02-19-0325-re>

Panno S, Matic S, Tiberini A, Caruso AG, Bella P, Torta L, Stassi R, Davino S (2020). Loop mediated isothermal amplification: Principles and applications in plant virology. *Plants* **9**:461. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9040461>

Parida M, Horioke K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, Islam MA, Inoue S, Hosaka N, Morita K (2005). Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**(6), 2895–2903. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2895-2903.2005>

Parkinson N, Stead D, Bew J, Heeney J, Tsrer L, Elphinstone J (2009). Dickeya species relatedness and clade structure determined by comparison of recA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**:2388–2393. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009258-0>

Pereira IC, Badel JL, Vidigal PMP, Sousa AA, Santos AS, Guimarães LMS, Alfenas AC (2021). Prediction, structure characterization, and evolutionary analysis of *Erwinia psidii* putative type III effectors. *Plant Pathology* **70**:555–566. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13302>

Piccinin E, Pascholati SF, 2005. Doenças da goiabeira (*Psidium guajava*). In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA, 2005. Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas. *Ed. Ceres* pp. 401-22.

Plessis DJF du, Nouwen N, Driessen AJM (2011). The sec translocase. *Biochimica et Biophysica acta. Biomembranes* **1808**:851–865. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.08.016>

Pogliano JA, Beckwith J (1994). SecD and SecE facilitate protein export in *Escherichia coli*. *The EMBO journal* **13**:554–561. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06293.x>

Resende RT, Borém A, Leite HG (org) (2022). Eucalipto: do plantio à colheita. Ed. *Oficina de Textos* pp. 288

Rezende AMFA, Tomita CK, Uesugi CH (2008). Fungicidas cúpricos, cloretos de benzalcônio e composto bioativo líquido (Bokashi): fitotoxicidade e controle da seca dos ponteiros causada por *Erwinia psidii* em goiabeiras. *Tropical Plant Pathology* **33**:288–294. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1982-56762008000400005>

Rodrigues Neto J, Robbs CF, Yamashiro T (1987). Uma doença bacteriana da goiaba (*Psidium guajava*) causada por *Erwinia psidii* sp. Nov. *Fitopatologia Brasileira* **12**:345–350.

Romeiro RS, Oliveira JR, Pomella AWV, Barbosa JG, Couto FAA (1994). Situação e perspectivas de controle da morte das pontas da goiabeira (*Erwinia psidii*) em Minas Gerais, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* **19**:309.

Russell R, Paterson M (2004). The isoepoxydon dehydrogenase gene of patulin biosynthesis in cultures and secondary metabolites as candidate PCR inhibitors. *Mycological Research* **108**:1431–1437.

Saettler AW, Schaad NW, Roth DA (1989). Detection of bacteria in seed and other planting material. *American Phytopathological Society*.

Schaad NW, Cheon SS, Tamaki SE, Panopoulos NJ (1995). A Combined Biological and Enzymatic Amplification (BIO-PCR) Technique to Detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bean Seed Extracts. *Phytopathology* **85**:243–248.

Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001). Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. *American Phytopathological society* (APS press).

Schori M, Appel M, Kitko A, Showalter AM (2013). Engineered DNA Polymerase Improves PCR Results for Plastid DNA. *Apple Plant Scientific* **1**:1200519.

Shortall K, Djeghader A, Magner E, Soulimane T (2021). Insights into Aldehyde Dehydrogenase Enzymes: A Structural Perspective. *Frontiers in Molecular Biosciences* **8**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.659550>

Shu R, Yin X, Long Y, Jun Y, Houyin Z (2022). Detection and control of *Pantoea agglomerans* causing plum bacterial shot-hole disease by loop-mediated isothermal amplification technique. *Frontiers in Microbiology* **13**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.896567>

Silva CF, Torres P, Oliveira NPD, Marques ASA, Ferreira MASV (2015) PCR-based methods for detection of *Erwinia psidii* on guava. *Tropical Plant Pathology* **40**:251–259. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-015-0020-1>

Silva CF, Uesugi CH, Blum LEB, Marques ASA, Ferreira MASV (2016). Molecular detection of *Erwinia psidii* in guava plants under greenhouse and field conditions. *Ciência Rural* **46**:1528–1534. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151600>

Silva VL, Lopes CA (1995). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistant to copper in copper-sprayed tomato fields. *Fitopatologia Brasileira*, **20**:85–89.

Tanner NA, Zhang Y, Evans TC (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques* **58**(2):59–68. DOI: <https://doi.org/10.2144/000114253>

Teixeira ACO, Ferreira MASV, Marques ASA (2008). Detecção de *Erwinia psidii* via enriquecimento em extrato de folhas de goiabeira e imunodifusão radial dupla. *Tropical Plant Pathology* **33**:212–218. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1982-56762008000300006>

Teixeira ACO, Marques ASA, Ferreira MASV (2009). Low genetic diversity among pathogenic strains of *Erwinia psidii* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**:678–684. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1517-83822009000300033>

Temple TN, Johnson KB (2011). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Erwinia amylovora* on pear and apple fruit flowers. *Plant Disease* **95**:423–430. DOI: <https://doi.org/10.1094/pdis-09-10-0636>

Thomsen MCF, Hasman H, Westh H, et al (2017). RUCS: rapid identification of PCR primers for unique core sequences. *Bioinformatics* **33**:3917–3921. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx526>

Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* **3**(5):877–882. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>

Tomita CK, Uesugi CH, Blum LEB, Ferreira MASV (2016). Pruning time in two production systems in the guava tree bacterial blight control. *Revista Brasileira de Fruticultura* **38**:e-529. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-29452016529>

Tomlinson JA, Dickinson MJ, Boonham N (2010). Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Letters in Applied Microbiology*. **51**:650–657.

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

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

Waleron M, Waleron K, Podhajaska AJ, Łojkowska E (2002) Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology* **148**:583–595. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-583>.

Wetzel T, Candresse T, Macquaire G, Ravelonandro M, Dunez J (1992). A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* **39**:27–37. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(92\)90122-t](https://doi.org/10.1016/0166-0934(92)90122-t)

Woźniakowski G, Kozdruń W, Samorek-Salamonowicz E (2012). Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. *Methodology* **9**(110):1–11. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-609-8_13

Yang Q, Wang F, Prinyawiwatkul W, Ge B (2014). Robustness of Salmonella loop-mediated isothermal amplification assays for food applications. *Journal of Applied Microbiology* **116**:81–88.

MATERIAL SUPLEMENTAR**Tabela Suplementar 1.** Reações de LAMP com o Kit Warmstart colorimetric LAMP 2X Master Mix (NEB).

Reagente	1x
Água milliQ	9 µL
WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix	12,5 µL
Primer Mix	2,5 µL
DNA (25 ng)	1 µL
Total	25 µL

Tabela suplementar 2. Concentração dos *primers* usada para o *primer* mix 8:1 e 4:1.

Mix primers 8:1	Concentração 1 reação	Volume 1 reação
Água	-	1.4 µL
F3	2 µM	0.05 µL
B3	2 µM	0.05 µL
LF	4 µM	0.1 µL
LB	4 µM	0.1 µL
FIP	16 µM	0.4 µL
BIP	16 µM	0.4 µL
Total		2.5 µL

Mix primers 4:1	Concentração 1 reação	Volume 1 reação
Água	-	1.3 µL
F3	4 µM	0.1 µL
B3	4 µM	0.1 µL
LF	4 µM	0.1 µL
LB	4 µM	0.1 µL
FIP	16 µM	0.4 µL
BIP	16 µM	0.4 µL
Total		2.5 µL