

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE qPCR PARA DETECÇÃO DE  
PECTOBACTÉRIAS E *Ralstonia solanacearum* EM TUBÉRCULOS DE  
BATATA

Joseane Biso de Carvalho  
Eng. Agrônoma, Mestre/UEM.

Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia  
Área de concentração Fitossanidade

Porto Alegre, RS, Brasil  
Dezembro de 2009

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO  
Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS

C331d Carvalho, Joseane Biso de  
Desenvolvimento e validação de qPCR para detecção de pectobactérias e  
*Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata / Joseane Biso de Carvalho  
— Porto Alegre : J.B. de Carvalho, 2009.

xiii, 168 f.; II.

Tese (Doutorado – Fitossanidade) – Programa de Pós-Graduação em  
Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul, Porto Alegre, 2009.

1. Murcha bacteriana : Pectobactéria : Batata. I.Título.

CDD: 632

JOSEANE BISO DE CARVALHO  
Engenheira Agrônoma - UEM  
Mestre em Agronomia - UEM

## TESE

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **DOUTOR EM FITOTECNIA**

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

Aprovado em: 21.12.2009  
Pela Banca Examinadora

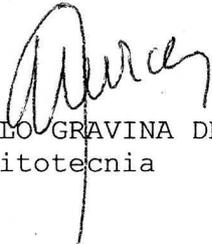


VALMIR DUARTE  
Orientador - PPG Fitotecnia

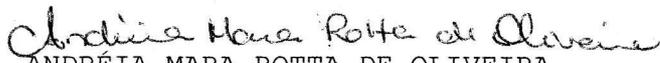
Homologado em: 23.03.2010  
Por



PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia



MARCELO GRAVINA DE MORAES  
PPG Fitotecnia



ANDRÉIA MARA ROTTA DE OLIVEIRA  
UERGS - Novo Hamburgo/RS



NORIMAR D'ÁVILA DENARDIN  
Universidade de Passo Fundo



PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade  
de Agronomia

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me oferecer mais essa oportunidade na vida, sem Ele seria difícil cumprir mais essa etapa.

À minha mãe Anecy B. de Carvalho e irmã Alexandra B. de Carvalho, pelo apoio, compreensão pela minha ausência e motivação para a realização de todo o trabalho.

Ao meu pai, Manoel (*in memoriam*), que sempre me apoiou em todos os meus ideais e sempre estará presente em minha vida.

Ao meu namorado Guilherme, pelo apoio, compreensão e motivação em todos os momentos.

À minha sogra, Reusa Loss, pelo ombro amigo nos momentos difíceis.

Ao professor Valmir Duarte, pela orientação, conselhos e ensinamentos transmitidos ao longo dessa jornada.

Ao professor Rogério Margis, pelo auxílio, orientação e grande contribuição para que esse trabalho fosse realizado.

Aos demais professores, pelos ensinamentos transmitidos ao longo do doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, pela amizade e colaboração.

Aos colegas da Fitossanidade, Adriana A. Figueiró, Isabel P. Paz, Cátia Rommel, Felipe A. S. Graichen pela amizade, incentivo e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Genomas e Populações de Plantas, Andréia, Cláudia, Felipe, Fernanda, Francelli, Guilherme C., Júlio, Lorryne e Nicole pela amizade e companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de ser um de seus alunos.

À Capes, pela disponibilização de uma bolsa de estudo.

Aos engenheiros agrônomos José Daniel Rodrigues Ribeiro da Associação dos bataticultores do Sul do Estado de Minas Gerais (ABASMIG) e Joaquim Gonçalves de Pádua da Estação Experimental da EPAMIG e aos produtores de batata, no município de Pouso Alegre, MG por terem contribuído com as coletas de tubérculos realizadas neste município.

E a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram para a realização deste trabalho.

# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE qPCR PARA DETECÇÃO DE PECTOBACTÉRIAS E *Ralstonia solanacearum* EM TUBÉRCULOS DE BATATA<sup>1</sup>

Autor: Joseane Biso de Carvalho

Orientador: Valmir Duarte

## RESUMO

Pectobactérias (*Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp.) são os agentes causais da canela-preta e podridão-mole, e *Ralstonia solanacearum* da murcha bacteriana. A principal fonte de inóculo dessas doenças é o tubérculo-semente assintomático. As importações brasileiras de tubérculo-semente podem representar um risco à cultura. Tubérculos-semente livres de patógenos é considerada a melhor estratégia para manejar essas doenças. Entretanto, métodos sensíveis para detecção desses patógenos são necessários. Sendo assim, o principal objetivo dessa pesquisa foi desenvolver e validar um método para detecção de pectobactérias e *R. solanacearum* presentes em baixa densidade populacional em tubérculos de batata, através de qPCR. A qPCR foi realizada com sondas de hidrólise (sondas TaqMan<sup>®</sup> MGB) e fluoróforo intercalante de DNA fita-dupla (SYBR Green I). Esse método poderá ser utilizado como uma ferramenta em estudos epidemiológicos, programas de certificação e inspeção quarentenária. O uso de cartões FTA para a coleta e extração do DNA dos tubérculos foi testado, utilizando três métodos de transferência de amostras: pressão direta; cone triturado em PBS; e fragmentos retirados com seringa e triturados em PBS. O primeiro método foi o mais sensível, proporcionando um limite de detecção por PCR de  $1 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para as bactérias-alvo, exceto para *R. solanacearum*, na qual se usou os oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2 em PCR e qPCR. *Dickeya* spp. (54,9%) e *R. solanacearum* (52,9%) apresentaram a maior incidência nas 206 amostras analisadas por qPCR, seguidas por *P. brasiliensis* (16,5%), *P. atrosepticum* (9,2%), *P. carotovorum* (6,3%) e *P. betavasculorum* (1,9%). Esta última trata-se do primeiro registro em batata no Brasil. Associações entre as espécies bacterianas nos tubérculos também foram verificadas, onde *Dickeya* spp. e *R. solanacearum* foram encontradas em associação (24,8%) nos tubérculos, mas estavam presentes isoladamente em 20,8 e 13,4%, respectivamente. Dentro desse contexto, a presença de uma população bacteriana heterogênea nos tecidos vasculares dos tubérculos foi demonstrada.

---

<sup>1</sup>Tese de doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (131 p.) Dezembro, 2009.

# DEVELOPMENT AND VALIDATION OF qPCR FOR DETECTION OF PECTOBACTERIA AND *Ralstonia solanacearum* IN POTATO TUBER

Author: Joseane Biso de Carvalho  
Advisor: Valmir Duarte

## ABSTRACT

Pectobacteria (*Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp.) are the causal agent of blackleg and soft rot, and *R. solanacearum* of bacterial wilt, in potato crop. The main source of inocula is symptomless seed potato tuber. The Brazilian imports of seed potato may pose a risk to the crop. Pathogen-free seed is the best strategy to manage these diseases. Therefore high-sensitive methods for detection of these bacteria are mandatory. Thus, the main objective of this study was to develop and validate a method for detection of pectobacteria and *R. solanacearum* present in low population density in potato tubers, by qPCR (absolute quantification) in assay with hydrolysis probes (TaqMan<sup>®</sup> MGB probes) and double-stranded DNA binding dye (SYBR Green I). This method can be used as a tool in epidemiological studies, certification programs, and quarantine inspection. The use of FTA cards to collection, and DNA extraction was tested using three methods: direct pressure, cone crushed in PBS, and small pieces removed with syringe and crushed in PBS. The first method was the most sensitive, providing a limit of detection by PCR of  $1 \times 10^2$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Primers were designed for target bacterial species, except for *R. solanacearum*, in which was used OLI1/Y2 primers for PCR and qPCR. *Dickeya* spp. (54.9%) and *R. solanacearum* (52.9%) had the highest incidence in the 206 samples analyzed by qPCR, followed by *P. brasiliensis* (16.5%), *P. atrosepticum* (9.2%), *P. carotovorum* (6.3%) and *P. betavascularum* (1.9%). The occurrence of *P. betavascularum* in potato is the first record of potato in Brazil. Associations between bacterial species in the tubers were also found, where *Dickeya* spp. and *R. solanacearum* were found in association (24.8%) in the tubers, but were present alone in 20.8 and 13.4%, respectively. Within this context, the presence of a heterogeneous bacterial population in the vascular tissues of the tubers was demonstrated.

---

<sup>1</sup>Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (131 p.) December, 2009.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 A cultura da batata.....	10
2.2 Canela-preta, podridão da haste e podridão-mole dos tubérculos.....	14
2.2.1 <i>Pectobacterium</i> spp. e <i>Dickeya</i> spp. como agentes causais de doenças em batata.....	16
2.3 <i>Ralstonia solanacearum</i> : uma espécie complexa e a murcha bacteriana.....	28
2.3.1 Variabilidade de <i>Ralstonia solanacearum</i> e implicações na identificação e detecção das estirpes no campo.....	31
2.4 Métodos de detecção e identificação de pectobactérias e <i>Ralstonia solanacearum</i> baseados em PCR.....	35
2.5 Tecnologias para extração e purificação de ácidos nucleicos de fitopatógenos para o diagnóstico molecular de doenças em plantas.....	43
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 Estirpes bacterianas de referência e condições de crescimento.....	47
3.2 Extração de DNA das estirpes de referência por lise alcalina.....	49
3.3 Extração de DNA das estirpes de referência pelo método do cartão FTA.....	50

3.4	Padronização e validação do método de coleta, transferência de amostras de tubérculos e extração de DNA com o uso de cartões FTA.....	51
3.4.1	Coleta de amostras de tubérculos de batata (DNA total).....	53
3.4.2	Purificação do DNA dos cartões FTA.....	55
3.5	Escolha dos genes para desenho de oligonucleotídeos iniciadores e sondas para detecção de pectobactérias por qPCR.....	56
3.6	Detecção de <i>Pectobacterium</i> spp., <i>Dickeya</i> sp. e <i>Ralstonia solanacearum</i> por PCR.....	60
3.7	Obtenção dos padrões para a curva de calibração da qPCR.....	61
3.8	Padronização e validação de qPCR por quantificação absoluta para detecção de pectobactérias ( <i>Pectobacterium</i> spp. e <i>Dickeya</i> sp.) e <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1	Padronização e validação do método de coleta, transferência de amostras de tubérculos e extração de DNA com o uso de cartões FTA.....	67
4.2	Escolha dos genes para desenho de oligonucleotídeos iniciadores e sondas para detecção de pectobactérias por qPCR.....	73
4.3	Detecção de pectobactérias ( <i>Pectobacterium</i> spp. e <i>Dickeya</i> spp.) e <i>Ralstonia solanacearum</i> por PCR.....	79
4.4	Padronização e validação de qPCR para detecção de pectobactérias e <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	89
4.4.1	<i>Dickeya</i> spp. ....	89
4.4.2	<i>Pectobacterium</i> spp. ....	103
4.4.2.1	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> .....	106
4.4.2.2	<i>Pectobacterium brasiliensis</i> .....	111
4.4.2.3	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> .....	117
4.4.2.4	<i>Pectobacterium betavasculorum</i> .....	122
4.4.3	<i>Ralstonia solanacearum</i> .....	126
4.5	Avaliação da diversidade populacional de bactérias fitopatogênicas nos tubérculos.....	135
5	CONCLUSÕES.....	141
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	143
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145
8	APÊNDICE.....	162

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Esquema de classificação de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Fegan & Prior, 2005). Porto Alegre, RS, 2009.....	29
2. Estirpes bacterianas utilizadas no estudo como referência (controles) em PCR e qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.....	48
3. Número de amostras coletadas no Brasil e em outros países. Porto Alegre, RS, 2009.....	54
4. Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para o estudo das pectobactérias, utilizando os genes <i>acnA</i> para <i>Pectobacterium</i> spp. e <i>mtlD</i> para <i>Dickeya</i> sp. Porto Alegre, RS, 2009.....	58
5. Sondas de hidrólise desenhadas para as espécies de <i>Pectobacterium</i> para uso em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.....	59
6. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR. Porto Alegre, RS, 2009.....	60
7. Detecção de pectobactérias ( <i>Pectobacterium</i> spp. e <i>Dickeya</i> spp.) e <i>Ralstonia solanacearum</i> por PCR. Porto Alegre, RS, 2009.....	83
8. Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados em qPCR pelo sistema SYBR Green I para detecção de <i>Dickeya</i> sp. Porto Alegre, RS, 2009.....	90
9. Quantidade de DNA dos padrões de <i>Dickeya</i> sp. empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.....	97
10. Detecção de <i>Dickeya</i> sp. por qPCR pelo sistema SYBR-Green I. Porto Alegre, RS, 2009.....	101
11. Especificidade dos oligonucleotídeos <i>acnAF/R</i> para detecção de <i>Pectobacterium</i> spp. por PCR Porto Alegre, RS, 2009.....	105
12. Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores <i>acnAF/R</i> e sondas Pa utilizados em qPCR pelo sistema TaqMan para detecção de <i>Pectobacterium atrosepticum</i> . Porto Alegre, RS, 2009.....	107
13. Quantidade de DNA dos padrões de <i>Pectobacterium atrosepticum</i> empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.....	108
14. Detecção de <i>Pectobacterium atrosepticum</i> com os oligonucleotídeos <i>acnA</i> e sonda Pa por qPCR. Porto Alegre, RS,	

	2009.....	110
15.	Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores acnAF/R e sonda Pbr utilizados em qPCR pelo sistema TaqMan para detecção de <i>Pectobacterium brasiliensis</i> . Porto Alegre, RS, 2009.....	112
16.	Quantidade de DNA dos padrões de <i>Pectobacterium brasiliensis</i> empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.....	113
17.	Detecção de <i>Pectobacterium brasiliensis</i> por qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores acnA e sonda Pbr Porto Alegre, RS, 2009.....	116
18.	Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores acnAF/R e sonda Pcc utilizados em qPCR pelo sistema TaqMan para detecção de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> . Porto Alegre, RS, 2009.....	118
19.	Quantidade de DNA dos padrões de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.....	119
20.	Detecção de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> por qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores acnA e a sonda Pcc. Porto Alegre, RS, 2009.....	121
21.	Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores acnAF/R e sonda Pbet utilizados em qPCR pelo sistema TaqMan para detecção de <i>Pectobacterium betavasculorum</i> . Porto Alegre, RS, 2009.....	123
22.	Quantidade de DNA dos padrões de <i>Pectobacterium betavasculorum</i> empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.....	124
23.	Detecção de <i>Pectobacterium betavasculorum</i> por qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores acnAF/R e a sonda Pbet. Porto Alegre, RS, 2009.....	126
24.	Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2 utilizados em qPCR pelo sistema SYBR Green I para detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> . Porto Alegre, RS, 2009.....	128
25.	Quantidade de DNA dos padrões de <i>Ralstonia solanacearum</i> empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.....	129
26.	Detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> por qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2 pelo sistema SYBR Green. Porto Alegre, RS, 2009.....	131

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Representação esquemática de qPCR pelo método de detecção com fluoróforo intercalante de DNA fita-dupla (qPCR SYBR Green). Porto Alegre, RS, 2009.....	39
2. Representação esquemática da qPCR pelo sistema de detecção com sonda de hidrólise (qPCR TaqMan®). Porto Alegre, RS, 2009.....	40
3. Sensibilidade dos métodos de coleta e transferência de amostras com suspensão bacteriana de <i>P. brasiliensis</i> (D.O. 600nm=0,1) para o cartão FTA por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores acnA. 1. DNA genômico de <i>P. brasiliensis</i> (Pbr1692) extraído pelo método de lise alcalina (controle positivo da PCR), 2. Controle positivo do cartão FTA com suspensão bacteriana de <i>P. brasiliensis</i> (DO <sub>600</sub> =1,0), 3. Controle positivo do cartão FTA com suspensão bacteriana de <i>P. brasiliensis</i> (D.O. 600nm=1,0) + Batata, 4. Suspensão bacteriana de <i>P. brasiliensis</i> 1 x 10 <sup>8</sup> , 5. 1 x10 <sup>7</sup> , 6. 1 x 10 <sup>6</sup> , 7. 1 x 10 <sup>5</sup> , 8. 1 x 10 <sup>4</sup> , 9. 1 x 10 <sup>3</sup> , 10. 1 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL. CN: Controle negativo da PCR. Porto Alegre, RS, 2009.....	69
4. Avaliação da distribuição das amostras no cartão retiradas de cada quadrante (16 quadrantes). CN: controle negativo da reação. 1. Controle positivo da PCR e FTA Card (Pbr1692), Amostras de DNA de células bacterianas (2–17): discos 1-16; Amostras de DNA de batata e células bacterianas (18-33): discos 1-16. Porto Alegre, RS, 2009.....	72
5. Árvore filogenética baseada no método de <i>Neighbour Joining</i> utilizando sequências parciais do gene <i>acnA</i> de estirpes de <i>Pectobacterium</i> spp., <i>Dickeya</i> spp. e <i>Ralstonia solanacearum</i> obtidas do Genbank (NCBI). O método de <i>p-distance</i> foi utilizado para estimar as distâncias entre as sequências e o teste de <i>bootstrap</i> (1000 repetições) foi utilizado para quantificar o erro padrão das estimativas de distância. Porto Alegre, RS, 2009.....	75
6. Árvore filogenética baseada no método de <i>Neighbour Joining</i>	

baseada em sequências do gene <i>mtlD</i> de estirpes de <i>Pectobacterium</i> spp, <i>Dickeya</i> spp. e <i>Ralstonia eutropha</i> (NCBI). O método de <i>p-distance</i> foi utilizado para estimar as distâncias entre as sequências e o teste de <i>bootstrap</i> (1000 repetições) foi utilizado para quantificar o erro padrão das estimativas de distância. Porto Alegre, RS, 2009.....	76
7. Alinhamento de sequências do gene <i>acnA</i> de <i>Pectobacterium</i> spp. e <i>Dickeya</i> sp. e posicionamentos dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas para <i>Pectobacterium</i> spp. As espécies foram representadas como: Pcc ( <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ); Pa ( <i>P. atrosepticum</i> ); Pbr ( <i>P. brasiliensis</i> ); Pw ( <i>P. wasabiae</i> ); e Pbet ( <i>P. betavasculorum</i> ) em vermelho. Porto Alegre, RS, 2009.....	78
8. Alinhamento do gene <i>mtlD</i> de <i>Pectobacterium</i> sp. e <i>Dickeya</i> sp. e posicionamento dos oligonucleotídeos para <i>Dickeya</i> spp. Os gêneros <i>Pectobacterium</i> e <i>Dickeya</i> foram representados por Pecto e Dick em vermelho, respectivamente. Porto Alegre, RS, 2009.....	79
9. Produtos de amplificação das estirpes de referência de <i>Dickeya</i> spp. M. Marcador de peso molecular 1 Kb DNA plus ladder (Invitrogen); 1. Controle negativo (água deionizada); 2. e 3. <i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i> (IBSBF 231 e IBSBF 920); 4. <i>Dickeya dianthicola</i> (IBSBF 856); 5. <i>Dickeya</i> sp. (CEN80); 6. Amostra 1038, e 7. MG-1. Porto Alegre, RS, 2009...	89
10. Gráfico de amplificação e curva de dissociação na qPCR e eletroforese em gel de agarose (2%) em amostras de controle positivo (positivo para qPCR e PCR), amostras de campo (positivo para qPCR e negativo para PCR) e controle negativo (negativo para qPCR e PCR). Em detalhe, Temperatura de <i>Melting</i> (Tm). Porto Alegre, RS, 2009.....	92
11. Curvas de dissociação para <i>Dickeya</i> sp. com os oligonucleotídeos <i>mtlD</i> obtidas de controles positivos e amostras de campo. A. amostra MG-1; B. estirpe <i>D. chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i> IBSBF 231; C. amostra MG-35; D. estirpe <i>D. dianthicola</i> IBSBF 856 e E. estirpe <i>D. chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i> IBSBF 920. Em detalhe: Temperatura de <i>Melting</i> (Tm). Porto Alegre, RS, 2009.....	94
12. Curva de calibração da concentração de DNA (ng/μL) de <i>Dickeya</i> sp. em relação ao ciclo <i>threshold</i> . Porto Alegre, RS, 2009.....	99
13. Produtos de amplificação das estirpes de referência de <i>Pectobacterium</i> spp. M. Marcador de peso molecular 1 Kb DNA plus ladder (Invitrogen); 1. Controle negativo (água deionizada); 2. <i>Pectobacterium atrosepticum</i> (Pa 790); 3. <i>Pectobacterium brasiliensis</i> (IBSBF 1692); 4. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (IBSBF 791); 5. <i>Pectobacterium betavasculorum</i> (IBSBF 787), e 6. Amostra 1027. Porto Alegre, RS,	

	2009.....	104
14.	Curva de calibração da concentração de DNA (ng/μL) de <i>Pectobacterium atrosepticum</i> em relação ao ciclo <i>threshold</i> . Porto Alegre, RS, 2009.....	109
15.	Curva de calibração da concentração de DNA (ng/μL) de <i>Pectobacterium brasiliensis</i> em relação ao ciclo <i>threshold</i> . Porto Alegre, RS, 2009.....	114
16.	Curva de calibração da concentração de DNA (ng/μL) de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> em relação ao ciclo <i>threshold</i> . Porto Alegre, RS, 2009.....	120
17.	Curva de calibração da concentração de DNA (ng/μL) de <i>Pectobacterium betavasculorum</i> em relação ao ciclo <i>threshold</i> . Porto Alegre, RS, 2009.....	125
18.	Temperatura de desnaturação na curva de dissociação e perfil eletroforético de <i>Ralstonia solanacearum</i> . Tamanho do fragmento: 208 pb. Porto Alegre, RS, 2009.....	127
19.	Curva de calibração da concentração de DNA (ng.μL <sup>-1</sup> ) de <i>Ralstonia solanacearum</i> em relação ao ciclo <i>threshold</i> . Porto Alegre, RS, 2009.....	130
20.	Amostras infectadas (%) pelas espécies <i>Dickeya</i> sp. (Dick), <i>Ralstonia solanacearum</i> (Rsol), <i>Pectobacterium atrosepticum</i> (Pa), <i>Pectobacterium brasiliensis</i> (Pbr), <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Pcc) e <i>Pectobacterium betavasculorum</i> (Pbet). Porto Alegre, RS, 2009.....	136
21.	Incidência de bactérias-alvo nos tubérculos de batata, individualmente ou associadas. Bactérias detectadas no estudo: <i>Dickeya</i> sp. (Dick), <i>Ralstonia solanacearum</i> (Rsol), <i>Pectobacterium atrosepticum</i> (Pa), <i>Pectobacterium brasiliensis</i> (Pbr), <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Pcc) e <i>Pectobacterium betavasculorum</i> (Pbet). Porto Alegre, RS, 2009.....	140

## 1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é atualmente o quarto alimento mais consumido no mundo, perdendo somente para o arroz, trigo e milho. No Brasil, planta-se aproximadamente 145.000 ha/ano de batata, com produtividade média de aproximadamente 25 a 30 toneladas/ha. A produção mundial e brasileira tem aumentado a cada ano, porém, esse incremento na produção ainda é limitado por fatores como a ocorrência de doenças.

A podridão-mole, canela-preta e murcha bacteriana estão entre as principais doenças bacterianas que afetam a cultura da batata e têm causado perdas elevadas em pré- e pós-colheita ao longo dos anos em escala mundial.

*Pectobacterium atrosepticum* é considerada o principal agente causal da canela-preta em regiões de clima temperado. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, em avaliações na Holanda entre os anos 2005 e 2008 e na França, nos anos de 2003 e 2005, foi encontrada em 15 e 20% das plantas com canela-preta, respectivamente. *Pectobacterium betavascularum* tem sido relatada causando podridão-mole somente em beterraba, e até o momento, não se tem nenhum relato da sua ocorrência em batata.

Uma nova espécie, identificada primeiramente no Brasil, *P. brasiliensis*, já foi encontrada nos Estados Unidos, Israel e África, causando canela-preta em batata. No Brasil, esta espécie tem causado canela-preta em áreas de clima subtropical úmido com temperaturas relativamente amenas (17-20 °C) durante a estação de crescimento. *Pectobacterium wasabiae*, agente causal de podridão-mole em *wasabi* (raiz forte utilizada na culinária japonesa) foi relatada recentemente causando podridão-mole em batata na Nova Zelândia. No entanto, pouco se sabe sobre a ecologia de *P. brasiliensis*, e se *P. betavascularum* ou *P. wasabiae* podem causar doença em batata no Brasil.

As espécies do gênero *Dickeya* formam um grupo bastante heterogêneo, causando doença em um grupo diverso de espécies de plantas, principalmente a batata. Em batata, espécies de *Dickeya* causam canela-preta, com sintomas diferenciados dependendo das condições climáticas. Em áreas semi-áridas e tropicais, ocorrem podridões nos tubérculos em pré-emergência e podridão extensiva das hastes. Em regiões de clima temperado, murcha associada com podridão limitada da haste, ou ausência de podridão na haste, seguida de dessecação e morte da planta são os sintomas mais comuns. A alta umidade relativa tende a reduzir a dessecação e favorece a podridão-mole de tecidos infectados. No entanto, os sintomas geralmente aparecem como murcha nas folhas do topo da planta, a qual se dissemina rapidamente para as folhas baixas, e em seguida, ocasiona a dessecação da planta por inteiro. Além disso, descoloração do sistema vascular na base da haste pode ser observada, seguido pelo escurecimento externo, como o sintoma típico descrito para canela-preta.

Estudos mais recentes relatam que os sintomas em plantas de batata causados pelas estirpes de *Dickeya* são diferentes quando comparados a canela-preta causada por *P. atrosepticum*. Os sintomas sempre aparecem na parte superior da planta, enquanto a base da haste permanece verde. Necrose interna na região da medula já foi encontrada na haste, sem qualquer vestígio de podridão externa. Esses sintomas foram encontrados em lavouras de batata na Finlândia, Israel, África do Sul e Espanha, estando associados à baixa umidade relativa. Em clima tropical, como no Peru e em regiões temperadas, como Japão e Suíça, podridão extensiva da haste tem sido relatada, possivelmente devido à alta umidade relativa nas lavouras.

Estudos apontavam que estirpes de *Dickeya* sp. associadas à batata sempre pertenciam aos biovares 1 e 7, os quais coincidem com *D. dianthicola*, uma espécie mais associada com regiões frias, que se encontra disseminada por toda a Europa. Nos outros continentes, as estirpes de batata pertencem ao biovar 3, atualmente *D. dadantii* e *D. zaeae*. Estas apresentam maior temperatura de crescimento e são mais adaptadas a climas quentes. Mais recentemente, variantes adicionais de *Dickeya* sp. têm sido encontradas na Finlândia, Dinamarca, Escócia, Israel, Holanda, França e Espanha. A presença de um grupo de *Dickeya* sp. bastante divergente de *D. dianthicola* foi descrito baseando-se em sequências espaçadoras intergênicas do rDNA 16S-23S. Estirpes deste novo grupo foram consideradas mais virulentas do que *D. dianthicola* em ensaios de casa de vegetação e campo. Do aumento destes surtos epidêmicos de canela-preta e murcha provocados por *Dickeya* sp. na Europa, surge a necessidade de estudos de população desses patógenos em

lavouras de batata no Brasil, com o objetivo de verificar se as estirpes desse gênero bacteriano estão presentes nos tubérculos-semente.

A principal fonte de inóculo e a mais importante forma de dispersão de *Pectobacterium* ou *Dickeya* spp. a longas distâncias são reconhecidamente os tubérculos-semente contaminados. A produção de lotes de sementes livres desses patógenos é considerada a mais importante estratégia para controlar a disseminação dos agentes causais da canela-preta. A redução da contaminação de tubérculos pode ser alcançada pela restrição do número de gerações de populações patogênicas no campo. Métodos de redução da população do patógeno nos tubérculos infectados foram testados, tais como, o tratamento com água quente, uso de antibióticos (estreptomicina) e compostos à base de cobre, mas nenhum deles resultou em erradicação dessas bactérias.

O conhecimento da distribuição geográfica de populações de espécies de *Dickeya* e *Pectobacterium* nos tubérculos-semente deve ser implementado em amostragens para programas de certificação de sementes, uma vez que pouca informação se tem da distribuição de espécies de *Pectobacterium* e *Dickeya* em tubérculos-semente no Brasil, e do nível de infecção latente encontrado nos mesmos.

Outra doença que vem causando problemas na cultura da batata é a murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. Essa doença é considerada atualmente uma das mais importantes para a cultura, em função de a bactéria ser considerada praga quarentenária A1 em países, como Canadá e EUA; por ser um patógeno com ampla gama de hospedeiros, e também por

apresentar a capacidade de permanecer em baixos níveis populacionais sem causar sintomas nos tubérculos-semente.

A ocorrência do sintoma de murcha causado por *R. solanacearum* pode ser confundido com o sintoma provocado pela *Dickeya* sp. em plantas de batata nas lavouras. Os sintomas são semelhantes, comprometendo o diagnóstico visual. Com isso, existe a necessidade de métodos diagnósticos mais apurados e sensíveis para identificá-las.

A ocorrência de infecções latentes causadas por *R. solanacearum* nos tubérculos-semente ocorre com a mesma problemática do que com *Pectobacterium* e *Dickeya* spp. e os programas de certificação devem ser intensificados para evitar a disseminação. A avaliação de infecções latentes causadas por essas bactérias nos tubérculos ainda não é utilizada em programas de certificação dos tubérculos-semente. O uso dessa avaliação na certificação pode impedir a entrada de tubérculos infectados com baixo nível populacional dessas bactérias, que podem acarretar em possíveis epidemias dessas doenças no campo.

Por enquanto, não existe na legislação brasileira nenhuma instrução normativa que defina a inspeção da presença de infecções latentes nos tubérculos-semente. A inspeção nos tubérculos-semente importados avalia a presença de vírus e nematóides em laboratório. Para bactérias e fungos, é feitos apenas a inspeção visual nos tubérculos, para verificar a presença de sintomas da doença, baseando-se nos níveis de tolerância para semente básica, registrada e certificada. *R. solanacearum* apresenta níveis de tolerância zero para as três classes de batata-semente. Os níveis de tolerância para

*Pectobacterium* e *Dickeya* spp. é de 1,0% para semente-básica e registrada, e de 2,0% para sementes registradas. Porém, a inspeção fitossanitária para tubérculos-semente importados não corrige esse problema da entrada de bactérias presentes na forma de infecção latente, o que implica na entrada de novas espécies, de estirpes não relatadas no país por esses tubérculos, ou por outros órgãos propagativos (bulbos), mudas, plantas ornamentais, frutos e flores importados.

Atualmente, 70% dos tubérculos-semente utilizados no país são importados de países da União Européia (Holanda, França, Reino Unido: Inglaterra, Escócia, País de Gales e Irlanda do Norte), América do Sul (Argentina e Chile) e América do Norte (Canadá e EUA). A ocorrência de infecções latentes por essas bactérias nos tubérculos-semente torna a importação um risco para a cultura da batata, visto que esses tubérculos podem apresentar a bactéria, mas não apresentarem sintomas dessas doenças. Além disso, ainda se tem o risco de importação de outros produtos (mudas, plantas, frutos e flores) que podem carregar inóculo dessas bactérias e disseminar-se no país para outras culturas até chegar na batata. O uso da certificação de sementes com a detecção de infecções latentes deve ser implantado, com o uso de ferramentas mais sensíveis para detecção de fitopatógenos em baixo nível populacional.

A detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas têm sido feita até o momento por caracterização bioquímica e fisiológica, métodos sorológicos (ELISA, imunofluorescência), marcadores moleculares (RFLP, RAPD, AFLP), macro e microarranjos de DNA, e métodos baseados em PCR (Reação em

Cadeia da Polimerase), na qual os últimos têm se mostrado mais promissores e amplamente utilizados em função da sensibilidade, especificidade e facilidade de realização dos ensaios em relação aos outros métodos. A PCR pode ser utilizada para verificar a presença de patógenos ao nível de espécie, subespécie, biovar, raça em uma mesma reação (PCR multiplex) ou isoladamente.

A quantificação da carga de inóculo presente em amostras de plantas pode ser feita por qPCR (PCR em tempo real). A sensibilidade da PCR é de aproximadamente 100 pg de DNA genômico e de aproximadamente 10 fg de DNA, através da qPCR. Um nanograma de DNA genômico bacteriano equivale a aproximadamente  $10^5$  moléculas de um gene-alvo de cópia única, o que corresponde ao número de células bacterianas. A qPCR permite a detecção de aproximadamente  $100 \text{ fg.mL}^{-1}$ . Considerando que a maioria dos genomas bacterianos pesam em média 5 fg, a detecção de 20 células presentes em um mililitro é possível, dependendo da eficiência da reação e do método de extração do DNA.

A sensibilidade da qPCR parece promissora para avaliar a ocorrência de infecções latentes causadas por fitopatógenos em tubérculos-semente, plantas e frutos. As infecções latentes são caracterizadas por apresentar populações de fitopatógenos (ex. bactérias) em baixos níveis nos tecidos do hospedeiro, sem qualquer manifestação dos sintomas, dificultando sua detecção por técnicas consideradas 'ouro' como ELISA e PCR convencional.

A utilização de técnicas baseadas em PCR para detecção de bactérias fitopatogênicas em tubérculos-semente requer métodos apurados para extração

do DNA. A amostragem de tubérculos determinada pelo Ministério da Agricultura para serem analisados requer 110 tubérculos por lote/carga/container ou partida com peso máximo de 25.000 kg. A dificuldade de se extrair o DNA em tubérculos torna-se bastante dificultada, em função do número e volume de tubérculos trazidos ao laboratório. A amostra composta consta de 110 cones retirados da região do estolão, onde se concentram os vasos do xilema. Métodos para facilitar esse processo devem ser aprimorados, para reduzir o número de tubérculos analisados que resultem em uma detecção com sensibilidade analítica considerável. As populações de *Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp. e *Ralstonia solanacearum* em infecções latentes podem ser de aproximadamente  $1 \times 10^8$  células bacterianas por mL de suco dos tubérculos.

O uso de cartões FTA (Whatman, GE) pode auxiliar na coleta de amostras de DNA de plantas, principalmente de tubérculos. Alguns relatos do uso desses cartões para coletar amostras de plantas têm sido feito com folhas de tomateiro, videira, alfafa e mandioca. A detecção de fitopatógenos em plantas utilizando a matriz de FTA para a coleta, armazenamento e extração de ácidos nucleicos (DNA e RNA) tem sido utilizada para vírus. Até o momento, cartões FTA para coleta extração e armazenamento de DNA têm sido utilizados para coleta de DNA/RNA de patógenos de humanos e animais. A coleta de DNA/RNA por cartões FTA para análises por PCR em plantas e principalmente tubérculos de batata para a detecção de fitopatógenos tem poucos relatos.

Com isso, o presente trabalho teve como principal objetivo padronizar e validar um método para detecção molecular de pectobactérias (*Pectobacterium*

spp. e *Dickeya* spp.) e *Ralstonia solanacearum* presentes em baixa densidade populacional em tubérculos-semente. A detecção molecular dessas bactérias utilizou o método de qPCR por Quantificação absoluta do inóculo, através de sondas de hidrólise (sondas TaqMan<sup>®</sup> MGB) e fluoróforo intercalante de DNA fita-dupla (SYBR-Green I). A coleta de amostras de DNA dos tubérculos usou o método do cartão FTA. Esse método como um todo poderá constituir uma ferramenta para estudos epidemiológicos, certificação de tubérculos-semente e inspeção quarentenária.

Entre os objetivos específicos, incluiu-se: (i) validar um método para coleta e extração de DNA de amostras de tubérculos; (ii) desenhar um par de oligonucleotídeos iniciadores e sondas para *Pectobacterium* spp. para detecção através de qPCR (Sistema TaqMan); (iii) desenhar um par de oligonucleotídeos iniciadores para *Dickeya* spp. para uso em qPCR (Sistema SYBR Green); (iv) avaliar um par de oligonucleotídeos iniciadores já relatado na literatura para detecção de *R. solanacearum* através de PCR para uso em qPCR (Sistema SYBR-Green) e (iv) validar o método quantitativo (qPCR) para detecção molecular de infecções latentes de pectobactérias e *R. solanacearum*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura da Batata

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma espécie da família das Solanáceas, originária da América do Sul, mais precisamente na divisa entre Bolívia e Peru, próximo ao lago Titicaca, o qual se localiza a 3800 m acima do nível do mar, próximo a Cordilheira dos Andes (Pereira, 2003; Cib, 2008). No Brasil, a cultura difundiu-se ao longo do período colonial pelos portugueses e inicialmente era cultivada em pouca quantidade, em hortas familiares. Com a chegada de outras culturas e o crescimento da população, o cultivo tornou-se mais comum, e um exemplo disso foram os ingleses que aqui viviam e estavam envolvidos na construção de ferrovias, e exigiam sempre à mesa, a ponto de ser chamada de batata “inglesa” (Pereira, 2003).

Atualmente, a batata é um dos alimentos mais consumidos no mundo e pesquisadores da história da alimentação apontam duas hipóteses básicas para o êxito e a disseminação da batata no mundo: o valor energético e ausência de colesterol, além de possuir sabor e cheiro pouco acentuado, possibilitando centenas de combinações que resultam em sabores diferentes (Prokop, 2008).

Seu valor energético agregado ao teor de proteínas e vitaminas acentua ainda mais sua importância como a base alimentar para uma população desnutrida em países populosos e subdesenvolvidos (Fao, 2008; Prokop, 2008). Esse aumento drástico da produção e consumo de batata nos países subdesenvolvidos tem ocorrido em função do aumento do consumo de produtos congelados pré-prontos (batata pré-frita) e '*chips*', e o aumento de redes de '*fast-food*' que comercializam batata-frita e batata assada. Isso também acentuou o surgimento e fortalecimento das indústrias de processamento de batata nesses países (Fao, 2008).

Com isso, o setor produtivo de batata nas últimas décadas vem sofrendo algumas mudanças como o aumento do consumo e produção na Ásia, África e América Latina, visto que até os anos 90 grande parte da batata produzida no mundo era cultivada e consumida na Europa e América do Norte. O maior produtor mundial de batata é a China que produz aproximadamente 70 milhões de toneladas por ano, e produtividade de 15 toneladas por hectare. As maiores produtividades ainda são encontradas nos EUA e Canadá, com aproximadamente 40 toneladas por hectare, seguidos por países europeus e América Latina, com 17 e 16 toneladas por hectare, respectivamente, em virtude do alto nível tecnológico e qualidade dos tubérculos-semente empregados (Fao, 2008).

As épocas de plantio, tipos de solo, destino da produção em relação ao consumo (frita, cozida, assada e '*chips*'), fotoperíodo, resistência a doenças e a produtividade são algumas características consideradas importantes para a escolha de variedades para uma região (Prokop, 2008). No Brasil, as

variedades mais plantadas atualmente são: Ágata, Asterix, Monalisa, Atlantic, Caesar, Vivaldi, Elvira e Baraka (Pereira, 2003; Cib, 2008).

Novas regiões produtoras vêm surgindo e em um novo mapa produtivo, destacam-se os estados de Goiás, Bahia e regiões do Triângulo Mineiro/ Alto Paranaíba (MG), onde se constitui de grandes produtores, e estas regiões já influenciam a oferta nacional e o comportamento dos preços. Em média, os produtores goianos e baianos alcançam uma produtividade de até 40 toneladas por hectare e a proximidade desses dois estados dos centros consumidores não produtores, como o Nordeste e o Centro-Oeste brasileiros tem estimulado o aumento da produção nessas regiões. Em Minas Gerais, a fronteira da produção de batata é a região do Triângulo Mineiro, Sul de Minas e Alto do Paranaíba, e ambas apresentam as mesmas condições produtivas e mercadológicas da Bahia e de Goiás, mas apresentam médios e pequenos produtores compondo a estrutura fundiária, porém esses são bastante tecnificados (Pereira, 2003; Cib, 2008; Ibge, 2009).

A produtividade média no Brasil varia entre regiões e estados, chegando a 40 t.ha<sup>-1</sup> na Chapada Diamantina (BA), 29 t.ha<sup>-1</sup> em Minas Gerais, 25 t.ha<sup>-1</sup> em São Paulo, 23 t.ha<sup>-1</sup> no Paraná, 17 t.ha<sup>-1</sup> em Santa Catarina e 16 t.ha<sup>-1</sup> no Rio Grande do Sul (Ibge, 2009). A cultura da batata já foi considerada uma cultura de pequenos produtores, que utilizava principalmente a mão-de-obra familiar, sobretudo no sul de Minas Gerais, que atualmente é uma das maiores regiões produtoras do país. Somando-se a produção dessa região com a de outros tradicionais estados produtores, como São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, têm-se 90% da produção nacional (Cib, 2008; Ibge, 2009).

No Brasil, o clima é bastante irregular e considerado um fator de risco constante para o cultivo, apresentando diferentes regiões produtoras de batata, desde a região sul e sudeste até a região nordeste, com três épocas de produção (safra das águas, safra de inverno e safra da seca) (Camargo Filho, 2005; Cib, 2008). A principal época de cultivo de batata que ocorre nas regiões sul e sudeste do Brasil é a “das águas”, que é plantada nos meses de agosto-dezembro e colhida nos meses de novembro em diante. Já o plantio “de inverno”, realizado de abril a julho e colhido em julho-outubro, é praticado nas regiões sudeste e nordeste, em locais onde não ocorrem geadas, dependendo principalmente de irrigação durante todo o ciclo de cultivo. Já o cultivo “da seca”, que começa em janeiro-março, deve ser realizado o mais cedo possível para evitar as geadas em regiões com o inverno um pouco mais rigoroso (Pereira, 2003).

Apesar do grande potencial brasileiro em termos de área plantada, a média da produtividade das lavouras brasileiras se comparada com a de outros países produtores (países da Europa e América do Norte) ainda é muito baixa, não ultrapassando 25 toneladas de batata por hectare em média (Fao, 2008; Fao, 2008). Uma das razões da baixa produtividade aqui no Brasil é a escassez de batata-semente de boa qualidade a preços acessíveis (Aliceweb, 2009; Cib, 2008). A dependência da importação de tubérculos-semente de outros países é alta, ficando em torno de 70%, e essa importação pode facilitar a entrada de patógenos por infecções latentes, que são agentes causais das principais doenças da cultura, como podridão-mole, canela-preta e murcha bacteriana (Cib, 2008).

A baixa qualidade fitossanitária dos tubérculos-semente utilizados no plantio é um dos fatores que afetam a produtividade, uma vez que esta forma de propagação favorece a disseminação de vários patógenos para safras seguintes. Sabe-se ainda que é bastante alta a porcentagem do uso de tubérculos- consumo para o plantio, o que leva também a disseminação de patógenos, visto que não é feita a certificação nestes tubérculos. Com isso, a incidência de doenças na cultura vem aumentando no Brasil em função do uso crescente de batata-semente com qualidade fitossanitária duvidosa e/ou uso de batata-consumo para o plantio (Pereira, 2003).

## **2.2 Canela-preta, podridão da haste e podridão-mole dos tubérculos**

A canela preta, podridão aérea e a podridão-mole dos tubérculos são doenças similares causadas por diversas espécies de *Pectobacterium* e *Dickeya*. A canela-preta e a podridão-mole iniciam-se a partir de tubérculos-semente infectados durante a estação de cultivo. A podridão aérea é também amplamente disseminada, sendo mais severa sob irrigação por aspersão. Os sintomas de canela-preta e podridão-mole podem ocorrer em diversos estágios de desenvolvimento da planta de batata, onde em casos mais severos, tubérculos inteiros junto com os brotos apodrecem no solo antes da emergência da planta, resultando na redução do estande. A canela-preta pode ainda desenvolver-se após a emergência das plantas até o estágio de florescimento (Perombélm, 1992a, 2002b). Nestes casos, a base da haste de plantas doentes apresenta-se escurecidas e amolecidas pela podridão. Essa se origina do tubérculo-semente extendendo-se a alguns centímetros da haste acima do

solo. Folhas de plantas infectadas tendem a murchar ou enrolar-se nas margens, tornando-se amareladas, e depois morrem.

A podridão da haste (também chamada de podridão aérea da haste ou canela-preta aérea) é iniciada pelas mesmas bactérias, porém, de fontes externas ao tubérculo-semente. A infecção pode ocorrer, através de ferimentos ou aberturas naturais, tais como as cicatrizes foliares. Lesões em hastes doentes, primeiramente aparecem como áreas escurecidas irregulares, que depois aumentam resultando em podridão-mole em toda a haste, levando à murcha e morte da planta (Pérombelon, 1992; De Boer & Ward, 1995; Pérombelon, 2002).

Os tubérculos com podridão-mole apresentam os tecidos com aparência amolecida e encharcada, até consistência levemente granular, de coloração creme a marrom claro, e uma borda negra, separa áreas com tecido sadio do tecido doente. Em estágios avançados da doença, é bastante comum a presença de um odor desagradável, devido à ocorrência de proliferação de bactérias secundárias que invadem os tecidos já infectados. A maioria dos tecidos internos é consumida pelas bactérias restando no armazenamento ou no solo somente a casca do tubérculo (Pereira, 2003).

As bactérias do gênero *Pectobacterium* e *Dickeya* apresentam a capacidade de sobrevivência em água de rios, lagos e oceanos (Laurila *et al.*, 2008; Pitman *et al.*, 2008; Laurila *et al.*, 2009). Essas ainda são capazes de multiplicar-se e persistirem no sistema radicular de diversas plantas hospedeiras e não hospedeiras, sob a forma de infecções latentes. Elas podem ainda sobreviver por aproximadamente um ano no solo, independente se ele

contém tubérculos doentes ou restos culturais da lavoura. Geralmente, os lotes de semente podem estar contaminados em algum grau de infecção, porém, essas bactérias permanecem dormentes e não causam doença, a menos que as condições ambientais favoreçam este acontecimento.

A podridão aérea pode ser causada pelas bactérias que estão presentes no solo, ou são introduzidas pela água de irrigação, chuva com ventos fortes, ou ainda por insetos que carregam a bactéria e se alimentam das plantas (Pérombelon, 1992; De Boer & Ward, 1995; Pérombelon, 2002). Além disso, células bacterianas presentes na parte superior da planta (folhas, haste) podem se translocar na planta, e se alojar nas partes mais baixas, ou seja, na progênie dos tubérculos, nas raízes e na região do estolão.

Sendo assim, as perdas com essas doenças podem variar de 10 até 100%, sendo que no armazenamento pode haver perdas totais dos tubérculos e no campo as perdas giram em torno de 10 até 40%, em função da redução do estande e podridão da progênie dos tubérculos (Pereira, 2003). Porém, isso pode depender da incidência de infecções latentes nos tubérculos-semente, onde quanto maior a quantidade de tubérculos com infecções latentes, maior pode ser a incidência da doença no campo e no armazenamento.

### **2.2.1 *Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp. como agentes causais de doenças em batata**

*Pectobacterium* e *Dickeya* spp. são enterobactérias fitopatogênicas gram-negativas, em forma de bastonete reto, móveis por flagelos peritriquios,

não formadoras de esporos, anaeróbicas facultativas, e causam doenças em diversas espécies de plantas, em regiões tropicais e temperadas em todos os continentes (Pérombelon, 1992; Pérombelon, 2002). Pertencem a família Enterobacteriaceae, ao qual também estão presentes bactérias patogênicas a humanos e animais, tais como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. e *Yersinia* spp (Van Sluys *et al.*, 2002). Dentro desta família também estão presentes outras bactérias fitopatogênicas como *Erwinia amylovora*, *E. tracheiphila*, *E. carnegiana*, *E. mallotivora*, *E. psidii*, *E. pyrifoliae*, *E. rhapontici*, *E. persicinus*, *Enterobacter* spp., *Brenneria* spp., *Samsonia* spp. e *Pantoea* spp.

*Pectobacterium* e *Dickeya* spp. pertenciam anteriormente ao gênero *Erwinia*, como todas as bactérias fitopatogênicas, e foram estudadas por mais de 120 anos por fitopatologistas, ao qual publicaram centenas de relatos de doenças em plantas (Charkowski, 2006).

O gênero *Erwinia* foi nomeado por Winslow em 1918, em homenagem ao bacteriologista Erwin Frink Smith, o descobridor da fitobacteriologia, para incluir todas as enterobactérias fitopatogênicas (Charkowski, 2006). Entretanto, as enterobactérias fitopatogênicas formavam um grupo diverso de microrganismos, e desde o estabelecimento desse gênero, diversos novos gêneros foram sugeridos a partir de *Erwinia*. O gênero *Erwinia* foi constituído de dois subgrupos: o grupo das erwinias necrogênicas (*E. amylovora* e outras) que causam necrose em órgãos vegetativos e reprodutivos de plantas e o grupo das erwinias causadoras de podridão-mole ou pectolíticas (*E. carotovora* e *E. chrysanthemi*) (Hauben *et al.*, 1998).

As erwinias pectolíticas causam murcha, podridão de hastes e podridão mole em diversas espécies de importância agrícola e ornamental, e são distinguidas de outras enterobactérias fitopatogênicas por produzirem grandes quantidades de enzimas pectolíticas, que degradam a parede celular das plantas hospedeiras (Pérombelon, 2002; Toth *et al.*, 2003; Charkowski, 2006).

Por diversas décadas, bactérias associadas com podridão-mole foram classificadas como *E. carotovora* ou *E. chrysanthemi*, que pertenciam ao mesmo grupo das erwinias necrogênicas. Porém, ficava forte a evidência que as erwinias pectolíticas e as erwinias necrogênicas não deveriam pertencer ao mesmo gênero, em função da heterogeneidade entre elas dentro deste grande grupo (Hauben *et al.*, 1998; Gardan *et al.*, 2003). Uma classificação ao nível de subespécie de estirpes de *E. carotovora* de acordo com o hospedeiro foi sugerida: subsp. *atroseptica* (batata), *betavasculorum* (beterraba), *odorifera* (chicória) e *wasabiae* (wasabi ou raiz forte) (Gardan *et al.*, 2003). *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* agrupava todas as estirpes que eram diferentes das outras subespécies, de acordo com suas características bioquímicas e fisiológicas (Gardan *et al.*, 2003). *Erwinia chrysanthemi* subdividia-se em biovares, patovares e subespécies causando doença em uma ampla gama de hospedeiros (Charkowski, 2006).

Um novo gênero foi proposto e nomeado de *Pectobacterium* para agrupar todas as erwinias pectolíticas, porém, este só foi aceito pela comunidade científica no final dos anos 90, onde seqüências do RNA ribossomal 16S foram usadas por um grupo de pesquisadores para examinar a filogenia de algumas espécies de *Erwinia*. A partir daí, o gênero *Pectobacterium*

passou a ser utilizado ao se dirigir às erwinias pectolíticas (Hauben *et al.*, 1998). O gênero *Pectobacterium* se subdividia em quatro espécies: *P. carotovorum* (subespécies: *carotovorum*, *atrosepticum*, *betavasculatorum*, *wasabiae*, *odoriferum*); *P. chrysanthemi*; *P. cacticidum* e *P. cypripedii* (Brenner *et al.*, 1973; Hauben *et al.*, 1998). Em anos seguintes, as subespécies de *P. carotovorum* foram elevadas ao nível de espécie: *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, *P. wasabiae*, *P. betavasculatorum* e *P. odoriferum*, permanecendo somente uma subespécie *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Gardan *et al.*, 2003). Mais recentemente, *P. chrysanthemi* foi reclassificada para o gênero *Dickeya*, na qual é constituído de seis espécies: *D. dadantii*, *D. zaeae*, *D. dianthicola*, *D. chrysanthemi*, *D. paradisiaca* e *D. dieffenbachiae* (Samson *et al.*, 2005).

Dentro desse grupo complexo das bactérias pectolíticas, algumas são consideradas os principais agentes causais de podridão-mole e canela-preta na cultura da batata no mundo: *P. atrosepticum* (Pa), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), *Pectobacterium wasabiae* (Pw), *Pectobacterium betavasculatorum* (Pbet), *D. dadantii* (Dda), *D. zaeae* (Dz) e *D. dianthicola* (Ddia) (De Boer, 2003; Toth *et al.*, 2003; Charkowski, 2006).

Essas bactérias podem ocorrer endemicamente em todas as áreas onde a batata é cultivada no mundo. A distribuição geográfica envolve fatores climáticos, tais como a temperatura de desenvolvimento dessas espécies, onde Pa, Pbet e Ddia são adaptadas a temperaturas mais amenas (clima temperado a subtropical), já as outras espécies ocorrem desde regiões de clima temperado a clima tropical. O Brasil é um país bastante amplo com diferentes regiões produtoras de batata, desde a região sul e sudeste até a região nordeste, com

até três épocas de produção (safra das águas, safra de inverno e safra da seca), abrangendo regiões subtropicais a tropicais (Pereira, 2003; Camargo Filho, 2005; Cib, 2008). O aumento da temperatura global nas diferentes regiões produtoras de batata no mundo pode acentuar ainda mais a presença de diferentes perfis populacionais dessas espécies bacterianas nas lavouras (Kapsa, 2008).

Em regiões de clima temperado, *P. atrosepticum* tem sido tipicamente considerada como o principal agente causal da canela-preta em batata no campo e podridão-mole nos tubérculos em armazenamento. Entretanto, a possibilidade da ocorrência de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* causando canela-preta em condições de clima frio não deve ser descartada, visto que esta já foi encontrada no campo causando canela-preta na Holanda e na França (Haan *et al.*, 2008; Czajkowski *et al.*, 2009). *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* até o momento foi relatada somente como agente causal de podridão-mole em tubérculos.

Estudos realizados com tubérculos e hastes inoculados com *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* indicam que essa bactéria pode causar sintomas típicos de canela-preta no campo, porém, em regiões de clima temperado é considerada patógeno secundário, onde somente causa sintomas após a infecção com outras bactérias, principalmente *P. atrosepticum* e *Dickeya* spp. Relatos frequentes da detecção de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em plantas doentes sem a presença de *P. atrosepticum* e *Dickeya* spp. resultaram na hipótese de que essa bactéria pode ser considerada um dos agentes

causais primários de canela-preta, ou ainda, que essa permite a entrada desses patógenos para causarem a canela-preta. (Haan *et al.*, 2008).

*Pectobacterium wasabiae* apresenta uma gama de hospedeiros restrita, apresentando somente um hospedeiro, o *wasabi* (conhecida como *horseradish* ou raiz forte utilizada na culinária japonesa). Entretanto, uma recente caracterização de isolados patogênicos de pectobactérias em batata levou a identificação desses como isolados putativos de *P. wasabiae* na Nova Zelândia. Neste estudo, foram realizadas análises filogenéticas de sequências dos genes *acnA* e *mdh* e análises de polimorfismos por AFLP fluorescente para confirmar a identidade dos isolados putativos de *P. wasabiae*. Os autores confirmaram que *P. wasabiae* está ocorrendo naturalmente no ambiente causando doença em batata. Além disso, verificou-se que essa espécie não apresenta os mesmos mecanismos de virulência que as outras espécies de pectobactérias, envolvidos na patogenicidade em batata. Todas as estirpes de *P. wasabiae* identificada no estudo elicitaram resposta de hipersensibilidade em fumo dependente do Sistema de Secreção do Tipo III, na qual apresenta os genes associados com o SST3. No entanto, fatores de virulência putativos (*HecB* e *DspE*) não foram detectados nessas estirpes (Pitman *et al.*, 2010).

Uma nova espécie para o gênero *Pectobacterium* vem sendo proposta e denominada como *P. brasiliensis* (Duarte *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009). No Rio Grande do Sul, a coleta de plantas com sintomas de canela-preta resultou na obtenção de 408 isolados, com 55%, 42% e 1% identificados com base nas características bioquímicas e fisiológicas como *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* e *Dickeya* sp. (*E. chrysanthemi*), respectivamente. Porém, oito

isolados apresentaram características intermediárias que não corresponderam ao padrão bioquímico e fisiológico de nenhuma dessas espécies (Oliveira, 2001; Oliveira *et al.*, 2003), sendo consideradas estirpes atípicas. Anteriormente a este trabalho, autores já haviam relatado que isolados de plantas de batata com canela-preta não puderam ser identificados no Rio Grande do Sul por testes bioquímicos e sorológicos, alegando que essas estirpes brasileiras apresentavam características intermediárias entre as espécies descritas (Jabounski *et al.*, 1986).

Análises sorológicas (ELISA), testes bioquímicos e de composição de ácidos graxos confirmaram a existência dessa nova espécie, *P. brasiliensis* e que esta difere de *P. atrosepticum*. Além disso, a análise de sequências do DNA ribossomal 16S e 23S e regiões espaçadoras entre eles (IGS) e análise de restrição dessas regiões confirmaram que as estirpes brasileiras são diferentes de *P. carotovorum*, *P. atrosepticum* e de *Dickeya* sp., sendo sugerida uma nova espécie nomeada de *P. brasiliensis* (Duarte *et al.*, 2004). Além disso, um oligonucleotídeo iniciador específico para essa espécie foi desenhado baseando-se no sítio de restrição da enzima *SexA1* na região IGS, onde os autores concluíram que essa região ao qual essa enzima corta está aparentemente ausente nas outras espécies de pectobactérias (Duarte *et al.*, 2004; El Tassa Colodel, 2004). Porém, quando este oligonucleotídeo foi utilizado na PCR para identificação de um grande número de estirpes de pectobactérias em batata, algumas estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* amplificaram um fragmento do mesmo tamanho. Isto sugere que estas estirpes também podem apresentar o sítio de restrição da enzima *SexA1*

na mesma posição que *P. brasiliensis*, inviabilizando o uso desse oligonucleotídeo para discriminação dessa espécie por PCR (El Tassa & Duarte, 2004).

Caracterização genética por marcadores do tipo ERIC-, BOX-, REP-PCR e RAPD evidenciaram ainda que estirpes de *P. brasiliensis* formavam um grupo genético homogêneo e distinto das demais espécies de *Pectobacterium*, sendo que REP-PCR foi a técnica que melhor evidenciou isso. PCR-RFLP do gene *recA* utilizando as enzimas *TasI* e *HhaI* evidenciou a formação de grupos distintos, principalmente para *P. brasiliensis*, na qual as 19 estirpes foram agrupadas em três grupos diferentes (El Tassa & Duarte, 2006). Estes resultados somados confirmam a ocorrência de *P. brasiliensis* em plantas de batata sintomáticas e em tubérculos-semente assintomáticos, e a presença em menor proporção de *P. atrosepticum* nas lavouras.

A seleção de oligonucleotídeos iniciadores para serem usados em PCR, e posteriormente, comporem uma matriz de sondas para detecção de pectobactérias pode permitir a discriminação por espécie, utilizando a tecnologia de arranjos de DNA. Isso foi verificado por (Palma, 2006), ao qual selecionou alguns oligonucleotídeos iniciadores (PCR) já anteriormente descritos, que foram específicos por espécie, tais como 149IF/L1r (Fessehaie *et al.*, 2002) que amplifica o DNA de todas as *Pectobacterium* spp. e *Dickeya* sp.; Y1/Y2 que amplifica o DNA de *P. carotovorum* (Darrasse *et al.*, 1994); ADE1/ADE2 utilizado para amplificar o DNA de *Dickeya* sp. (Nassar *et al.*, 1996); ECA1F/ECA1R e Y45/Y46 (De Boer & Ward, 1995; Fréchon *et al.*, 1998)

para *P. atrosepticum*, RdgF/RdgR e PnlF/PnlR para todas as espécies de *Pectobacterium*; e HrpNF/HrpNR para *P. brasiliensis* (Dellagi *et al.*, 2000).

A partir desses resultados, dois genes foram escolhidos (*rdg* e *pnl*) para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos para *P. brasiliensis*. Os alinhamentos das seqüências de nucleotídeos dos genes *pnl* e *rdg* mostraram a existência de seqüências conservadas entre as estirpes de *P. brasiliensis*, a partir das quais foram projetados os oligonucleotídeos iniciadores Pcbr\_PnlF/Pcbr\_PnlR e Pcbr\_RdgF/Pcbr\_RdgR. Esses oligos geram produtos de amplificação de 160 e 214 pb para os genes *pnl* e *rdg*, respectivamente. A incidência de canela-preta avaliada por PCR com o uso desses oligonucleotídeos iniciadores variou de 45-50% (Ribas, 2007), confirmando a presença de *P. brasiliensis* nas lavouras do estado do Rio Grande do Sul.

Recentemente, foi verificado que *P. brasiliensis* difere filogeneticamente das outras quatro espécies de *Pectobacterium* (Ma *et al.*, 2007; Glasner *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Os genomas de *P. brasiliensis* e *P. carotovorum* foram seqüenciados e comparados com o genoma de *P. atrosepticum* e foram consideradas como linhagens divergentes dentro do gênero *Pectobacterium*. Proteínas ortólogas codificadas pelo genoma de *P. carotovorum* e *P. brasiliensis* evidenciam que estas são altamente conservadas entre si, com 95% de identidade e também apresentam alta identidade com *P. atrosepticum* (92%). Contudo, essas espécies diferem em aproximadamente 11 a 18% dos genomas, onde essa diversidade se reflete nos genes envolvidos em mecanismos regulatórios, os quais estão relacionados com a adaptação dessas bactérias em nichos ecológicos específicos. Cada uma das espécies pode

responder a diferentes estímulos, como a variação de temperatura e condições adversas estressantes (Glasner *et al.*, 2008).

Essa proposta de uma nova espécie para essa estirpe brasileira merece maior interesse pela comunidade científica em função desta ser considerada distinta geneticamente das outras espécies previamente descritas para o gênero, compartilhando 82% de seus genes com *P. atrosepticum* e 84% com *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. No entanto, ela apresenta 13% dos genes que só são encontrados no genoma dela (Glasner *et al.*, 2008).

Registros da ocorrência de *P. brasiliensis* em Israel e nos Estados Unidos já foram confirmados, e nos anos de 2006 e 2007 no sul da África foram registradas epidemias de canela-preta causadas por essa espécie. Isso mostra que ela está presente em outros países e pode apresentar uma ampla distribuição geográfica (Ma *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Van Der Merwe *et al.*, 2009).

O gênero *Dickeya*, nomeado anteriormente como *Pectobacterium chrysanthemi* (sin. *Erwinia chrysanthemi*) atualmente é composto de seis espécies, que são caracterizadas como agentes causais da podridão seca da haste, murcha e canela-preta em batata, e em diversas espécies de plantas em regiões de clima tropical e subtropical (Samson *et al.*, 2005). Atualmente, espécies de *Dickeya* têm sido consideradas patógenos de elevada importância para a cultura da batata na Europa e estão associadas com sintomas típicos de canela-preta e murcha nas lavouras, até mais do que *P. atrosepticum*.

O primeiro relato de *Dickeya* sp. na cultura da batata ocorreu em 1970, em uma lavoura na Holanda, subsequentemente diversos relatos da sua

ocorrência foram registrados na Dinamarca, Finlândia, França, Hungria, Polônia, Eslovênia, Espanha e Suíça, sendo a maioria desses surtos epidêmicos provocados por *D. dianthicola* (Saddler, 2009).

A variabilidade dentro desse gênero é bastante alta, onde as estirpes são divididas categoricamente até o momento, em seis espécies e em 7 biovars. Estirpes de biovar 3 de *D. chrysanthemi*, *D. dadantii* e *D. zea* são patógenos de batata em regiões de clima quente, e estirpes de *D. dianthicola* (biovars 1 e 7) são mais adaptadas ao clima temperado e aparecem disseminadas por toda a Europa. Recentes relatos encontraram essas bactérias no solo e nos rios, mostrando que o solo e a água para irrigação podem ser potentes agentes para disseminação do patógeno nas lavouras (Palacio-Bielsa *et al.*, 2006; Palacio-Bielsa *et al.*, 2007; Laurila *et al.*, 2008; Laurila *et al.*, 2009).

A incidência de canela-preta na cultura da batata tem flutuado ano a ano, porém, nos últimos cinco anos tem aumentado consideravelmente com a ocorrência de *Dickeya* sp., ao invés de *P. atrosepticum*. Isso tem provocado um aumento das perdas na cultura em diversos países do norte da Europa, onde a espécie que tem causado problemas nas lavouras foi considerada como *D. dianthicola* (Laurila *et al.*, 2008; Czajkowski *et al.*, 2009; Slawiak *et al.*, 2009; Tsor *et al.*, 2009; Laurila *et al.*, 2010).

Com o aumento das temperaturas globais, tem sido verificada a presença de estirpes atípicas de *D. dianthicola* adaptadas a temperaturas mais elevadas (Slawiak *et al.*, 2009), nomeadas mais recentemente como *D. solani* (Saddler, 2009; Toth *et al.*, 2009;). Em 2005 e 2006, na Holanda, essa estirpes foram reconhecidas e identificadas provisoriamente como *D. solani* (Saddler,

2009). Pesquisas recentes têm mostrado que *D. solani* é bem mais virulenta para batata do que as outras espécies de *Dickeya* (Sadler, 2009; Toth *et al.*, 2009,).

Essas estirpes foram relatadas em Israel, Polônia, Finlândia, França, Espanha e Holanda, em anos que ocorreram temperaturas mais elevadas, causando surtos epidêmicos de canela-preta e murcha. Essas estirpes apresentam crescimento em temperatura mais elevada ( $\geq 27$  °C) do que *D. dianthicola*, dando indícios de que essas bactérias podem estar se adaptando a temperaturas mais elevadas (Toth & Elphinstone, 2008; Sadler, 2009; Toth *et al.*, 2009).

Perdas em Israel chegaram a 40% da produção total de batata no país e foram decorrentes de epidemias provocadas por *Dickeya* sp., na qual foram identificadas primeiramente como estirpes atípicas de *D. dianthicola*, que atualmente são consideradas pertencentes a espécie *D. solani* (Sadler, 2009).

Como foi dito anteriormente, várias espécies desse grupo das enterobactérias pectolíticas podem estar associadas a essas doenças, dependendo basicamente do clima da região (temperatura), além de outros fatores, como a disseminação de novas espécies para locais onde elas não ocorrem. No Brasil, relatos de *Dickeya* spp. na cultura da batata ainda são bastante escassos, e estudos epidemiológicos de *P. brasiliensis*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, *P. betavasculorum* e *P. wasabiae* em batata são imperceptíveis.

### **2.3 *Ralstonia solanacearum*: uma espécie complexa e a Murcha bacteriana**

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.* 1995, está distribuída na maioria das regiões de clima tropical, subtropical e temperado. É considerada atualmente, a doença mais importante para a cultura da batata e uma das mais importantes para as outras espécies de solanáceas (tomate, berinjela, pimentão). A *R. solanacearum* é considerada uma espécie capaz de infectar mais de 200 espécies, as quais representam mais de 50 famílias botânicas, porém, ela apresenta diferentes variedades patogênicas (raças) dentro das espécies hospedeiras, o que acaba limitando a gama de hospedeiros em função dessas raças causarem doenças em determinados hospedeiros (Fegan & Prior, 2005).

Atualmente, vem sendo denominada como um 'espécie complexa', em função da diversidade encontrada dentro dessa espécie. É classificada hierarquicamente em cinco raças de acordo com a gama de hospedeiro, seis biovars de acordo com a utilização de fontes de carbono, quatro filotipos baseados nas análises filogenéticas de sequências da região ITS, gene *hrpB* e gene *egl*, 23 sequevars baseados em seqüenciamento do gene *egl* e análises filogenéticas deste, e linhagens clonais baseadas em métodos de *fingerprinting* do genoma através de rep-PCR, RAPD, AFLP e PFGE (Fegan & Prior, 2005) como mostrado na Tabela 1, e mais recentemente por pulsotipos (clones), na qual analisa perfis das estirpes baseando-se em análises de eletroforese de

campo pulsado (*PFGE-pulsed field gel electrophoresis*) descrito por Stevens & Van Elsas (2010).

TABELA 1. Esquema de classificação de *Ralstonia solanacearum* (Fegan & Prior, 2005). Porto Alegre, RS, 2009.

Nível Taxonômico	Equivalência taxonômica	Nomenclatura	Método de identificação
Espécie	Espécie	<i>R.</i> <i>solanacearum</i>	PCR
Filotipo	Subespécie	Filotipos I, II, III e IV	PCR multiplex (região ITS)
Sequevar	Grupos infrasubspecíficos	Sequevares 1- 23	Sequenciamento e análises do gene <i>egl</i> (endoglucanase) <i>Fingerprinting</i> do genoma (rep-PCR, RAPD, AFLP, PFGE (pulsotipo), etc)
Clone	Linhagens clonais		

Dois grupos de estirpes são capazes de infectar lavouras de batata, um deles pertence à raça 1, biovar 1 e o outro grupo pertence à raça 3, biovar 2. Estirpes da raça 1 biovar 1 possuem um grande número de espécies hospedeiras e maior capacidade de persistir no solo, predominando em regiões de clima quente. As estirpes da raça 3 biovar 2 infectam basicamente cultivos de batata em regiões de clima temperado e apresentam maior capacidade de produzir infecções latentes (Silveira *et al.*, 2002).

Evidências filogenéticas recentes indicaram que as estirpes causadoras de murcha em batata estão agrupadas dentro do filotipo IIB sequevar 1 (IIB1), ao qual são pertencentes ao grupo das estirpes do biovar 2 dos Andes, historicamente conhecidas como raça 3, biovar 2. Essas estirpes são bastante

virulentas a batata e tomate, e adaptadas a temperaturas mais amenas que ocorrem em regiões montanhosas (Horita & Tsuchiya, 2001; Ilagan *et al.*, 2003; Hayward & Fegan, 2004; Ivey *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2008). Estirpes agrupadas dentro de três dos quatro filotipos de *R. solanacearum* podem causar a murcha em plantas de batata, porém, as estirpes IIB1 são consideradas patógenos de risco em função de causarem infecções latentes (assintomáticas) em tubérculos-semente.

Na legislação da União Européia (Eppo) e Norte Americana (Nappo), *R. solanacearum* é listada como um dos principais organismos quarentenários, passando por processos de erradicação e controle. Além disso, essas estirpes foram colocadas na lista de agentes potenciais para bioterrorismo nos Estados Unidos (Eppo, 2009; Nappo, 2009; Champosiseau *et al.*, 2009; Guidot *et al.*, 2009). Em função do impacto econômico da murcha bacteriana e sua potencial característica de disseminação sob a forma de infecção latente desta bactéria, é altamente desejável o desenvolvimento de métodos sensíveis de detecção das estirpes de *R. solanacearum*, considerando a alta diversidade fenotípica e genotípica das estirpes.

A murcha bacteriana constitui hoje uma das maiores limitações ao cultivo da batata e outras culturas em regiões de clima tropical, subtropical e clima temperado em todo o mundo. A significância dessa doença no Brasil e no mundo pode ser percebida pelo rigor da legislação vigente para certificação de tubérculo-semente, onde em campos de produção de batata-semente certificada, registrada e básica, a presença de pelo menos uma planta com sintomas de murcha em toda lavoura já é suficiente para a condenação do lote

inteiro produzido nessa área (Swanson *et al.*, 2007). Essa medida é justificável, devido à possibilidade da bactéria sobreviver no solo em média até 10 anos, permanecer viável também em águas de rios e lagos e em tubérculos produzidos por plantas que não apresentam sintomas da doença (Steven & Van Elsas, 2010).

A murcha bacteriana caracteriza-se principalmente pelo sintoma de perda da turgescência dos tecidos foliares e das partes mais suculentas dos ramos, iniciando pelas folhas mais jovens e evoluindo para toda a planta. Plantas infectadas produzem tubérculos com descoloração vascular e exsudação de pus bacteriano. Esses sintomas são incitados pela bactéria que invade a planta pelas raízes e coloniza sistemicamente os tecidos da parte aérea, o que resulta em obstrução dos vasos do xilema, que ficam preenchidos pela bactéria e por gomas e tiloses formadas pelo hospedeiro em resposta à colonização dos tecidos (Champosiseau *et al.*, 2009).

### **2.3.1 Variabilidade de *Ralstonia solanacearum* e implicações na identificação e detecção das estirpes no campo**

A bactéria *R. solanacearum* vem sendo classificada em raças com base na espécie hospedeira e em biovars de acordo com a capacidade de metabolizar açúcares (celobiose, lactose e maltose) e álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol) (Hayward & Fegan, 2004).

O conhecimento da estrutura genética populacional de *R. solanacearum* é fundamental para estudos epidemiológicos e o controle efetivo da doença, principalmente para o desenvolvimento de genótipos resistentes (Van Der Wolf

*et al.*, 2004). A ampla diversidade genética dessas bactérias encontradas no solo e a diferenciação genética destas populações podem chegar ao nível microgeográfico, dependendo do tipo de solo e da rizosfera do hospedeiro (Silveira *et al.*, 2002). Técnicas moleculares têm permitido estudos evolutivos de *R. solanacearum* e de variabilidade genética em nível intra-específico (Silveira *et al.*, 2002). A análise de DNA utilizando marcadores moleculares como o RFLP, AFLP, RAPD e rep-PCR são utilizadas amplamente na caracterização da variabilidade de *R. solanacearum* (Seal *et al.*, 1999).

Análises baseadas em RFLP de genes de virulência e hipersensibilidade têm separado *R. solanacearum* em duas divisões importantes por origem geográfica, uma originária da Ásia e outra da América, sugerindo uma distante dicotomia evolutiva. A divisão I apresenta as estirpes da raça 1, relacionadas às biovars 3, 4 e 5, e a divisão II apresenta as estirpes das raças 1 e 2 relacionadas às biovars 1, e da raça 3 relacionada à biovar 2. Além disso, foi sugerido de que as estirpes pertencentes aos biovars 1 e 2 formam um grupo homogêneo (Fegan & Prior, 2005).

Posteriormente, estudos confirmaram essas duas divisões e incluíram as estirpes da biovar 2T (N2) relacionadas à raça 1 (Gillings *et al.*, 1993). Um terceiro grupo de estirpes originárias da África também foi identificado (Poussier *et al.*, 1999), sendo que a característica mais fortemente correlacionada aos grupos RFLP foi a origem geográfica das estirpes, onde as estirpes da divisão I são originárias da Ásia e Austrália e as da divisão II originárias das Américas (Gillings *et al.*, 1993).

A entrada de tubérculos de batata com infecções latentes em regiões livres do patógeno (Gillings *et al.*, 1993) tem permitido a disseminação dessa biovar. As estirpes da biovar 2 são pertencentes a dois grupos de de RFLP bastante homogêneos e próximos, com origem na região dos Andes, mais precisamente na região ocidental desta (Silveira *et al.*, 2002). No entanto, a biovar 2T é composta por grupos de RFLP heterogêneos, com origem na região Amazônica. Esta biovar está relacionada a regiões de clima tropical de baixa altitude. No Brasil, além da região Amazônica, ela é encontrada no Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo, porém, em outros países esta biovar não foi encontrada (Figueiró, 2008).

No entanto, as estirpes da raça 1 não apresentam relação filogenética ou evolutiva (Gillings *et al.*, 1993) e sobrepõem a classificação de divisão e biovar. No Brasil, as estirpes da biovar 1, raça 1 apresentam grande variabilidade genética e predominam na região Central, mas são encontradas desde o Rio Grande do Sul até o Amazonas (Figueiró, 2008).

Análise de seqüências do rRNA 16S, dos genes *mutS*, *hrpB* e *egl* e regiões ITS levaram a uma nova classificação de *R. solanacearum*, dividindo-a em quatro filotipos, ou grupos genéticos, que foram subdivididos em pequenos grupos denominados sequevar (Fegan & Prior, 2005). Cada filotipo reflete a origem geográfica da estirpe, onde os filotipos I e II apresentam estirpes da Ásia e América, respectivamente, enquanto que os membros da África pertencem ao filotipo III; já o filotipo IV agrupa isolados de *Ralstonia syzygii* e BDB (*Blood Disease Bacterium*), da Indonésia, Japão e Austrália (Fegan & Prior, 2005).

Outro estudo de diversidade seguindo essa linha de filotipagem e sequevar foi realizado nos Estados Unidos para avaliar estirpes que estavam entrando no país, através de outros hospedeiros (Norman *et al.*, 2009). Os autores verificaram que novas estirpes da biovar 1 estavam entrando no país e infectando ornamentais. Essas estirpes introduzidas são geneticamente distintas das estirpes geralmente encontradas infectando a produção de hortaliças, e apresentam uma ampla gama de hospedeiros podendo infectar não somente tomate, fumo e batata, mas também antúrio, a espécie ornamental jibóia (*pothos*) e banana. De acordo com os autores, a entrada de novas estirpes através de hospedeiros desconhecidos pode ser um risco para grandes culturas. Essas estirpes são pouco caracterizadas ou ainda nem descritas, a gama de hospedeiros ao qual são capazes de infectar é desconhecida (Norman *et al.*, 2009).

Estes estudos mostraram que as populações bacterianas podem sofrer diferentes processos seletivos, dando origem a diversos padrões de diversidade genética. Além disso, a distância geográfica também pode ser responsável por influenciar a variação e a estrutura genética da população devido a diminuição do fluxo gênico, induzindo a divergência (Liu *et al.*, 2009; Norman *et al.*, 2009; Toukam *et al.*, 2009).

Desta forma, a variabilidade genética de *R. solanacearum* gera problemas no manejo da doença, em função das dificuldades na obtenção de linhagens de plantas resistentes e no diagnóstico dessas estirpes no campo.

## 2.4 Métodos de detecção e identificação de pectobactérias e *Ralstonia solanacearum* baseados em PCR

Diversos autores já descreveram métodos para detecção de *R. solanacearum* e pectobactérias em tubérculos e plantas de batata e dentre essas técnicas, boa parte delas são sorológicas (ELISA, imunofluorescência). No entanto, técnicas sorológicas podem gerar reações cruzadas com bactérias saprófitas presentes em tecidos das plantas ou no solo, o que pode levar a resultados falsos-positivo. As metodologias de detecção tem se beneficiado com o advento de tecnologias moleculares mais modernas. Técnicas moleculares baseadas em PCR são consideradas mais promissoras (Ozakman & Schaad, 2003).

Os ensaios baseados em PCR para detecção de pectobactérias e *R. solanacearum* podem ser divididos em duas categorias, aqueles usados para determinar se uma amostra de planta está infectada com uma dessas espécies e aqueles usados para caracterização de isolados ou estirpes de uma determinada espécie (Charkowski, 2006). A maioria desses ensaios foi desenvolvida antes do uso da técnica de qPCR (PCR em tempo real) ser amplamente difundida, sendo bem provável que essa ferramenta substitua os ensaios convencionais descritos até os dias de hoje (Schaad & Frederick, 2002).

Além disso, diversos genomas, tais como *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, *P. brasiliensis*, *Dickeya dadantii*, *D. chrysanthemi*, *R. solanacearum* já estão disponíveis no banco de dados (Perna *et al.*, 2007; Inra *et al.*, 2003). Sequências do genoma presentes nesses bancos podem ser

baixadas e utilizadas no desenho de oligonucleotídeos iniciadores para PCR e qPCR.

Para muitas bactérias fitopatogênicas, os genes do RNAr 16S e 23S são bastante utilizados como cronômetros moleculares para inferir a filogenia microbiana e apresentam um impacto importante nas considerações taxonômicas. Além disso, os genes do RNAr tem sido usados como alvos para detecção com alta sensibilidade para discriminação entre espécies ou gêneros. Por outro lado, polimorfismos de seqüência nas regiões espaçadoras do RNAr 16S-23S (IGS) podem ser usadas para diferenciar bactérias intimamente relacionadas. Muitas bactérias apresentam múltiplas regiões IGS, diferenciadas com base no tamanho e polimorfismos nos sítios de restrição, refletindo 1 a 11 alelos de *loci* gênicos do RNAr, descritos para eubactérias. Polimorfismos nas regiões IGS têm sido usados para identificar e diferenciar várias enterobactérias, dentre elas as pectobactérias (Fessehaie *et al.*, 2002; Fessehaie *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2004) e *Ralstonia solanacearum* (Boudazin *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2007; Kubota *et al.*, 2008; Guidot *et al.*, 2009).

Uma desvantagem do uso de genes que codificam um produto específico para a projeção de oligonucleotídeos iniciadores é que normalmente estão presentes na forma de cópia simples na célula, o que pode acarretar numa diminuição considerável da sensibilidade se comparada com genes que possuem múltiplas cópias, tais como DNAr 16S (Patrik & Maiss, 2000; Patrik *et al.*, 2002). Embora, a presença de múltiplas cópias de DNAr 16S em células bacterianas aumentarem a sensibilidade, os oligonucleotídeos iniciadores projetados a partir destas seqüências não têm sido muito específicos (Seal *et*

*al.*, 1999; Weller *et al.*, 2000). O uso de genes *housekeeping* (associados ao metabolismo basal da bactéria), ou associados à virulência e patogenicidade vêm sendo utilizados na detecção e caracterização molecular de fitobactérias, principalmente pectobactérias e *R. solanacearum* (El Tassa & Duarte, 2006; Ma *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Norman *et al.*, 2009; Toukam *et al.*, 2009; Wicker *et al.*, 2009; Pitman *et al.*, 2010).

PCR em tempo real é o método mais utilizado atualmente na detecção de fitopatógenos por permitir quantificar produtos de amplificação a cada ciclo de PCR (Schaad & Frederick, 2002; De Boer *et al.*, 2007).

Esse método apresenta diversas vantagens sobre a PCR convencional, tais como a ausência da eletroforese em gel de agarose para detectar o produto da reação, uma vez que a leitura e mensuração do acúmulo de produtos são obtidos a cada ciclo, usando um dos dois sistemas: uma molécula química intercalante de DNA de fita dupla (SYBR-Green I ou outros fluoróforos); ou um sistema que utilize sonda de oligonucleotídeos marcada com fluoróforos nas extremidades 3' e 5' (sistema TaqMan<sup>®</sup>, sondas FRET<sup>®</sup>, Molecular Beacons<sup>®</sup> e oligonucleotídeos Scorpions<sup>®</sup>) (Schaad & Frederick, 2002). Com isso pode-se quantificar o número de células de um patógeno que estão presentes em determinadas amostras.

SYBR-Green é um fluoróforo que se liga ao DNA de dupla-fita, por incorporação nos produtos de amplificação a cada ciclo de PCR, e a intensidade da emissão de fluorescência é aumentada (Figura 1). A mensuração da fluorescência durante a amplificação por PCR se dá em função da quantidade de produtos de amplificação presentes na mistura de reação (De

Boer *et al.*, 2007) como mostrado esquematicamente pela Figura 1. A vantagem desta molécula em relação aos outros métodos de PCR em tempo real é que nenhuma sonda adicional é requerida. Entretanto, análise pós-amplificação é necessária para identificar o produto de amplificação, que se dá através da análise da curva de dissociação (Figura 1). O método detecta todos os produtos que são amplificados, inclusive fragmentos de DNA inespecíficos e estruturas formadas a partir da complementariedade entre os oligonucleotídeos (formação de dímeros e estruturas secundárias). A análise da curva de dissociação, passo posterior a amplificação é realizado no próprio equipamento para confirmar a amplificação específica, através da temperatura de dissociação do produto de amplificação, que produz um único pico na curva de dissociação (Schaad & Frederick, 2002).

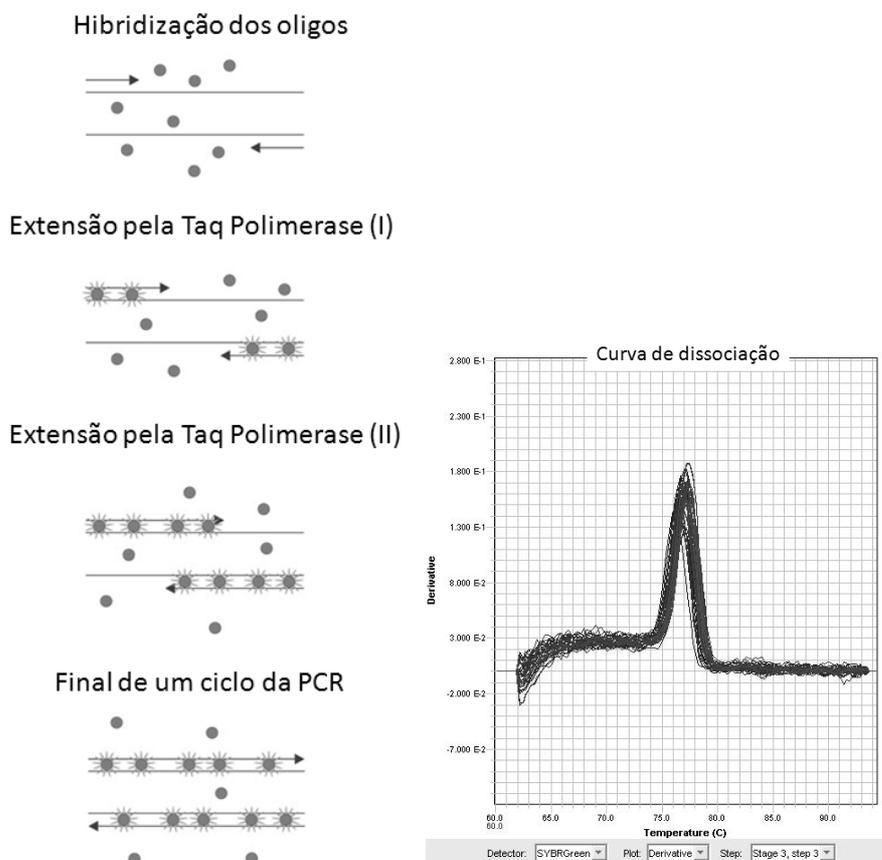


FIGURA 1. Representação esquemática de qPCR pelo método de detecção com fluoróforo intercalante de DNA fita-dupla (qPCR SYBR Green). Porto Alegre, RS, 2009.

Sistemas que utilizam oligonucleotídeos marcados com fluoróforos ou sondas de oligonucleotídeos também marcada com fluoróforos nas duas extremidades 5' e 3' são mais específicos do que o sistema utilizando o intercalante de DNA de fita-dupla, visto que estes somente hibridizam-se a regiões específicas do DNA, gerando a fluorescência somente quando essas sondas são degradadas (Schaad & Frederick, 2002; De Boer *et al.*, 2007).

O sistema utilizando sondas de hidrólise (ex. TaqMan ou nuclease 5') é o mais utilizado atualmente. Esse sistema requer dois oligonucleotídeos iniciadores que amplificam um fragmento de DNA de 50-300 pb, e uma sonda

marcada com fluoróforos que é desenhada para hibridizar em uma região específica dentro do produto de amplificação (Orlando *et al.*, 1998; Director-Myska *et al.*, 2001; Dyer *et al.*, 2001; Ibekwe *et al.*, 2002; Papin *et al.*, 2004) como ilustrado na Figura 2.

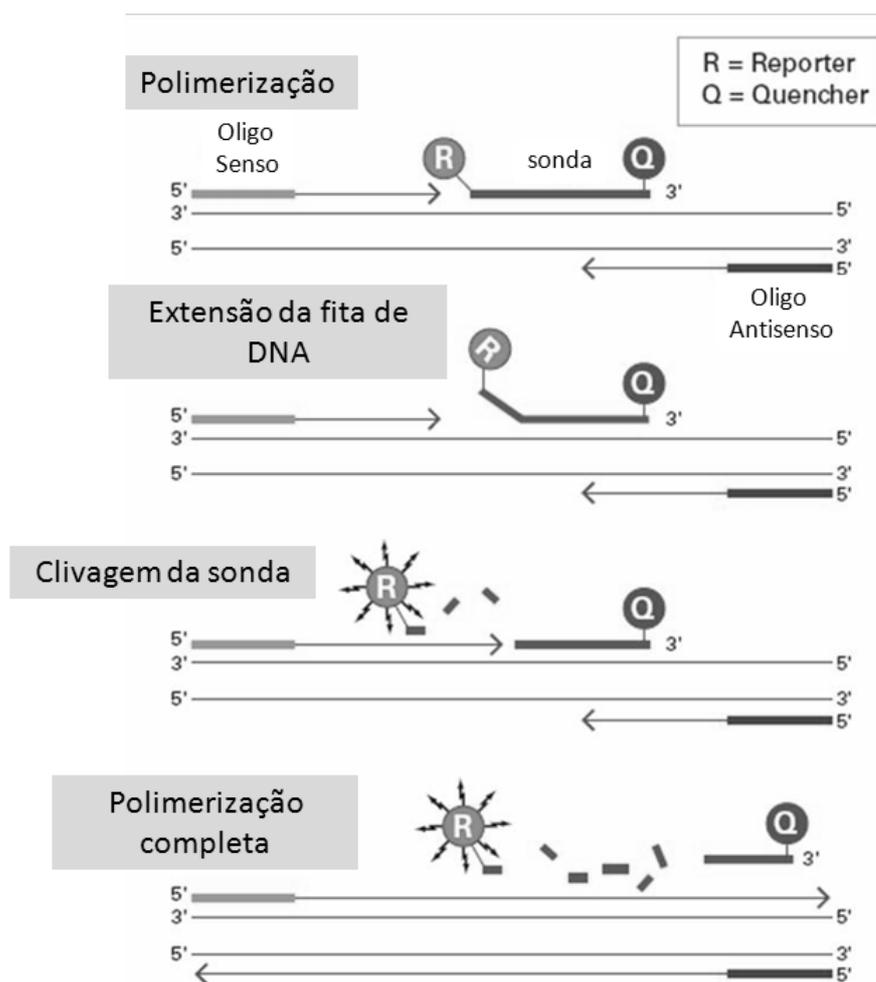


FIGURA 2. Representação esquemática da qPCR pelo sistema de detecção com sonda de hidrólise (qPCR TaqMan®). Porto Alegre, RS, 2009.

A sonda é marcada com um fluoróforo *repórter* e uma molécula denominada de *quencher*, na região 5' e 3', respectivamente (Figura 2). Quando

o fluoróforo *repórter* se encontra próximo do *quencher*, nenhum sinal de fluorescência escapa da molécula *repórter*, e a molécula *quencher* absorve a fluorescência emitida pelo *repórter*. Isso ocorre quando a sonda está livre na mistura de reação, ou ela está recém-hibridizada a seqüência de DNA-alvo. Subsequentemente, durante a amplificação a atividade de nuclease 5' da *Taq* polimerase degrada a sonda, separando os fluoróforos, o que permite a leitura do sinal de fluorescência do fluoróforo *repórter*. Ciclos repetidos da PCR resultam em amplificação exponencial do produto amplificado e o acúmulo de sondas degradadas, que conseqüentemente, aumenta a intensidade da fluorescência. (Schaad & Frederick, 2002; De Boer *et al.*, 2007).

A mensuração da fluorescência a cada ciclo apresenta-se como uma forma para analisar a cinética da reação (eficiência da reação) e quantificar o acúmulo de produtos (Applied Biosystems, 2008). Esta eficiência aumentada está associada com maior especificidade das sondas com o produto ou somente dos oligonucleotídeos iniciadores a seqüência-alvo, durante cada ciclo de PCR (Applied Biosystems, 2008; Bustin *et al.*, 2009).

A mensuração da fluorescência a cada ciclo elimina a necessidade de processamento após a PCR para revelar a presença do produto desejado, onde as leituras de fluorescência podem ser usadas simplesmente para determinar a presença ou ausência do DNA amplificado, corroborando com a presença ou ausência da bactéria-alvo nas amostras (De Boer *et al.*, 2007).

O número de ciclos requerido para atingir um limiar pré-determinado (ciclo *threshold*,  $C_T$  ou ciclo de quantificação,  $C_q$ ) é correlacionado com a concentração de DNA originalmente presente na amostra (Applied Biosystems,

2008). Para isso, a construção de uma curva-padrão com preparações de DNA padrão com concentrações conhecidas (DNA clonado em um vetor e quantificado) é necessária, onde se extrapolam os ciclos  $C_T$  das amostras com os padrões e estima-se o quanto de bactéria se tem na amostra, por número de células bacterianas (Schaad & Frederick, 2002; De Boer *et al.*, 2007).

O método de qPCR como todo método considerado como padrão-ouro para diagnóstico necessita de que alguns quesitos sejam seguidos e testados, tais como: i) sensibilidade analítica: que corresponde ao número mínimo de cópias em uma amostra que podem ser medidas com acurácia dentro de um ensaio; ii) sensibilidade clínica: que é o percentual de indivíduos com uma dada desordem ao qual o ensaio identifica como positivo; iii) LOD (limite de detecção): que é a concentração que pode ser detectada com confiança (95% probabilidade, é o comumente usado) com um dado procedimento analítico; iv) especificidade analítica: refere-se ao qPCR detectando a sequência-alvo correta ao invés de alvos inespecíficos presentes em uma amostra; v) especificidade diagnóstica é a porcentagem de indivíduos que em uma determinada condição do ensaio podem ser identificados como negativos para essa condição; vi) acurácia: refere-se à diferenças entre amostras medidas experimentalmente e concentrações verdadeiras, apresentadas como estimativas do número de cópias; vii) repetibilidade (precisão a curto prazo ou variância intra-ensaio): refere-se à precisão e robustez do ensaio com as mesmas amostras analisadas repetidamente, e viii) reprodutibilidade (precisão a longo prazo ou variância interensaio): que refere-se a variação em resultados entre cada reação ou entre laboratórios diferentes e é tipicamente expressa

como desvio-padrão ou coeficiente de variação do número de cópias ou concentrações (Bustin *et al.*, 2009).

As vantagens desse método em geral são: possibilidade de detecção quantitativa dos patógenos, potencial para o uso em um número elevado de amostras e a ausência da necessidade de análise pós-PCR, além da rapidez na obtenção dos dados ( $\leq 1$  a 2 horas) (Schaad & Frederick, 2002; De Boer *et al.*, 2007).

O uso de qPCR em diagnóstico de doenças de plantas pode auxiliar na detecção de patógenos presentes em populações reduzidas em infecções latentes e na detecção de carga viral.

## **2.5 Tecnologia para extração e purificação de ácidos nucleicos de fitopatógenos para o diagnóstico molecular de doenças de plantas**

Para um diagnóstico molecular eficiente e rápido de doenças em plantas é necessário métodos de extração de ácidos nucleicos eficientes, rápidos, que eliminem por completo as substâncias inibidoras da PCR (tais como, proteínas, polifenóis e ácidos polissacarídicos). A coleta de amostras e a purificação são os primeiros passos, e mais importantes para uma análise genética e diagnóstica. Ácidos nucleicos (DNA ou RNA) com impurezas e de baixa qualidade podem comprometer as aplicações posteriores facilmente, onde amostras e fontes valiosas podem ser perdidas. A manutenção da integridade das amostras antes de qualquer análise também é de extrema importância (Roe *et al.*, 1996; Wolf, 2007).

Métodos mais simples e rudimentares, como a lise por aquecimento (fervura) pode ser uma estratégia bastante utilizada em laboratórios de pesquisa, financeiramente compensadora, uma vez que necessita somente da colônia crescida em meio de cultura ou o próprio material de planta infectado. Se uma alta concentração de DNA ou um DNA purificado é exigido nas análises, pode-se proceder a purificação deste a partir do sobrenadante com etanol e sais. Dessa forma, o DNA purificado será resuspendido em água ou tampão TE (Charkowski, 2006). Apesar da facilidade e rapidez da extração de DNA por fervura, esse método apresenta algumas desvantagens quando as amostras são de campo, uma vez que as plantas apresentam diversas substâncias inibidoras da PCR, que não são eliminadas com as poucas etapas e reagentes empregados no protocolo, além da possibilidade de ocorrer lise parcial no material (Thomson & Henry, 1995; Roe *et al.*, 1996; Wolf, 2007) .

Em amostras de plantas são necessários reagentes mais tóxicos e perigosos para uma extração de DNA ou RNA eficiente, tais como fenol e clorofórmio, além do mais os protocolos convencionais de extração são bastante longos, com várias etapas que levam até 24 h para se obter o DNA purificado para utilização em análises genéticas (Rogers & Bendich, 1985; Wang *et al.*, 2003; Fulton *et al.*, 1995). Para uso em diagnóstico de rotina de alto desempenho, têm aumentado a disponibilidade de alternativas com reagentes menos tóxicos, podendo ser automatizadas, tais como imunocaptura-PCR (IC-PCR); resina Chelex, colunas de extração e purificação de DNA a base de sílica; digestão enzimática de proteínas usando proteinase K e matrizes de proteção e purificação de ácidos nucleicos (De Boer *et al.*, 2007).

Dentre os kits disponíveis no mercado, alguns são específicos para a utilização com materiais vegetais e microrganismos, tais como as colunas de purificação e matrizes de proteção e purificação. Porém, os kits com colunas são bastante caros e vem em número reduzido para poucas amostras, já as matrizes de purificação e proteção apresentam-se na forma de cartões e ainda são bastante utilizadas em pesquisa com humanos e animais, na qual podem ser armazenadas várias amostras para posterior purificação do DNA. Existe uma ampla gama deste tipo de cartão disponível, incluindo *IsoCode Card* (distribuído por Schleicher and Schuell, Diagnostik, Alemanha) e cartões FTA (Whatman, Kent, UK) (Mas *et al.*, 2007). A tecnologia que utiliza cartões para purificação do DNA e RNA de humanos, animais, plantas, microrganismos e demais organismos foi desenvolvida pela Flinders Technology Associates (Whatman, 2002).

Os cartões FTA (Flinders Technology Associates) é um método desenvolvido para rápida coleta, purificação e análise do material genético de uma ampla gama de materiais biológicos, tais como sangue, saliva, fluido amniótico, homogeneizado de tecidos de plantas, cultura de células, células bucais, bactérias transformadas, plasmídeos purificados, estoques de glicerol, bactérias, leveduras, vírus e outros microrganismos, sêmen, urina, tecidos, amostras de carne, fígado, tumores, medula óssea, tecidos de plantas não homogeneizados, raízes de cabelo, e tecidos da cauda de camundongo (Lampel *et al.*, 2000; Whatman, 2003; Lampel *et al.*, 2004; Ndunguru *et al.*, 2005; Gonzales *et al.*, 2006; Purvis *et al.*, 2006; Rajendram *et al.*, 2006; Muthukrishnan *et al.*, 2008; Nechvatal *et al.*, 2008).

Os cartões FTA foram desenvolvidos para fixar e armazenar os ácidos nucléicos diretamente dos tecidos frescos pressionados ou homogeneizados em tampão e transferidos para o papel. A matriz de papel é impregnada com uma mistura de reagentes, contendo desde tampões fortes, agentes desnaturantes de proteínas e quelantes de radicais livres. Esses reagentes lisam as membranas celulares em contato com o papel, envolvem o DNA fisicamente, estabilizam e protegem o DNA de nucleases, oxidação e danos causados pela luz UV, e degradação fúngica e microbiana (Smith & Burgoyne, 2004; Kubo & Fujita, 2006). Esta tecnologia tem aumentado a sensibilidade de detecção comparada a métodos de extração convencionais do DNA, além de propiciar a coleta de um grande número de amostras (Lampel *et al.*, 2000; Rajendram *et al.*, 2006).

As amostras podem ser guardadas por mais de um ano a temperatura ambiente, para depois purificá-las no momento desejado, além da rapidez no processo de purificação que dura em média de 20 a 30 min por amostra. A utilização dos cartões FTA para detecção de fitobactérias em batata (plantas e tubérculos) foi utilizada primeiramente por Ribas (2007) e Figueiró (2008). Além disso, a presença de *Pseudomonas* sp. em gemas florais de pereira também foi detectada por PCR, onde os cartões FTA foram utilizados para a coleta e extração do DNA total (Rommel, 2009) para a detecção dessas bactérias fitopatogênicas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Estirpes bacterianas de referência e condições de crescimento

As estirpes de referência utilizadas neste estudo estão listadas na TABELA 2. As estirpes de *Pectobacterium* e *Dickeya* spp. foram cultivadas rotineiramente em meio CPG (casamino ácida, peptona, D-glicose e ágar) e NA (Ágar nutritivo: peptona, extrato de carne, extrato de levedura, cloreto de sódio e Agar) e as estirpes de *R. solanacearum* foram cultivadas em SPA (sacarose, peptona, fosfato de potássio dibásico, sulfato de magnésio e ágar) e TTC (Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio, casamino ácida, peptona, D-glicose e ágar) (Schaad, 2001). A preservação das estirpes foi realizada em ampolas de criopreservação em glicerol 40%.

As estirpes bacterianas foram previamente cultivadas sob agitação (150 rpm) em caldo LB (Luria-Bertani: triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio) por 24 h a 28 °C até atingir uma D.O.<sub>600nm</sub>=0,3.

A cultura bacteriana (0,5 mL) foi misturada com 0,5 mL de glicerol 80% em ampolas de criopreservação identificadas, que logo foram depositadas em freezer a -20 °C. Para a extração de DNA ou recuperação das estirpes preservadas a -20 °C, as estirpes foram cultivadas em caldo LB por 24 h a 28 °C sob agitação para a coleta da cultura na fase *log* de crescimento (D.O.<sub>600nm</sub>=0,3).

TABELA 2. Estirpes bacterianas utilizadas no estudo como referência (controles) em PCR e qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.

Estirpes	Hospedeiro	Origem	Fonte
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>			
Pa 31	Batata	Canadá	De Boer, S. H. <sup>1</sup>
Pa 790 <sup>T</sup>	Batata	Reino Unido	Instituto Biológico <sup>2</sup>
<i>Pectobacterium carotovorum</i>			
IBSBF 1442	Cravo	Brasil	Instituto Biológico <sup>2</sup>
IBSBF 791	Batata	Dinamarca	Instituto Biológico <sup>2</sup>
47	Mandioquinha -salsa	Brasil	Henz, G. P. <sup>3</sup>
<i>Pectobacterium brasiliensis</i>			
IBSBF 1692 (212)	Batata	RS, Brasil	Duarte, V. <sup>4</sup>
IBSBF 1697 (213)	Batata		
<i>Pectobacterium betavasculorum</i>			
IBSBF 787 <sup>T</sup>	Beterraba	EUA	Instituto Biológico <sup>2</sup>

continuação TABELA 2. Estirpes bacterianas utilizadas no estudo como referencia (controles) em PCR e qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.

<i>Dickeya chrysanthemi</i> bv.			
<i>chrysanthemi</i>			
IBSBF 231 <sup>T</sup>	Crisântemo	EUA	Instituto Biológico <sup>2</sup>
IBSBF 920	Batata	Brasil	Instituto Biológico <sup>2</sup>
<i>Dickeya dianthicola</i>			
IBSBF 856	Batata	França	Instituto Biológico <sup>2</sup>
<i>Dickeya</i> sp.			
CEN80	Cenoura	MG, Brasil	Henz, G. P. <sup>3</sup>
<i>Ralstonia solanacearum</i>			
Biovar 1			
1	Tomate	RS, Brasil	Silveira, J. R. P. <sup>5</sup>
93	Batata	SP, Brasil	Instituto Biológico <sup>2</sup>
Biovar 2			
126	Batata	SP, Brasil	Instituto Biológico <sup>2</sup>
R56	Batata	RS, Brasil	Silveira, J. R. P. <sup>5</sup>

<sup>T</sup> Estirpe tipo bacteriana: linhagem de referência em cultura pura com as características de determinada espécie ou subespécie.

<sup>1</sup> Centre for Animal and Plant Health, Charlottetown, PE, Canadá

<sup>2</sup> Coleção de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Dep. Fitossanidade, Porto Alegre, RS.

<sup>5</sup> Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Porto Alegre, RS, Brasil.

### 3.2 Extração de DNA das estirpes de referência por lise alcalina

O DNA das estirpes de referência foi extraído pelo método de lise alcalina. Células bacterianas presentes em 1,0 mL de cultura ( $DO_{600}=0,1=1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) foram precipitadas por centrifugação (12 000 X g por 2 min) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram suspendidas em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e lisadas pela adição do tampão de lise (0,2 N NaOH, 1% SDS). Subsequentemente, o lisado de células foi submetido à neutralização e

precipitação com 300  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 7,5 M, seguido de centrifugação por 5 min a 12000 X g. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo. Logo, o DNA foi novamente precipitado com etanol 95% por centrifugação por 15 min a 12000 X g. A etapa de lavagem do DNA para eliminar os sais foi realizada com etanol 70%, através de centrifugação por 5 min. O DNA dessas estirpes foi solubilizado em 50 ou 100  $\mu\text{L}$  de água milli-Q, contendo RNase-A 1  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

### **3.3 Extração de DNA das estirpes de referência pelo método do cartão FTA**

Culturas bacterianas das estirpes de referência crescidas em caldo LB foram armazenadas em cartões FTA (Whatman, GE Healthcare, EUA) para posterior purificação e eluição do DNA.

Diluições em série ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ) dessas culturas em PBS foram ajustadas a  $\text{DO}_{600}=0,1=1 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , e antes da aplicação, a suspensão bacteriana foi homogeneizada em vortex. As diluições foram distribuídas diretamente em quadrantes nos cartões FTA. Foram utilizados volumes de 100  $\mu\text{L}$  para cada diluição. Os cartões FTA foram secos a temperatura ambiente por 24 h, e depois foram armazenados em pacotes plásticos guardados a temperatura ambiente, em caixas plásticas contendo sílica até o momento da purificação do DNA.

### **3.4 Padronização e validação do método de coleta, transferência de amostras de tubérculos e extração de DNA com o uso de cartões FTA**

Antes da coleta de amostras com o cartão FTA, um método foi padronizado e validado para a coleta e transferência de amostras de tubérculos de batata, que seriam submetidas às análises moleculares (PCR e qPCR).

Foram testados três métodos de coleta e transferência de amostras, utilizando uma amostra composta de 10 tubérculos de batata. Uma suspensão de células bacterianas ( $DO_{600}=0,1=10^0$ ) foi preparada em PBS (Romeiro, 2001) e diluída sucessivamente (1:10) até  $10^{-8}$  para avaliação da sensibilidade por PCR, de cada método de coleta e transferência de amostras para o cartão FTA. Essas diluições foram aplicadas nos cartões, de acordo com os métodos de coleta e transferência de amostras dos tubérculos.

Os três métodos avaliados foram: (1) pressão direta dos cones - que consistiu no corte na forma cônica, do tubérculo na região da inserção do estolão, com uma faca, trituração da extremidade do cone e contato do suco + 10  $\mu$ L das diluições de células bacterianas com a superfície do cartão; (2) cones macerados em PBS - consistiu da retirada dos cones, maceração dos mesmos com 5 mL de PBS (diluições das células bacterianas) em tubos Falcon e aplicação de 100  $\mu$ L do macerado (cones+suspensão de células bacterianas) nos cartões, e (3) fragmentos

de seringa macerados em PBS (diluições das células bacterianas) - consistiu da retirada dos fragmentos do tubérculo, na região de inserção do estolão, com uma seringa de insulina sem agulha, maceração dos fragmentos com 500  $\mu\text{L}$  de PBS (diluições de células bacterianas) em tubos de 1,5 mL, e aplicação de 100  $\mu\text{L}$  do macerado (batata+suspensão de células bacterianas) nos cartões.

As diluições sucessivas da suspensão bacteriana adicionada nos métodos de transferência 1, 2 e 3 foram repicadas para placas contendo meio NA para contagem do número de UFC (unidade formadora de colônias) ou número de células viáveis pela técnica da microgota (Romeiro, 2001). Cada placa foi dividida em 16 círculos impressos na superfície do meio de cultura, com um tubo de ensaio, e 10  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana (microgota) foi transferida para cada círculo, com 5 repetições por diluição da suspensão. As placas foram incubadas a 28  $^{\circ}\text{C}$  por 24 h, onde depois foram feitas contagens do número de UFC por círculo e esses dados foram transformados para  $\text{UFC.mL}^{-1}$ .

Os cartões foram secos a temperatura ambiente por 24 h, e guardados em pacotes plásticos contendo sílica. Os pacotes com os cartões foram depositados dentro de caixas plásticas e armazenados no escuro a temperatura ambiente.

A distribuição das amostras na área do cartão foi avaliada quanto à homogeneidade de distribuição das amostras, que estaria associada à amplificação de produtos na PCR. Um cartão FTA contendo suspensão

bacteriana ( $DO_{600}=0,1$ ) e outro contendo suspensão bacteriana ( $DO_{600}=0,01$ ) + suco de batata foram avaliados por PCR utilizando os discos como amostra de DNA. A área do cartão ao qual foram aplicadas as duas amostras foi subdividida em 16 quadrantes para retirada dos discos. Dezesesseis discos foram retirados e submetidos aos processos de purificação do DNA do disco e análise por PCR.

#### **3.4.1 Coleta de amostras de tubérculos de batata (DNA total)**

As amostras de batata foram compostas de 10 tubérculos coletados de regiões produtoras de batata do Brasil e de outros países. Foram coletadas 206 amostras com distribuição aleatória entre regiões e cultivares nos anos de 2007 a 2009. As regiões (estados, municípios, país) ao qual foram obtidas as amostras estão presentes na Tabela 3.

Foram coletadas amostras das cultivares Ágata (67), Almera (1), Ambition (1), Armada (1), Asterix (49), Atlantic (4), Baraka (4), Caesar (16), Chipie (1), Colorado (1), Cupido (23), Emeraude (1), Eole (1), Faluka (1), Fontane (1), Gourmandine (1), Manitou (1), Markies (4), Monalisa (9), Naturela (1), Opaline (1), Rodeo (2), Rudolf (1), Sinora (1), Soléia (1), Vivaldi (4), Voyager (6) e Zafira (1).

TABELA 3. Número de amostras coletadas no Brasil e em outros países. Porto Alegre, RS, 2009.

<b>Estado ou Município ou País de origem das amostras</b>	<b>Nº amostras</b>
<b>Minas Gerais</b>	<b>114</b>
Bueno Brandão	20
Pouso Alegre	90
Serra do Salitre	4
<b>Paraná</b>	<b>3</b>
Contenda	3
<b>Rio Grande do Sul</b>	<b>54</b>
Ibiraiaras	16
São Francisco de Paula	8
São José dos Ausentes	1
Tainhas	29
<b>Santa Catarina</b>	<b>26</b>
Capão Alto	13
Criciúma	9
São Joaquim	4
<b>Outros países</b>	<b>9</b>
Bolívia	3
Chile	4
Holanda	2

O método de pressão direta para a transferência de amostras e extração do DNA foi utilizado nas coletas de amostras dos tubérculos. Os cartões FTA, após a coleta das amostras, foram colocados para secar e armazenados a temperatura ambiente, dentro de caixas plásticas, até o momento da purificação do DNA.

### 3.4.2 Purificação do DNA dos cartões FTA

Discos dos cartões FTA (3.0 mm de diâmetro) foram cortados e retirados com um cortador Harris Micro Punch (Fitzco Inc., MN, USA), e colocados em tubos para PCR (200 µL). O cortador Harris Micro Punch foi limpo entre cada corte de disco com etanol 70%, para minimizar contaminação cruzada entre as amostras. Além disso, discos sem a presença de amostras foram retirados e utilizados como controle negativo para o uso do cartão FTA. Todos os discos foram lavados duas vezes com 200 µL de SDS 0,5% e incubados durante 5 min, e enxaguados duas vezes com tampão TE<sup>-1</sup> (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) por 5 min. O SDS e o tampão TE foram removidos por pipetagem. Os discos foram secos a 56 °C por 20 min com os tubos abertos no bloco de aquecimento do termociclador. Após a secagem dos discos, eles foram submetidos à eluição do DNA, que consiste na liberação do DNA do disco para uma solução tampão (TE), utilizando o tratamento com pH elevado (solução alcalina).

O DNA total presente nos discos foi eluído, pelo método alcalino descrito pelo fabricante, ao qual requer dois reagentes, uma solução alcalina (0,1 N NaOH; 0,3 mM EDTA, pH 13.0) e uma solução neutra (0,1 M Tris-HCl, pH 7.0). A primeira solução possibilita que o DNA purificado seja liberado da matriz, porém, encontra-se desestabilizado. A segunda solução com pH neutro é adicionada para que ocorra a estabilização da fita dupla

de DNA. Dois discos de 3 mm retirados dos cartões foram purificados no passo anterior e colocados em tubos de 1,5 mL, onde foram adicionados 35 µL da solução alcalina e foram incubados por 5 min a temperatura ambiente. Depois, 65 µL da solução neutra foram adicionados, seguidos por homogeneização em vórtex. Essa solução é incubada por 10 min com o disco, e homogeneizada novamente. Os discos são removidos com ponteiros da solução, na qual contém o DNA eluído (100 µL). Logo, esse DNA foi armazenado a -20 °C até o uso em PCR.

### **3.5 Escolha dos genes para desenho de oligonucleotídeos iniciadores e sondas para detecção de pectobactérias por qPCR**

Os genes *acnA*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *mtlD*, *pgi* e *proA* foram utilizados para análises de sequências *multiloci* (MLST) por Ma *et al.* (2007), na qual verificaram a separação das estirpes em 5 clados para cada uma das espécies de *Pectobacterium* (*P. brasiliensis*, *P. carotovorum*, *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum* e *P. wasabiae*). As estirpes de *Dickeya* agruparam-se separadamente do grande grupo de *Pectobacterium* spp. (Ma *et al.*, 2007). A partir desses resultados, análises de cada um desses genes utilizando essas mesmas sequências foram realizadas para avaliar qual (is) o melhor (es) genes para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para *Pectobacterium* e *Dickeya* spp.. Esses sete genes foram avaliados manualmente através de alinhamento múltiplo de sequências

utilizando o programa MEGA4 (Tamura, 2007), buscando regiões conservadas entre os gêneros *Dickeya* e *Pectobacterium*.

A partir dessas análises, foram escolhidos dois genes, o *acnA* e o *mtlD* (Tabela 4) que foram analisados isoladamente, através de alinhamentos e análises filogenéticas para verificar se ocorria o mesmo perfil filogenético obtido por Ma *et al.*, (2007), a separação entre os dois gêneros bacterianos e entre as espécies de *Pectobacterium*. Quarenta e seis sequências de nucleotídeos foram obtidas do banco de dados do NCBI (Genbank) para as espécies *Pectobacterium carotovorum*, *P. atrosepticum*, *P. brasiliensis*, *P. wasabiae*, *P. betavasculorum* e *Dickeya* sp. Análises filogenéticas dessas 46 sequências correspondentes às estirpes bacterianas de *Pectobacterium* e *Dickeya* spp. foram realizadas, utilizando o método computacional de *Neighbor-Joining* para construir árvores filogenéticas. O método de *p-distance* foi utilizado para estimar as distâncias entre as sequências e o teste de *bootstrap* (1000 repetições) foi utilizado para quantificar o erro padrão das estimativas de distância. As espécies *Ralstonia solanacearum* e *R. eutropha* foram utilizadas como grupo externo na reconstrução da filogenia de *Pectobacterium* e *Dickeya*. As figuras com os alinhamentos múltiplos foram geradas no programa GeneDoc.

Os oligonucleotídeos iniciadores e as sondas do tipo TaqMan<sup>®</sup> foram desenhados manualmente baseando-se nos alinhamentos entre *Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp., buscando sempre a mesma

temperatura de hibridização (temperatura de anelamento- $T_a$ ) para os pares de oligonucleotídeos. Dois pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para *Pectobacterium* e *Dickeya*, utilizando os genes *acnA* e *mtID*, respectivamente.

TABELA 4. Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para o estudo das pectobactérias, utilizando os genes *acnA* para *Pectobacterium* spp. e *mtID* para *Dickeya* sp. Porto Alegre, RS, 2009.

Espécie	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho do produto	T <sub>m</sub> (°C)
<i>P. brasiliensis</i>	AcnA-F: TRGGYGGCGATGTKAAYAAGG	252 pb	66,1
	AcnA-R: TWCCARATRGCCTTRGCVAGA		65,6
<i>P. atrosepticum</i>	AcnA-F: TRGGYGGCGATGTKAAYAAGG	252 pb	66,1
	AcnA-R: TWCCARATRGCCTTRGCVAGA		65,6
<i>P. carotovorum</i>	AcnA-F: TRGGYGGCGATGTKAAYAAGG	252 pb	66,1
	AcnA-R: TWCCARATRGCCTTRGCVAGA		65,6
<i>P. betavasculorum</i>	AcnA-F: TRGGYGGCGATGTKAAYAAGG	252 pb	66,1
	AcnA-R: TWCCARATRGCCTTRGCVAGA		65,6
<i>Dickeya</i> sp.	mtID-F: YGTCGGYGAACAGCAGC	208 pb	64,6
	mtID-R: AGGCRATRATATTCAGCGGCG		65,6

Obs.: R = A, G; Y = C, T; K = G, T; W = A, T; e V = A, C, G

As sondas foram desenhadas para hibridizar com a sequência-alvo, entre os dois oligonucleotídeos (no meio do produto de amplificação) a uma temperatura de 10 °C a mais que a temperatura dos oligonucleotídeos como recomendação do fabricante, para assegurar que os oligonucleotídeos iniciadores hibridizem antes à sequência-alvo. Os oligonucleotídeos iniciadores apresentavam degenerescência de bases, onde o par de oligonucleotídeos *acnA* hibridiza somente com *Pectobacterium* spp. e o par de oligonucleotídeos *mtID* hibridiza somente

com *Dickeya* spp. (Tabela 4). As sondas desenhadas são específicas para cada espécie de *Pectobacterium* (Tabela 5).

TABELA 5. Sondas de hidrólise desenhadas para as espécies de *Pectobacterium* para uso em qPCR (Sistema TaqMan). Porto Alegre, RS, 2009.

Espécie	Gene	Tamanho do produto	Sequencia da sonda 5'-3'	T <sub>m</sub> (°C)
<i>P. brasiliensis</i>	<i>acnA</i>	252 pb	<sup>1</sup> <b>FAM-TGATTGACCACTCGGTGACGGTTG-NFQ</b>	67,6
<i>P. atrosepticum</i>	<i>acnA</i>	252 pb	<sup>1</sup> <b>VIC-CAACCCGCTGTCGCCG-NFQ</b>	64,7
<i>P. carotovorum</i>	<i>acnA</i>	252 pb	<sup>1</sup> <b>NED-CGACCACTCGGTGACGGTG- NFQ</b>	65,7
<i>P. betavasculorum</i>	<i>acnA</i>	252 pb	<sup>1</sup> <b>VIC-TTCGCCAGTCGATCTGGTTATTGACC-NFQ</b>	67,4

<sup>1</sup>Sondas do tipo MGB (*Minor Groove Binder*) para detecção de *P. brasiliensis*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. betavasculorum* com os fluoróforos FAM, VIC, NED e VIC, respectivamente. Estes são ligados na região 5' e a molécula *quencher* não fluorescente (NFQ) é ligada na região 3'.

A especificidade das sondas e oligonucleotídeos ao nível de espécie foi verificada utilizando a ferramenta BLASTN do NCBI (Altschul *et al.*, 1997). O programa OligoAnalyser 3.1 da IDT Technologies (Owczarzy, 2008) foi utilizado para avaliar a temperatura de hibridização, a formação de dímeros e formação de estruturas secundárias de oligonucleotídeos e sondas.

### 3.6 Detecção de *Pectobacterium* spp., *Dickeya* sp. e *Ralstonia solanacearum* por PCR

Oligonucleotídeos iniciadores já relatados na literatura para *P. carotovorum*, *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. brasiliensis* e *Dickeya* sp. foram usados em análises por PCR das amostras de tubérculos (Tabela 6). As condições da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores presentes na Tabela 6 foram descritas pelos autores. (Tabela 6).

TABELA 6. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR. Porto Alegre, RS, 2009.

Oligonucleotídeos iniciadores	Gene ou região espaçadora	Espécie ou Gênero	Referência
	Região		
149LF/L1RA/L1RG	espaçadora intergênica do rRNA 16 S e 23S	<i>Pectobacterium</i> e <i>Dickeya</i> spp.	(Fessehaie <i>et al.</i> , 2002)
ADE1/ADE2	<i>peIA</i> , <i>D</i> , <i>E</i> (pectato liase)	<i>Dickeya</i> spp.	(Nassar <i>et al.</i> , 1996)
ECA1F/ECA2R	NI	<i>P. atrosepticum</i>	(De Boer Ward, 1995)
Y45/Y46	<i>peIB</i> (Pectato liase)	<i>P. atrosepticum</i>	(Fréchon <i>et al.</i> , 1998)
EXPCCF/EXPCCR	NI	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	(Kang <i>et al.</i> , 2003)
Pbr_rdgF/Pbr_rdgR	<i>Rdg</i> (proteína reguladora da pectina liase)	<i>P. brasiliensis</i>	(Ribas, 2007)
OLI1/Y2 <sup>1</sup>	rRNA 16S	<i>Ralstonia solanacearum</i>	(Seal <i>et al.</i> , 1999)

<sup>1</sup>Oligonucleotídeos iniciadores usados em PCR e em qPCR para detecção de *R. solanacearum*. NI: não identificado.

### 3.7 Obtenção dos padrões para a curva de calibração da qPCR

Os padrões utilizados na construção da curva de calibração (curva-padrão) de DNA em qPCR foram plasmídeos contendo os insertos desejados (fragmentos dos genes de interesse para cada espécie bacteriana). Os produtos de amplificação por PCR obtidos de estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. betavascularum*, *P. brasiliensis* e *P. atrosepticum* com o par de oligonucleotídeos iniciadores acnA, de *Dickeya* spp. com o par de oligonucleotídeos iniciadores mtID, e de *Ralstonia solanacearum* com o par de oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2 foram clonados utilizando o vetor pCR 2.1 (Invitrogen Life Technologies). A reação de ligação foi realizada em volume de 10 µL, utilizando-se 2 µL dos produtos de amplificação, 1 µL de T4 DNA ligase, 1 µL de tampão de ligação 10X, 2 µL de vetor pCR 2.1 e 4 µL de água ultra-pura. As reações de ligação foram incubadas a 14 °C *overnight*. Em seguida, esses produtos de ligação foram transformados em bactérias competentes (cepa XL1 de *Escherichia coli*) pelo processo de choque térmico.

Na transformação, uma alíquota de 5 µL do produto de ligação foi adicionada a um tubo contendo 50 µL de bactérias competentes previamente resfriadas no gelo. Os tubos foram incubados por 30 min no gelo. Posteriormente, os tubos foram incubados a 42 °C por 1 min em banho-maria, e imediatamente transferidos para o gelo. Uma alíquota de 1 mL de meio LB foi adicionada aos tubos, e estes foram incubados em banho-maria a 37 °C por 1 h. Uma alíquota de 200 µL das bactérias

transformadas foi inoculada em placas contendo meio LB e os antibióticos canamicina e ampicilina ( $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). O cofator IPTG ( $100 \text{ mM}$ ) e o substrato Blue-Gal ( $40 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) da enzima  $\beta$ -galactosidase foram adicionados junto com a alíquota de bactérias transformadas nos seguintes volumes, 40 e 80  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Essas placas foram incubadas *overnight* a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A seleção de clones positivos foi feita com antibióticos (Kanamicina e ampicilina), através da avaliação da coloração das colônias. As colônias de interesse (brancas) foram selecionadas para extração dos plasmídeos.

Esses plasmídeos foram confirmados por PCR para verificar a presença do inserto desejado (fragmento do gene *acnA*, *mtlD* e rDNA 16S) e depois foram quantificados por leitura em espectrofotômetro a 260 nm. Foi feita a leitura a 280 nm para avaliar a qualidade do DNA, através da relação 260/280 nm. Posteriormente, os plasmídeos foram diluídos em concentrações conhecidas de DNA para serem utilizados em qPCR, como padrões na curva de calibração.

### **3.8 Padronização e validação de qPCR por quantificação absoluta para detecção de pectobactérias (*Pectobacterium* spp. e *Dickeya* sp.) e *Ralstonia solanacearum***

Os oligonucleotídeos iniciadores *acnA* e *mtlD* para detecção de pectobactérias foram testados primeiramente em PCR com amostras de

DNA obtidas das estirpes de referência e de amostras de tubérculos em um termociclador PT-100 (MJ Research Inc). As condições da reação foram padronizadas para identificar a melhor temperatura de hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores juntamente com a concentração adequada dos reagentes (oligonucleotídeos, MgCl<sub>2</sub>, Taq polimerase e dNTPs). As reações foram conduzidas em volume de 20 µL, onde as concentrações de oligonucleotídeos foram de 0,4 µM de oligonucleotídeos iniciadores acnA (F+R) ou 0,2 µM de oligonucleotídeos iniciadores mtID (F+R), 50 µM de dNTPs, 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X Buffer PCR (20 mM Tris-Cl pH 8,4; 50 mM KCl sem MgCl<sub>2</sub>) e 0,25 U de Platinum® Taq polimerase (Invitrogen), sendo utilizados 12,5 µL da mistura de reação e 12,5 µL de DNA diluído. As reações foram conduzidas a 94 °C por 10 s, 60 °C por 15 s, 72 °C por 10 s, durante 40 ciclos, com um passo de desnaturação inicial de 94 °C por 5 min. Alíquotas de 10 µL do produto da amplificação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,0% (p/v) corado com brometo de etídeo a 60 V.min<sup>-1</sup>. Os produtos de amplificação no gel foram visualizados sob luz UV e fotografados com câmera digital Cyber-Shot DSC P93 (Sony).

A padronização de qPCR pelo método de quantificação absoluta com sondas de hidrólise (TaqMan®) para detecção das espécies de *Pectobacterium* em tubérculos (Tabela 5) utilizou padrões diluídos de cada espécie para a construção da curva de calibração.

A concentração das sondas para *P. atrosepticum*, *P. brasiliensis*, *P. carotovorum* e *P. betavascularum* foi de 0,1 µM de cada sonda. Foram

utilizados 0,4  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeos iniciadores acnA (F+R), 50  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 3,0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1X Buffer PCR (20 mM Tris-Cl pH 8,4; 50 mM KCl sem  $\text{MgCl}_2$ ), 0,005 X fluoróforo de referência passiva (ROX) (Invitrogen) e 0,25 U de Platinum® Taq polimerase (Invitrogen). A qPCR foi conduzida no aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) em volume de 25  $\mu\text{L}$ , a 94 °C por 10 s, 60 °C por 15 s, 72 °C por 10 s, seguida pela leitura de fluorescência a 60 °C por 35 s, durante 40 ciclos, com um passo de desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos.

A padronização e validação da qPCR pelo método de SYBR Green para detecção de *Dickeya* sp. foi realizada em volume de reação de 25  $\mu\text{L}$ : 0,2  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeos iniciadores mtID (F+R), 50  $\mu\text{M}$  de dNTP, 3,0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1X Buffer PCR (20 mM Tris-Cl pH 8,4; 50 mM KCl sem  $\text{MgCl}_2$ ), 0,005 X fluoróforo de referência passiva (ROX) (Invitrogen), 0,1 X fluoróforo SYBR Green (Invitrogen) e 0,25 U de Platinum® Taq polimerase (Invitrogen). As reações foram conduzidas a 94 °C por 10 s, 60 °C por 15 s, 72 °C por 10 s, seguida pela leitura de fluorescência a 60 °C por 35 s, durante 40 ciclos, com um passo de desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguidas pelo passo da dissociação (94 °C por 10 s, 50 °C por 2 min, 99 °C com  $\Delta$  0,1 °C/s).

A qPCR para detecção de *R. solanacearum* foi realizada pelo método de SYBR Green, utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2 (Tabela 4). As reações foram conduzidas em volume de reação de 25  $\mu\text{L}$  com 0,2  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2 (F+R), 50  $\mu\text{M}$

de dNTP, 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X Buffer PCR (20 mM Tris-Cl pH 8,4; 50 mM KCl sem MgCl<sub>2</sub>), 0,005 X fluoróforo de referência passiva (ROX) (Invitrogen), 0,1 X fluoróforo SYBR Green (Invitrogen) e 0,25 U de Platinum® Taq polimerase (Invitrogen). As reações foram conduzidas a 94 °C por 10 s, 68 °C por 15 s, 72 °C por 10 s, seguidas pela leitura de fluorescência a 60 °C por 35 s, durante 40 ciclos, com um passo de desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguidas pelo passo da dissociação (94 °C por 10 s, 50 °C por 2 min, 99 °C com  $\Delta$  0,1 °C/s).

Os dados de PCR em tempo real quantitativo para ambas as análises (pectobactérias e *R. solanacearum*) foram analisados manualmente e pelo software do aparelho 7500 Real Time PCR System versão 2.0.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA). As análises por qPCR pelo método de quantificação absoluta, geraram curvas de calibração para cada espécie bacteriana (*Pectobacterium* spp., *Dickeya* sp. e *R. solanacearum*), relacionando o valor de C<sub>T</sub> com as concentrações dos padrões (clones Pbr\_acnA, Pa\_acnA, Pcc\_acnA, Pbet\_acnA, Dick\_mtID e RS\_OLI1\_Y2). A concentração do DNA é medida por A<sub>260</sub> e convertida ao número de cópias presentes na amostra usando o peso molecular do DNA, correspondendo ao número de células bacterianas.

Foram calculados a eficiência para cada reação de qPCR a partir dos dados da curva de calibração. A eficiência de reação é calculada baseando-se no *slope* (inclinação da curva de calibração) com a seguinte fórmula:  $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ . A partir dos dados de C<sub>T</sub>, foram calculados a

média e o desvio-padrão entre as amostras a partir de triplicatas experimentais e de reação para avaliar a precisão da qPCR.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Padronização e validação do método de coleta, transferência de amostras de tubérculos e extração de DNA com o uso de cartões FTA

Três métodos de coleta e transferência de amostras dos tubérculos foram avaliados, sendo eles pressão direta dos cones, cones macerados em PBS e fragmentos de seringa macerados em PBS. Nas condições experimentais, o método de pressão direta foi mais sensível do que os outros dois métodos de transferência, sendo detectadas até 100 UFC/mL (limite de detecção do método de extração de DNA a partir da PCR) (Figura 3).

O método menos sensível foi o da seringa, onde o limite de detecção foi de  $1,0 \times 10^5$ - $10^6$  UFC/mL. O método intermediário em termos de sensibilidade foi o método dos cones triturados, que apresentou limite de detecção de  $1 \times 10^4$  UFC/mL (Figura 3).

O método de coleta de cones de tubérculos já é utilizado para extração de DNA de tubérculos para detecção de *Clavibacter michiganensis* e *R. solanacearum*, onde estes também são triturados, no entanto, retira-se uma alíquota que é adicionada em meios de enriquecimento, no qual é feito a extração do DNA ou essa alíquota é adicionada diretamente na PCR (Schaad *et al.*, 1999). Em outros estudos, o método de coleta utilizando a seringa mostrou-se viável para utilização em amostragem de amostras de tubérculos, seguido de enriquecimento ou somente aplicação do macerado nos cartões para detecção de *R solanacearum* (Figueiró, 2008).

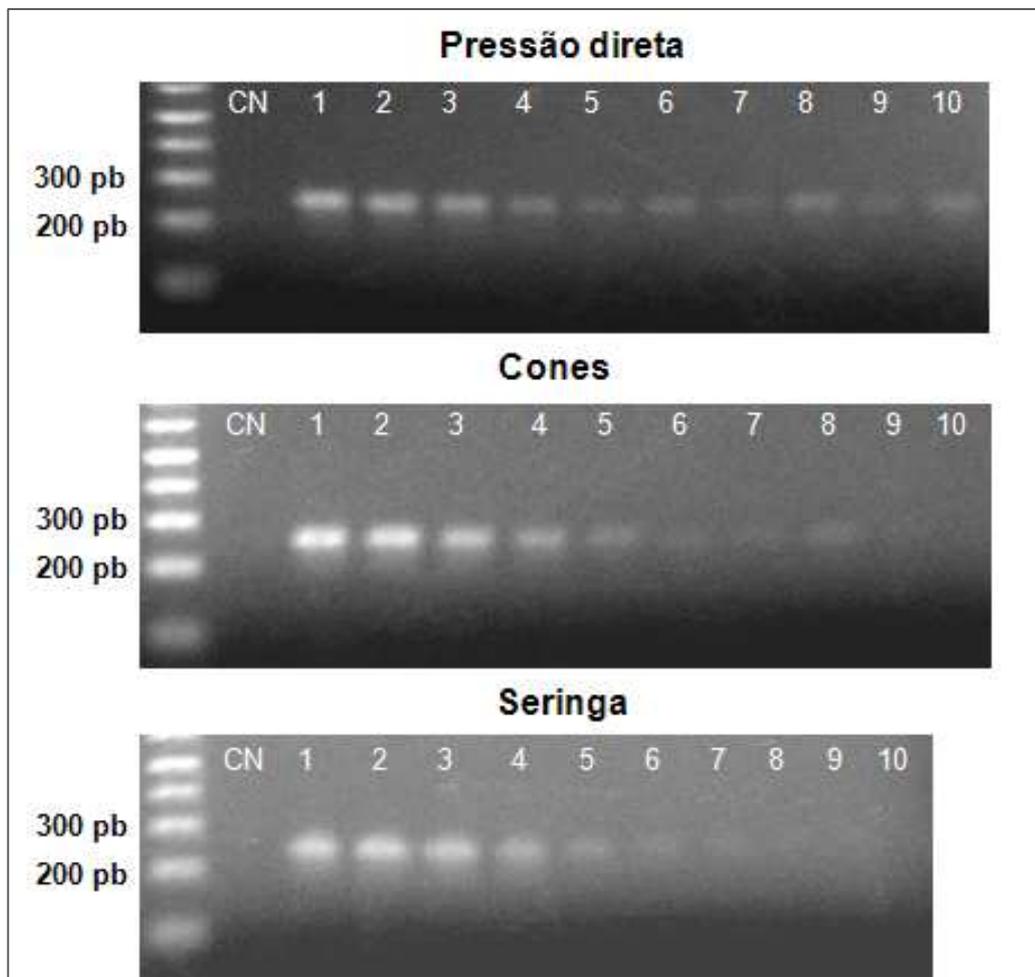


FIGURA 3. Sensibilidade dos métodos de coleta e transferência de amostras com suspensão bacteriana de *P. brasiliensis* (D.O. 600nm=0,1) para o cartão FTA por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores acnA. 1. DNA genômico de *P. brasiliensis* (Pbr1692) extraído pelo método de lise alcalina (controle positivo da PCR), 2. Controle positivo do cartão FTA com suspensão bacteriana de *P. brasiliensis* (DO<sub>600</sub>=1,0), 3. Controle positivo do cartão FTA com suspensão bacteriana de *P. brasiliensis* (D.O. 600nm=1,0) + Batata, 4. Suspensão bacteriana de *P. brasiliensis*  $1 \times 10^8$ , 5.  $1 \times 10^7$ , 6.  $1 \times 10^6$ , 7.  $1 \times 10^5$ , 8.  $1 \times 10^4$ , 9.  $1 \times 10^3$ , 10.  $1 \times 10^2$  UFC/mL. CN: Controle negativo da PCR. Porto Alegre, RS, 2009.

O método de pressão direta dos tubérculos sobre a matriz do cartão FTA ainda não havia sido relatada, porém, mostrou-se mais eficiente na detecção de células bacterianas, mostrando a população real de bactérias presentes nos tubérculos. O uso de cartões FTA pode dispensar o enriquecimento prévio das amostras para a detecção de bactérias em tubérculos. O uso de 10 cones pressionados sobre o cartão FTA facilita o processamento das amostras, dispensando o transporte dos tubérculos até o laboratório. Alguns estudos para detecção de pectobactérias por PCR utilizaram o enriquecimento e extração de DNA pelo método convencional ou kits de extração (El Tassa & Duarte, 2004; Degefu *et al.*, 2009) para a detecção de infecções latentes de pectobactérias nos tubérculos, porém, utilizou-se a PCR para detecção nessas amostras.

O passo do enriquecimento aumenta o tempo de processamento das amostras e pode favorecer o crescimento de outras espécies bacterianas em detrimento a pectobactérias ou *R. solanacearum*, que podem estar presentes em baixo nível populacional e não serem detectadas. O uso da qPCR aliada ao método de extração com os cartões FTA já vem sendo utilizado na detecção de vírus em animais e bactérias em humanos (Rajendram *et al.*, 2006; Muthukrishnam *et al.*, 2008), possibilitando o diagnóstico de muitas doenças sem o prévio isolamento e enriquecimento.

O uso dos cartões FTA para extração de DNA visando a detecção de bactérias fitopatogênicas em tubérculos e plantas de batata foi empregado sem enriquecimento prévio (Ribas, 2007; Figueiró, 2008). Esses autores

obtiveram resultados positivos com amostras com sintomas de canela-preta e murcha, ou seja, com a presença de pectobactérias e *R. solanacearum* com elevados níveis populacionais, respectivamente. O método do cartão FTA para extração de DNA também foi empregado para coleta e detecção de *Pseudomonas* sp. em gemas florais de pereira (Rommel, 2009), na qual a detecção só foi possível com o uso do cartão FTA com um limite de detecção de 100 UFC por mL.

No presente estudo, o método de FTA foi utilizado para facilitar a coleta de amostras, em grande número, sem a necessidade de enriquecimento prévio para a detecção de infecções latentes nos tubérculos.

Na logística da coleta, o uso dos cartões FTA permitiu que os tubérculos amostrados não fossem trazidos ao laboratório para ser feita a coleta do DNA, onde primeiramente, foi estabelecido um método de transferência de amostras para o cartão, que apresentasse sensibilidade na detecção de bactérias por PCR, e que fosse relativamente menos exaustivo do que os métodos convencionais para a extração do DNA. Depois, foi padronizado um método de detecção mais sensível do que a PCR convencional para o diagnóstico das infecções latentes de pectobactérias e *R. solanacearum*.

A distribuição das amostras nos cartões FTA foi avaliada por PCR (Figura 4). Amostras de DNA de suspensão bacteriana apresentaram amplificação por PCR em quase todas as amostras analisadas (discos retirados de todos os quadrantes), com exceção da amostra de nº 15. Em

amostras com bactéria e com macerado dos tecidos de tubérculos também não houve amplificação em uma das amostras (amostra nº 25) na Figura 4. No entanto, analisando a posição do quadrante no cartão de onde foram retirados esses dois discos, verificou-se que estes se localizam nas extremidades ou laterais da área do cartão.

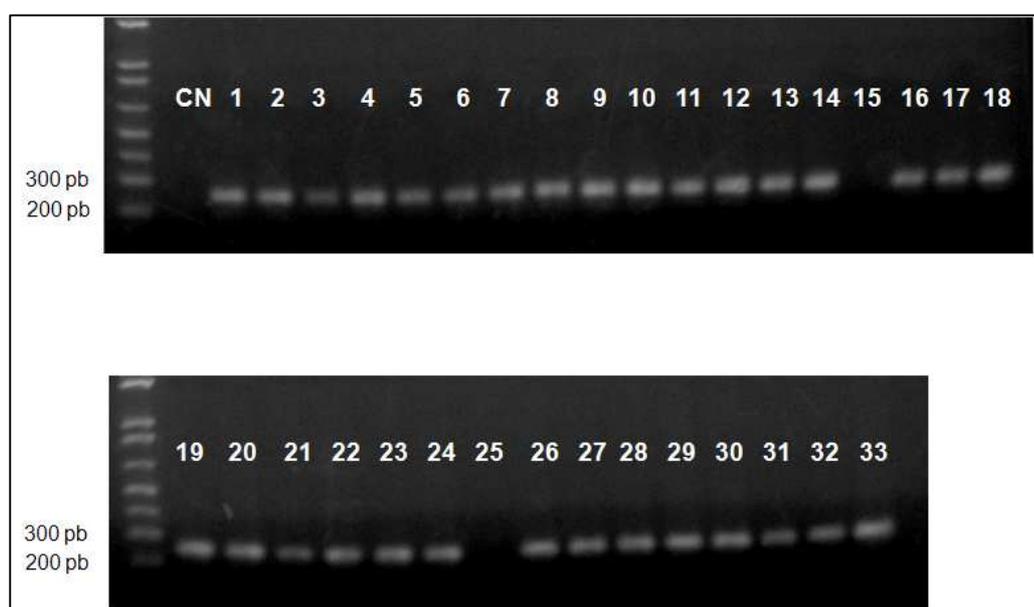


FIGURA 4. Avaliação da distribuição das amostras no cartão retiradas de cada quadrante (16 quadrantes). CN: controle negativo da reação. 1. Controle positivo da PCR e FTA Card (Pbr1692), Amostras de DNA de células bacterianas (2–17): discos 1-16; Amostras de DNA de batata e células bacterianas (18-33): discos 1-16. Porto Alegre, RS, 2009.

Amostras retiradas de regiões periféricas na área do cartão podem levar a resultados falso-negativos de acordo com os resultados obtidos, visto que a distribuição do suco dos tubérculos por pressão das amostras sobre o cartão pode não ocorrer de forma homogênea. Isso ocorre porque o

rompimento dos tecidos vegetais pode não ocorrer por completo em toda a área do cartão, quando amostras sólidas (cones) são pressionadas contra o cartão FTA de acordo com o fabricante (Whatman, 2003).

#### **4.2 Escolha dos genes para desenho de oligonucleotídeos iniciadores e sondas para detecção de Pectobactérias por qPCR**

A análise filogenética dos genes *acnA* e *mtlD* revelou que o gênero *Pectobacterium* foi dividido em cinco grupos, correspondentes às espécies *P. carotovorum*, *P. brasiliensis*, *P. betavasculorum*, *P. atrosepticum* e *P. wasabiae*, e um grupo separado de *Dickeya* spp. foi também encontrado (Figura 5 e 6). O gênero *Dickeya* formou um clado único, porém, o gênero foi pouco representado ao nível de espécie, devido à escassez de sequências disponíveis que se tem para as espécies.

Ma *et al.* (2007) e Pitman *et al.* (2010) também em suas análises filogenéticas obtiveram resultados semelhantes. Ma *et al.* (2007) trabalharam com esses dois genes, porém, suas análises foram feitas com mais cinco genes concatenados de enterobactérias para estudar a filogenia dos gêneros *Dickeya* e *Pectobacterium*. Pitman *et al.* (2010) utilizaram sequências dos genes *acnA* e *mdh* concatenadas para estabelecer as relações entre isolados de pectobactérias da Nova Zelândia.

A estirpe Eca6 de *P. atrosepticum* foi alocada no clado de *P. carotovorum* para o gene *acnA*, o que não aconteceu quando se utilizou o

gene *mtlD* (Figura 5 e 6). Para o gene *mtlD* (Figura 6), esse táxon agrupou-se com *P. atrosepticum* como já havia sido relatado (Ma *et al.*, 2007). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* SCRI482 (Pco) também foi alocado dentro do clado de *P. carotovorum* (Ma *et al.*, 2007). Os taxa Pc106 e WPP19 alocaram-se entre os clados de *Dickeya* sp. e *P. wasabiae* para o gene *acnA* (Figura 5). Para o gene *mtlD*, o *taxon* WPP19 agrupou-se com *P. wasabiae* e o táxon Pc106 permaneceu como um *taxon* isolado entre os clados de *P. brasiliensis* e *P. wasabiae* (Figura 6).

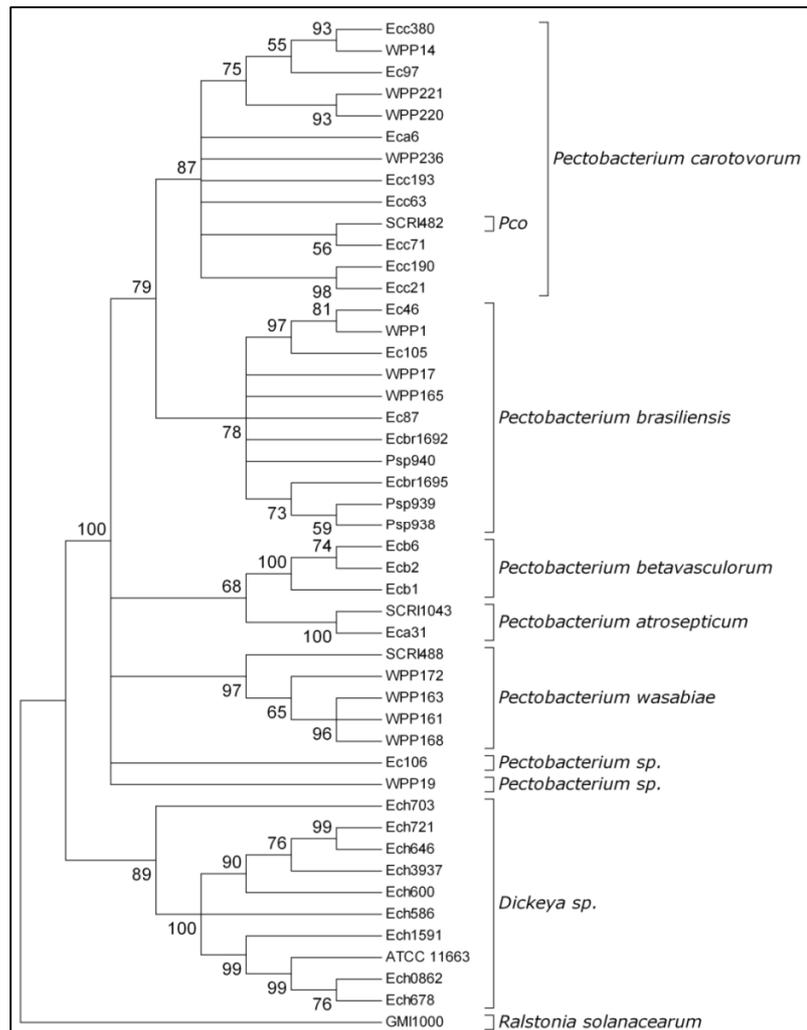


FIGURA 5. Árvore filogenética baseada no método de *Neighbour Joining* utilizando sequências parciais do gene *acnA* de estirpes de *Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp. e *Ralstonia solanacearum* obtidas do Genbank (NCBI). O método de *p-distance* foi utilizado para estimar as distâncias entre as sequências e o teste de *bootstrap* (1000 repetições) foi utilizado para quantificar o erro padrão das estimativas de distância. Porto Alegre, RS, 2009.

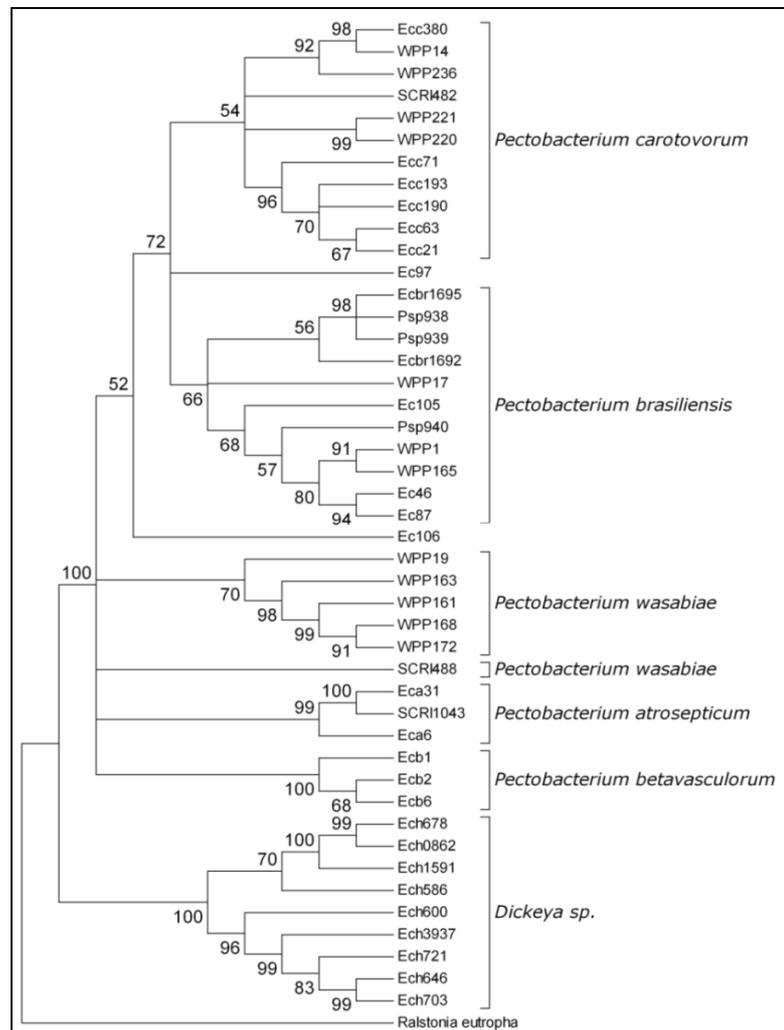


FIGURA 6. Árvore filogenética baseada no método de *Neighbour Joining* baseada em sequências do gene *mtlD* de estirpes de *Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp. e *Ralstonia eutropha* (NCBI). O método de *p-distance* foi utilizado para estimar as distâncias entre as sequências e o teste de *bootstrap* (1000 repetições) foi utilizado para quantificar o erro padrão das estimativas de distância. Porto Alegre, RS, 2009.

Esses dois genes mostraram-se representativos para identificar *Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp., visto que a análise filogenética permitiu diferenciá-las ao nível de espécie para *Pectobacterium* e apresentam árvores filogenéticas congruentes com outros estudos, o que denota que podem auxiliar na classificação e identificação dessas enterobactérias (Ma *et al.*, 2007; Pitman *et al.*, 2010). A diferenciação ao nível de espécie para *Dickeya* não foi possível, devido ao fato de existirem poucas sequências gênicas disponíveis das espécies descritas para esse gênero. Neste sentido, o uso desses genes para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores e sondas pode auxiliar no diagnóstico de doenças causadas por essas bactérias.

A partir dos alinhamentos dos genes *acnA* e *mtlD* (Figuras 7 e 8) foram verificadas diferenças nas sequências de nucleotídeos entre *Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp., a qual permitiram o desenho de oligonucleotídeos iniciadores, com o objetivo de separação entre os gêneros. Sondas para detecção por qPCR com o intuito de identificar cada uma das espécies de *Pectobacterium* também foram desenhadas baseando-se nos alinhamentos que mostravam diferenças entre as espécies desse gênero e de *Dickeya* spp.

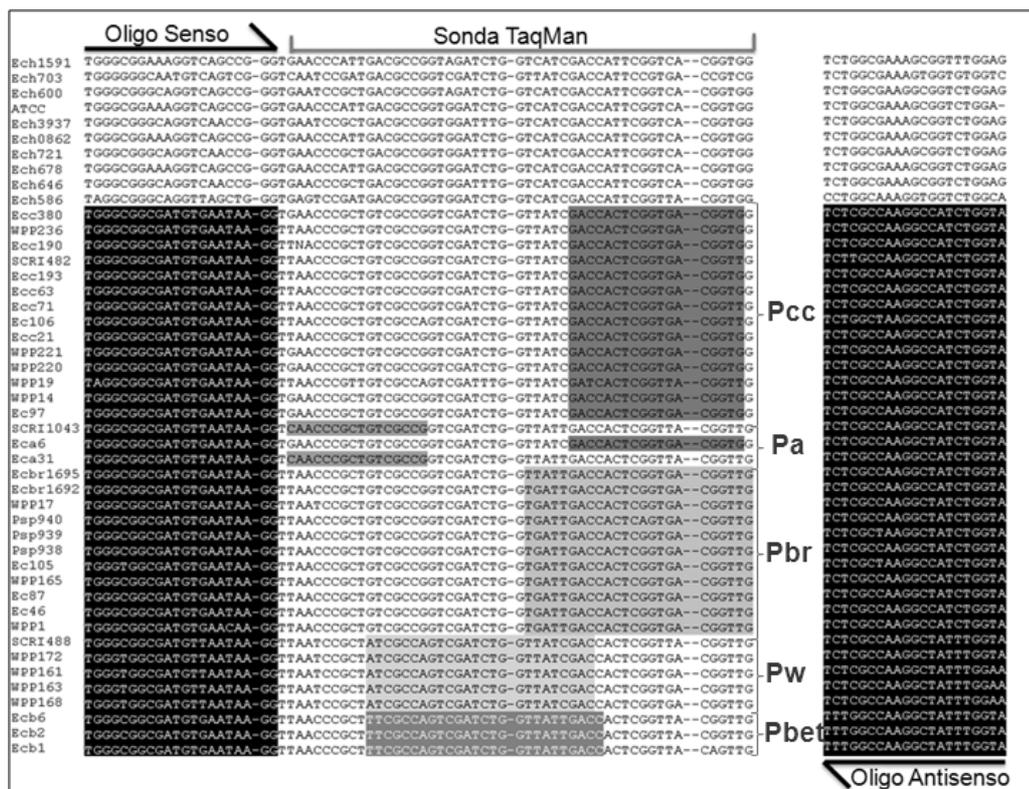


FIGURA 7. Alinhamento de seqüências do gene *acnA* de *Pectobacterium* spp. e *Dickeya* sp. e posicionamentos dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas para *Pectobacterium* spp. As espécies foram representadas como: Pcc (*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*); Pa (*P. atrosepticum*); Pbr (*P. brasiliensis*); Pw (*P. wasabiae*); e Pbet (*P. betavasculorum*) em vermelho. Porto Alegre, RS, 2009.

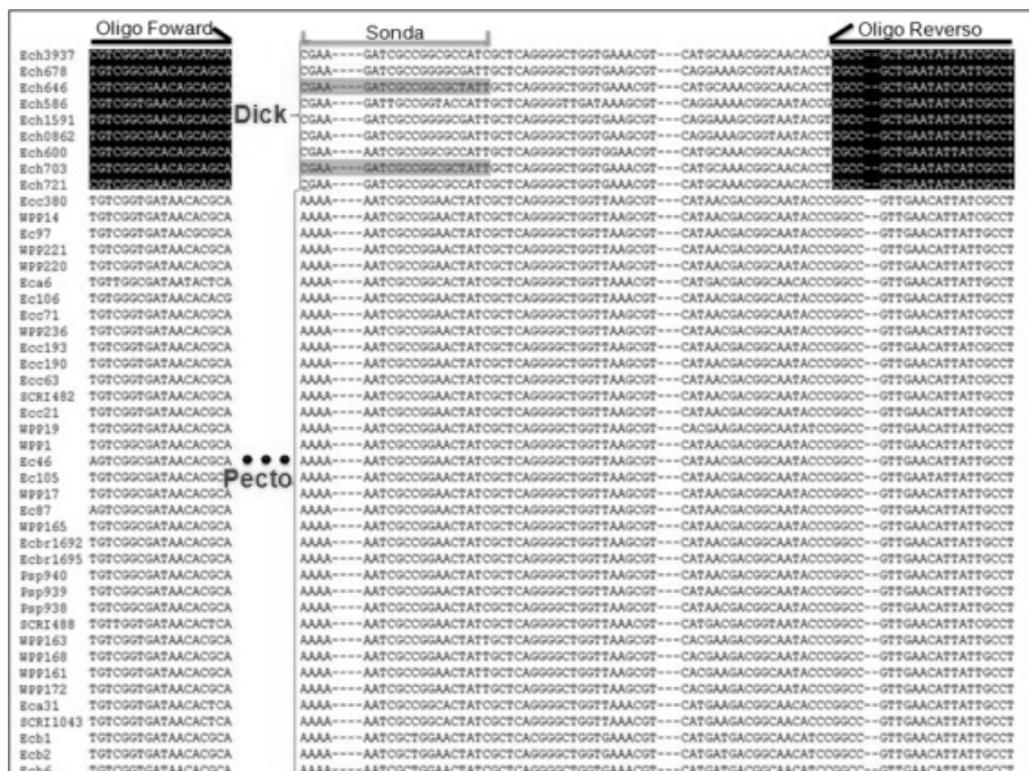


FIGURA 8. Alinhamento do gene *mtlD* de *Pectobacterium* sp. e *Dickeya* sp. e posicionamento dos oligonucleotídeos para *Dickeya* spp. Os gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya* foram representados por Pecto e Dick em vermelho, respectivamente. Porto Alegre, RS, 2009.

#### 4.3. Detecção de pectobactérias (*Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp.) e *Ralstonia solanacearum* por PCR

Amostras de campo (tubérculos coletados pelo método FTA) foram primeiramente submetidas a PCR, utilizando um par de oligonucleotídeos universal para detecção de pectobactérias para a região intergênica do RNAr 16S e 23S. Das 206 amostras analisadas, 84 amostras apresentaram os padrões de amplificação para *Dickeya* spp. (356 e 491 pb) e *Pectobacterium* spp. (450 pb e 490 pb), sendo que 55 amostras

apresentaram somente *Dickeya* spp. (oligos ADE1/ADE2) e 29 amostras apresentaram somente *Pectobacterium* spp. (Tabela 7).

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores ECA1F/2R e Y45/Y46 específicos para *P. atrosepticum* não detectaram a presença dessa espécie dentro das 206 amostras analisadas por PCR. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* foi detectada em apenas sete amostras com os oligos EXPCCF/R e *P. brasiliensis* foi detectada em 27 amostras com os oligos Pbr\_RdgF/R. *Ralstonia solanacearum* foi detectada em apenas nove amostras com os oligos OLI1/Y2 por PCR (Tabela 7).

*Pectobacterium atrosepticum* no Brasil já foi relatada no Rio Grande do Sul e foi caracterizada por métodos bioquímicos, fisiológicos, sorológicos e moleculares (Jabuonski *et al.*, 1986; Silveira, 1992; Oliveira, 2001; Oliveira *et al.*, 2003). No presente estudo, utilizando os oligos ECA1F/2R e Y45/Y46, essa espécie não foi detectada por PCR em nenhuma das 206 amostras analisadas, o que corrobora com os resultados encontrados por Tumelero (2003) e El Tassa & Duarte (2004) que mostraram que essa espécie não estava presente entre os isolados analisados de tubérculos-semente de batata.

El Tassa & Duarte (2004) utilizando os oligonucleotídeos Br1F/L1RA/L1RG, onde Br1F foi desenhado para amplificar somente DNAr 16S-23S de *P. brasiliensis*, verificaram que 53% dos isolados de tubérculos-semente do Rio Grande do Sul foram identificados como sendo dessa espécie. No entanto, esses oligonucleotídeos amplificam DNA de *P.*

*carotovorum* subsp. *carotovorum*, o que demonstra que não são específicos para a espécie *P. brasiliensis* (El Tassa, 2004). Ribas (2007) desenhou os oligos Pcbr\_rdgF/R e Pcbr\_pnlF/R para *P. brasiliensis* e encontrou Pbr em hastes de plantas de batata em até 55% das amostras coletadas.

Mais recentemente, foi relatada a ocorrência de *P. brasiliensis* no Sul da África por análise filogenética da região espaçadora intergênica do DNA ribossomal 16S-23S, onde verificou-se que os isolados pertenciam a essa espécie. Além disso, comparação de padrões de PCR-RFLP do rDNA 16-23S entre os isolados confirmaram a identidade das estirpes de *P. brasiliensis* causando canela-preta no sul da África por comparação com estirpes isoladas primeiramente no Brasil (Van der Merwe *et al.*, 2010). Essa espécie tem se mostrado presente no Brasil e no mundo, onde já foi registrada também nos EUA e Israel (Ma *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009).

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* é encontrada em várias regiões do mundo, causando doença em diversos hospedeiros, mais precisamente podridão-mole (Jabuonski *et al.*, 1986; Silveira, 1992; Oliveira, 2001; Oliveira *et al.*, 2003; Tumelero, 2003; El Tassa & Duarte, 2004). Em estudos recentes, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foi encontrada na Holanda e França, causando canela-preta em plantas de batata, o que demonstra que essa espécie pode estar associada com essa doença em temperaturas mais amenas (Haan *et al.*, 2008), porém, no presente estudo *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foi detectada por PCR

em sete amostras. No Brasil, algumas regiões produtoras de batata, tais como os estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Santa Catarina podem apresentar temperaturas mais baixas na época das águas, o que pode contribuir para que *Pcc* esteja presente em algumas amostras.

No Brasil, *Dickeya* sp. também já foi relatada no Brasil em menor incidência em batata (El Tassa & Duarte, 2004; Oliveira, 2001; Oliveira *et al.*, 2003; Tumelero, 2003), porém, nesse estudo ocorreu o contrário, onde *Dickeya* sp. ocorreu em alta frequência (26%). Em países como Finlândia, Holanda, Espanha, Nova Zelândia e Israel, espécies de *Dickeya* também foram detectadas em amostras de plantas e tubérculos (Laurila *et al.*, 2008; Czajkowski *et al.*, 2009; Laurila *et al.*, 2009; Slawiak *et al.*, 2009; Lojkowska *et al.*, 2009). Esses relatos estão associados a surtos epidêmicos causados por espécies de *Dickeya*.

Em trabalho recente com tubérculos de batata realizado por Figueiró (2008), *R. solanacearum* com os oligos OLI1/Y2 também foi detectada em poucas amostras. Figueiró (2008) também hipotetizou que esse par de oligos pode formar dímeros de oligos durante a PCR, reduzindo a amplificação da sequência-alvo, o que acaba reduzindo também a sensibilidade da PCR. No presente estudo, foi reduzida a concentração desse par de oligos na PCR, e não foi verificada a formação de dímeros de oligos na PCR em gel de agarose 2%.

Nas condições experimentais, a PCR pode detectar a presença dessas espécies bacterianas diretamente dos tecidos de tubérculos através

do método do cartão FTA para a coleta e extração do DNA. O uso de métodos mais sensíveis deve ser implementado para a detecção de pequenas populações bacterianas ( $\leq 10^5$  células bacterianas), visto que essas podem aumentar a ocorrência de epidemias.

TABELA 7. Detecção de pectobactérias (*Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp.) e *Ralstonia solanacearum* por PCR. Porto Alegre, RS, 2009.

Amostras	Pectobactérias ( <i>Pectobacterium</i> e <i>Dickeya</i> spp.)						<i>R.</i> <i>solanacearum</i>
	149LF/ L1RA/ L1RG	ECA1F/ ECA2R	Y45/ Y46	EXPCCF/ EXPCCR	Pbr_Rdg/ Pbr_RdgR	ADE1/ ADE2	OLI1/Y2
1001	+	-	-	+	-	-	-
1002	-	-	-	-	-	-	-
1003	-	-	-	-	-	-	-
1004	+	-	-	-	+	-	-
1005	-	-	-	-	-	-	-
1006	-	-	-	-	-	-	-
1007	+	-	-	-	+	-	-
1008	-	-	-	-	-	-	-
1009	-	-	-	-	-	-	-
1010	-	-	-	-	-	-	-
1011	-	-	-	-	-	-	-
1012	-	-	-	-	-	-	-
1013	+	-	-	-	+	-	-
1014	-	-	-	-	-	-	-
1015	+	-	-	-	+	-	-
1016	-	-	-	-	-	-	-
1017	+	-	-	-	-	+	-
1018	-	-	-	-	-	-	-
1019	-	-	-	-	-	-	-
1020	-	-	-	-	-	-	-
1021	-	-	-	-	-	-	-
1022	-	-	-	-	-	-	-
1023	+	-	-	-	+	+	-
1024	+	-	-	-	+	-	-

continuação TABELA 7. Detecção de pectobactérias (*Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp.) e *Ralstonia solanacearum* por PCR. Porto Alegre, RS, 2009.

1025	-	-	-	-	-	-	-
1026	-	-	-	-	-	-	-
1027	+	-	-	-	+	-	-
1028	-	-	-	-	-	-	-
1029	+	-	-	-	+	-	-
1030	-	-	-	-	-	-	-
1031	-	-	-	-	-	-	-
1032	-	-	-	-	-	-	-
1033	-	-	-	-	-	-	-
1034	+	-	-	-	-	+	-
1035	-	-	-	-	-	-	-
1036	-	-	-	-	-	-	-
1037	+	-	-	-	-	+	-
1038	+	-	-	-	-	+	-
1039	-	-	-	-	-	-	-
1040	-	-	-	-	-	-	-
1041	+	-	-	-	+	-	-
1042	-	-	-	-	-	-	-
1146	-	-	-	-	-	-	-
1147	-	-	-	-	-	-	-
3760	-	-	-	-	-	-	-
3761	-	-	-	-	-	-	-
3762	-	-	-	-	-	-	-
3763	-	-	-	-	-	-	-
3764	-	-	-	-	-	-	-
3765	-	-	-	-	-	-	-
3766	+	-	-	-	+	-	-
3918	-	-	-	-	-	-	-
3919	-	-	-	-	-	-	-
3920	-	-	-	-	-	-	-
4598	-	-	-	-	-	-	-
4599	-	-	-	-	-	-	-
4600	-	-	-	-	-	-	-
4601	-	-	-	-	-	-	-
4632	-	-	-	-	-	-	-
4633	-	-	-	-	-	-	-
4634	-	-	-	-	-	-	-

continuação TABELA 7. Detecção de pectobactérias (*Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp.) e *Ralstonia solanacearum* por PCR. Porto Alegre, RS, 2009.

4635	-	-	-	-	-	-	-
4636	-	-	-	-	+	-	-
4638	-	-	-	-	-	-	-
4639	-	-	-	-	-	-	-
4640	+	-	-	-	-	+	-
4641	+	-	-	-	-	+	-
4642	-	-	-	-	-	-	-
4643	-	-	-	-	-	-	-
4644	-	-	-	-	-	-	-
4645	-	-	-	-	-	-	-
5897	+	-	-	-	-	+	-
5898	+	-	-	-	-	+	-
5899	+	-	-	-	-	+	-
6255	-	-	-	-	-	-	-
6256	-	-	-	-	-	-	-
6257	-	-	-	-	+	-	-
6258	-	-	-	-	+	-	-
BOS1	-	-	-	-	-	-	-
BOS2	-	-	-	-	-	-	-
Ibi1	-	-	-	-	-	-	-
Ibi2	+	-	-	+	-	-	-
Ibi3	-	-	-	-	-	-	-
Ibi4	+	-	-	+	-	-	-
Ibi5	+	-	-	+	-	-	-
Ibi6	-	-	-	-	-	-	-
Ibi7	+	-	-	+	-	-	-
Ibi8	-	-	-	-	-	-	-
Ibi9	-	-	-	-	-	-	-
MG-1	+	-	-	-	-	+	-
MG-2	-	-	-	-	-	-	-
MG-3	-	-	-	-	-	-	-
MG-4	-	-	-	-	-	-	-
MG-5	-	-	-	-	-	-	-
MG-6	-	-	-	-	-	-	-
MG-7	-	-	-	-	-	-	-
MG-8	-	-	-	-	-	-	-
MG-9	-	-	-	-	-	-	-

continuação TABELA 7. Detecção de pectobactérias (*Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp.) e *Ralstonia solanacearum* por PCR. Porto Alegre, RS, 2009.

MG-10	-	-	-	-	-	-	-
MG-11	-	-	-	-	-	-	-
MG-12	-	-	-	-	-	-	-
MG-13	-	-	-	-	-	-	-
MG-14	-	-	-	-	-	-	-
MG-15	+	-	-	-	-	+	-
MG-16	-	-	-	-	-	-	-
MG-17	-	-	-	-	-	-	-
MG-18	-	-	-	-	-	-	-
MG-19	-	-	-	-	-	-	-
MG-20	-	-	-	-	-	-	-
MG-21	-	-	-	-	-	-	-
MG-22	+	-	-	-	-	+	-
MG-23	-	-	-	-	-	-	-
MG-24	-	-	-	-	-	-	-
MG-25	-	-	-	-	-	-	-
MG-26	-	-	-	-	-	-	-
MG-27	-	-	-	-	-	-	-
MG-28	+	-	-	-	-	+	-
MG-29	-	-	-	-	-	-	-
MG-30	-	-	-	-	-	-	-
MG-31	+	-	-	-	-	+	-
MG-32	+	-	-	-	-	+	-
MG-33	-	-	-	-	-	-	+
MG-34	+	-	-	-	-	+	-
MG-35	+	-	-	-	-	+	-
MG-36	+	-	-	-	-	+	-
MG-37	+	-	-	-	-	+	-
MG-38	-	-	-	-	-	-	-
MG-39	+	-	-	-	-	+	-
MG-40	+	-	-	-	-	+	-
MG-41	-	-	-	-	-	-	-
MG-42	+	-	-	-	-	+	-
MG-43	+	-	-	-	-	+	-
MG-44	+	-	-	-	-	+	-
MG-45	+	-	-	-	-	+	-
MG-46	+	-	-	-	-	+	-

continuação TABELA 7. Detecção de pectobactérias (*Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp.) e *Ralstonia solanacearum* por PCR. Porto Alegre, RS, 2009.

MG-47	+	-	-	-	-	+	-
MG-48	+	-	-	-	-	+	-
MG-49	+	-	-	-	-	+	-
MG-50	+	-	-	-	-	+	-
MG-51	+	-	-	-	-	+	-
MG-52	+	-	-	-	-	+	-
MG-53	+	-	-	-	-	+	-
MG-54	+	-	-	-	-	+	-
MG-55	+	-	-	-	-	+	-
MG-56	+	-	-	-	-	+	-
MG-57	+	-	-	-	-	+	-
MG-58	+	-	-	-	-	+	-
MG-59	+	-	-	-	-	+	-
MG-60	+	-	-	-	-	+	-
MG-61	+	-	-	-	-	+	-
MG-62	+	-	-	-	-	+	-
MG-63	+	-	-	-	-	+	-
MG-64	+	-	-	-	-	+	-
MG-65	+	-	-	-	-	+	-
MG-66	+	-	-	-	-	+	-
MG-67	+	-	-	-	-	+	-
MG-68	+	-	-	-	-	+	-
MG-69	+	-	-	-	-	+	-
MG-70	+	-	-	-	-	+	-
MG-71	+	-	-	-	-	+	-
MG-72	+	-	-	-	-	+	-
MG-73	+	-	-	-	-	+	-
MG-74	+	-	-	-	-	+	-
MG-75	-	-	-	-	-	-	-
MG-76	-	-	-	-	-	-	-
MG-77	+	-	-	-	+	-	-
MG-78	-	-	-	-	-	-	-
MG-79	-	-	-	-	-	-	-
MG-80	-	-	-	-	-	-	-
MG-81	+	-	-	-	+	-	-
MG-82	+	-	-	-	+	-	-
MG-83	+	-	-	-	+	-	-

continuação TABELA 7. Detecção de pectobactérias (*Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp.) e *Ralstonia solanacearum* por PCR. Porto Alegre, RS, 2009.

MG-84	+	-	-	-	+	-	-
MG-85	-	-	-	-	-	-	-
MG-86	+	-	-	-	+	-	-
MG-87	-	-	-	-	-	-	-
MG-88	-	-	-	-	-	-	-
MG-89	-	-	-	-	-	-	-
MG-90	-	-	-	-	-	-	-
MG-91	+	-	-	-	+	-	-
MG-92	+	-	-	-	+	-	-
MG-93	+	-	-	-	+	-	-
MG-94	-	-	-	-	-	-	-
MG-95	+	-	-	-	+	-	-
MG-96	-	-	-	-	-	-	-
MG-97	+	-	-	-	+	-	-
MG-98	-	-	-	-	-	-	-
MG-99	+	-	-	-	+	-	-
MG-100	-	-	-	-	-	-	-
MG-101	-	-	-	-	-	-	-
MG-102	-	-	-	-	-	-	-
MG-103	-	-	-	-	-	-	-
MG-104	+	-	-	-	+	-	-
RS1	+	-	-	-	-	+	-
RS2	-	-	-	-	-	-	-
RS3	-	-	-	-	-	-	-
RS4	-	-	-	-	-	-	-
Sc1	+	-	-	+	-	-	+
Sc2	-	-	-	-	-	-	+
Sc3	-	-	-	-	-	-	+
Sc4	-	-	-	-	+	-	+
Sc5	-	-	-	-	-	-	+
Sc6	-	-	-	-	-	-	+
Sc7	+	-	-	+	-	-	+
Sc8	-	-	-	-	-	-	+
Sc9	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.4 Padronização e Validação de qPCR para detecção de pectobactérias e *Ralstonia solanacearum*

##### 4.4.1 *Dickeya* spp.

Os oligonucleotídeos mtIDF/R produziram um único produto de amplificação entre as estirpes de referência de *Dickeya* spp. (Tabela 8) e amostras de campo como mostrado na Figura 9, o que indica que os oligos são específicos para *Dickeya* sp.



FIGURA 9. Produtos de amplificação das estirpes de referência de *Dickeya* spp. M. Marcador de peso molecular 1 Kb DNA plus ladder (Invitrogen); 1. Controle negativo (água deionizada); 2. e 3. *Dickeya chrysanthemi* bv. *chrysanthemi* (IBSBF 231 e IBSBF 920); 4. *Dickeya dianthicola* (IBSBF 856); 5. *Dickeya* sp. (CEN80); 6. Amostra 1038, e 7. MG-1. Porto Alegre, RS, 2009.

A especificidade do par de oligonucleotídeos mtID também foi confirmada por análise *in silico* (BLASTN) com todas as sequências de DNA bacteriano depositadas no GenBank, onde sequências de *Dickeya* spp. (gene *mtID*) apresentaram menor *e-value*.

TABELA 8. Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados em qPCR pelo sistema SYBR Green I para detecção de *Dickeya* sp. Porto Alegre, RS, 2009.

Estirpes	Origem	Oligos mtIDF/R <sup>a</sup>
<b><i>Pectobacterium atrosepticum</i></b>		
Pa 31	Canadá	-
Pa 790 <sup>T</sup>	Reino Unido	-
<b><i>Pectobacterium carotovorum</i></b>		
IBSBF 1442	Brasil	-
IBSBF 791	Dinamarca	-
47	Brasil	-
<b><i>Pectobacterium brasiliensis</i></b>		
IBSBF 1692 (212)	RS, Brasil	-
IBSBF 1697 (213)		-
<b><i>Pectobacterium betavasculorum</i></b>		
IBSBF 787 <sup>T</sup>	EUA	-
<b><i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i></b>		
IBSBF 231 <sup>T</sup>	EUA	+
IBSBF 920	Brasil	+
<b><i>Dickeya dianthicola</i></b>		
IBSBF 856	França	+
<b><i>Dickeya</i> sp.</b>		
CEN80	MG, Brasil	+
<b><i>Ralstonia solanacearum</i></b>		
Biovar 1		
1	RS, Brasil	-
93	SP, Brasil	-
Biovar 2		
126	SP, Brasil	-
R56	RS, Brasil	-

<sup>T</sup>Estirpe tipo bacteriana: linhagem de referência em cultura pura com as características de determinada espécie ou subespécie.

<sup>a</sup>+ indica sinal de fluorescência detectado até 35 ciclos ou menos e - indica que nenhum sinal de fluorescência foi detectado após 35 ciclos.

Ambas análises *in silico* e *in vitro* confirmaram que esse par de oligonucleotídeos foi específico às estirpes bacterianas de *Dickeya* spp. Não houve amplificação por PCR e qPCR entre as estirpes de *Pectobacterium* spp. e *R. solanacearum*. (Tabela 8, Figuras 9 e 10). Em qPCR, houve a formação de picos específicos na curva de dissociação para amostras de *Dickeya*, o que corrobora com o único produto de amplificação visualizado em gel de agarose 2% (Figuras 9 e 10). Amostras consideradas positivas em

PCR e qPCR apresentaram um único pico na curva de dissociação, ao qual corresponde a um produto de 208 pb, com temperaturas de desnaturação variando de 85 a 92 °C, como mostrado nas Figuras 10 e 11. Em função do valor de  $C_T$ , verificou-se que em amostras positivas em PCR e qPCR existe um maior número de células de *Dickeya* spp. nos tubérculos, e conseqüentemente apresenta uma maior quantidade de DNA para a detecção por PCR. Em amostras consideradas negativas por PCR e positivas por qPCR, verificou-se que a amplificação ocorre no limite de detecção da qPCR e conseqüentemente, os tubérculos apresentam um menor número de células bacterianas que não são detectadas por PCR. Em amostras negativas para a presença de *Dickeya* spp. e no controle negativo em qPCR, verificou-se que quando ocorria amplificação, o limite de detecção da qPCR era extrapolado ( $C_T \geq 35$  ciclos) e produzia-se um pico inespecífico aos produzidos por *Dickeya* spp. com temperatura de desnaturação abaixo de 85 °C e esse produto de amplificação não era visualizado em gel de agarose 2% (Figura 10).

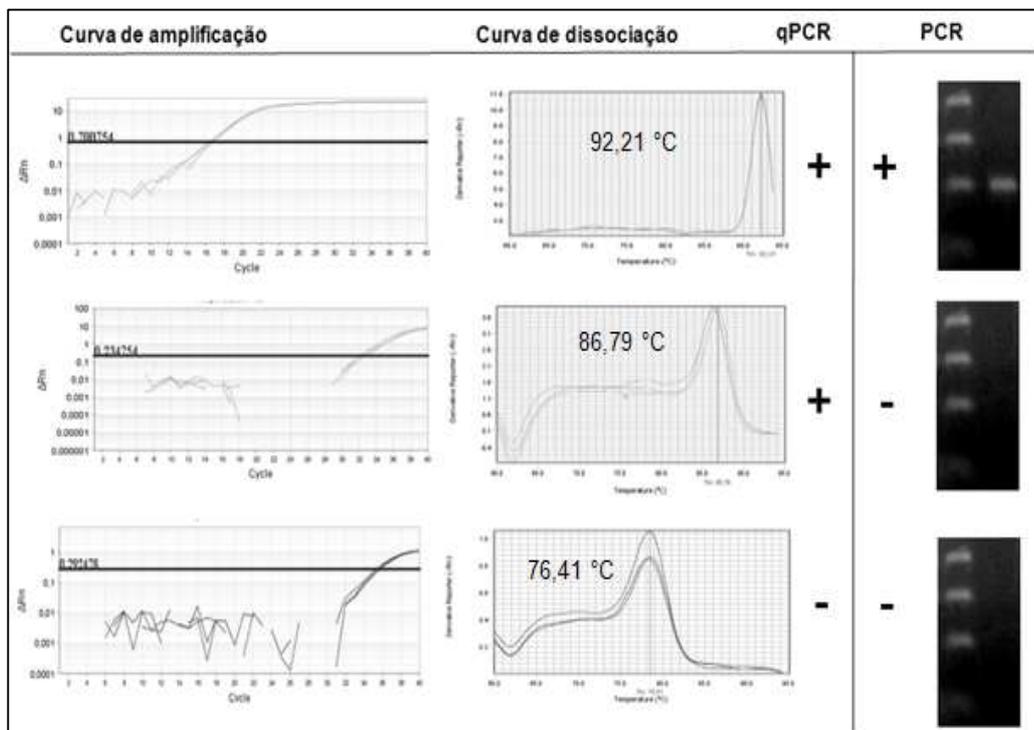


FIGURA 10. Gráfico de amplificação e curva de dissociação na qPCR e eletroforese em gel de agarose (2%) em amostras de controle positivo (positivo para qPCR e PCR), amostras de campo (positivo para qPCR e negativo para PCR) e controle negativo (negativo para qPCR e PCR). Em detalhe, Temperatura de *Melting* ( $T_m$ ). Porto Alegre, RS, 2009.

Apesar da qPCR por SYBR Green I mostrar-se específica para a detecção de *Dickeya* spp., não foi possível identificar qual(is) espécie(s) que estava ocorrendo nas amostras de campo. No entanto, verificou-se que as estirpes de referência de *Dickeya* sp.: *D. dianthicola* e *D. chrysanthemi* apresentaram temperatura de desnaturação (*melting*) variando entre 85,83 e 92,35 °C, o que ocorreu também em amostras de campo (Figura 11). Não foram verificados a formação de dímeros de oligonucleotídeos pelas análises da curva de dissociação e por análise do produto de amplificação em

eletroforese em gel de agarose 2%. Foram gerados produtos de amplificação de 208 pb entre as estirpes de referência de *Dickeya* spp. e amostras positivas em qPCR (Figuras 9 e 11).

A temperatura de desnaturação (*melting*) pode ser afetada pelo conteúdo GC, pelo tamanho do produto de amplificação e pela quantidade de produto de amplificação (Cheng *et al.*, 2006).

Na Figura 8, a partir do alinhamento entre as sequências de *Dickeya* sp. obtidas do GenBank verificou-se algumas mutações dentro do fragmento de 208 pb obtido com os oligos mtIDF/R. A ocorrência dessas mutações em alguns pares de bases entre as espécies de *Dickeya* pode ocasionar em diferenças na temperatura de desnaturação.

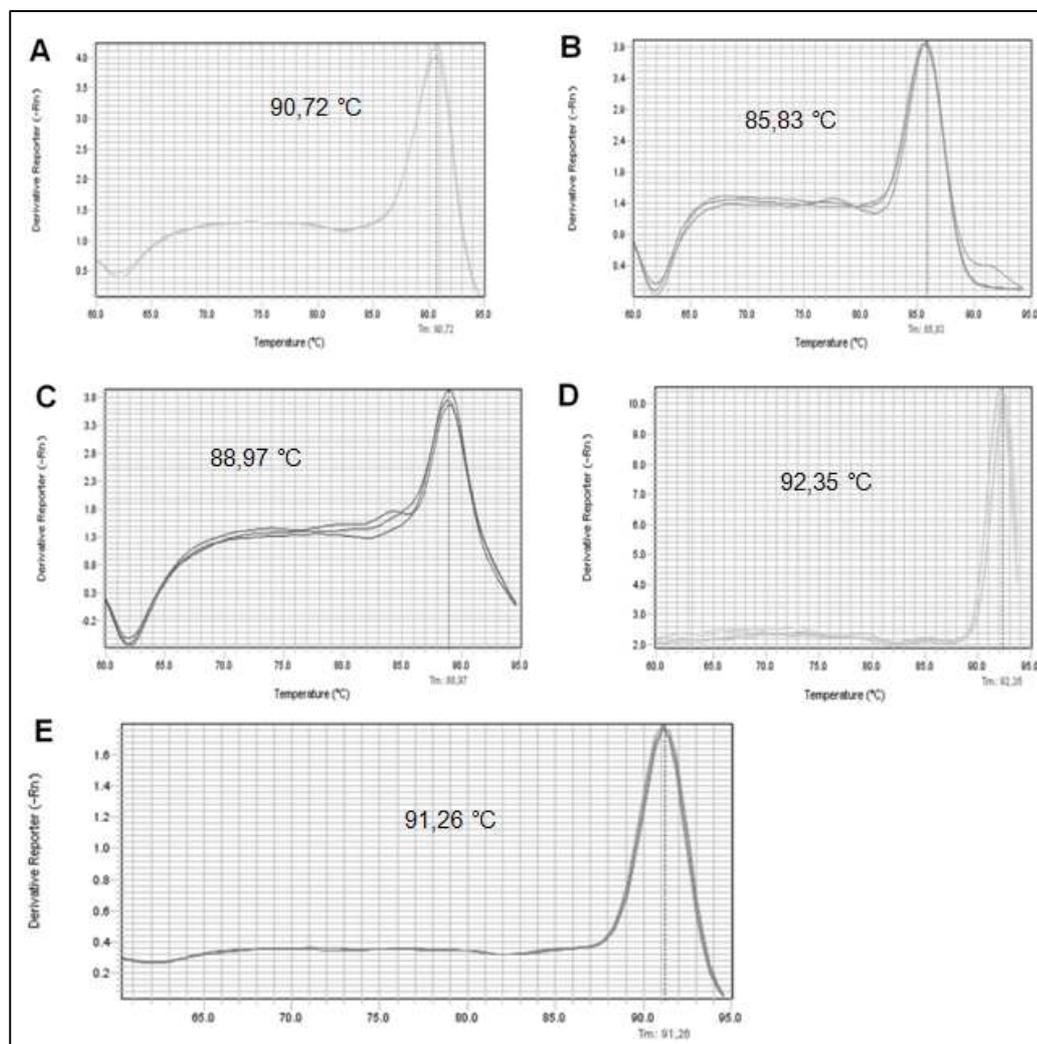


FIGURA 11. Curvas de dissociação para *Dickeya* sp. com os oligonucleotídeos mtID obtidas de controles positivos e amostras de campo. A. amostra MG-1; B. estirpe *D. chrysanthemi* bv. *chrysanthemi* IBSBF 231; C. amostra MG-35; D. estirpe *D. dianthicola* IBSBF 856 e E. estirpe *D. chrysanthemi* bv. *chrysanthemi* IBSBF 920. Em detalhe: Temperatura de *Melting* ( $T_m$ ). Porto Alegre, RS, 2009.

A ocorrência de polimorfismos em um único par de bases (SNP) em um produto de amplificação pode diferenciar entre estirpes bacterianas de uma mesma espécie, ou entre diferentes espécies bacterianas, baseando-se

na temperatura de desnaturação dos produtos gerados pela qPCR (Cheng *et al.*, 2006). Esses polimorfismos ou genótipos diferentes podem ser detectados por análises de qPCR, seguida de desnaturação ou dissociação de alta resolução (*HRM, High-Resolution Melting*) (Cheng *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2009), utilizando além do SYBR Green I outros fluoróforos tais como LCGreen (Gundry *et al.*, 2003; Wittwer *et al.*, 2003; Reed *et al.*, 2007).

A detecção e identificação de bactérias em humanos tem sido feita pela caracterização do gene que codifica o RNA ribossomal 16S por análises filogenéticas e seqüenciamento de regiões desse gene, porém, esses dois métodos são bastante exaustivos e consomem bastante tempo. Atualmente, análise da dissociação de alta resolução (*HRM-High Resolution Melting*) de produtos de amplificação da qPCR com um fluoróforo intercalante de DNA fita-dupla vem sendo utilizada com o objetivo de identificar isolados e caracterizar espécies bacterianas, que estão associadas à doenças importantes em humanos. Esse método já vem sendo utilizado para detecção de variantes de sequência em heterozigose ou homozigose (variação em uma única base) para genotipagem, análises de busca de variação de sequências em humanos, identificação de defeitos e doenças genéticas (Cheng *et al.*, 2006).

No presente estudo não foi utilizado *HRM*, porém, a ocorrência de diferentes temperaturas de desnaturação entre as amostras de campo e estirpes de referência é um indicativo de que existe diferenças entre as

espécies de *Dickeya*, corroborando com diferenças nas sequências do gene *mtlD* apresentadas na Figura 8. Estudos mais aprofundados de variabilidade de *Dickeya* spp. baseando-se em SNPs em determinados genes devem ser feitos com intuito de auxiliar no diagnóstico causado pelas estirpes em diferentes hospedeiros, e conseqüentemente, contribuir para o conhecimento epidemiológico de doenças provocadas por essas espécies.

A validação da técnica de qPCR para detecção de *Dickeya* spp. foi realizada com a avaliação de alguns parâmetros, tais como especificidade, precisão, sensibilidade, limite de detecção, eficiência da amplificação, coeficiente de correlação ( $r^2$ ) da curva-padrão (valores de  $C_T$  x logaritmo das concentrações de DNA de cada diluição) e inclinação da curva (*slope*).

A especificidade do produto de amplificação foi verificado em gel de agarose 2% e através da curva de dissociação como mostrado nas Figuras 9, 10 e 11, na qual os produtos de amplificação e curvas de dissociação foram específicos para *Dickeya* spp. A precisão dos dados de qPCR foi avaliada a partir do desvio padrão entre as 3 replicatas de reação por amostra coletada, na qual variou de 0,01 a 4,4, onde maiores desvios foram verificados em amostras com menor número de células bacterianas, quase no limite de detecção (Tabela 9 e 10).

A eficiência da amplificação dos oligos *mtlDF/R* obtida a partir da curva de calibração com os padrões de DNA foi de 91%, o que indica que a cada ciclo o produto de amplificação vem sendo duplicado. Outro parâmetro avaliado foi o limite de detecção da qPCR que foi de 39 células bacterianas,

com um  $C_T$  de 33,51 (Tabela 9). Amostras com menor valor de  $C_T$  do que os limites de detecção apresentavam desvio padrão alto, onde essas amostras não foram consideradas positivas, visto que o limite de detecção encontrado na curva-padrão foi de 39 células com  $C_T$  de 33,51 (Tabela 9). Diluições menores abaixo de 39 células ( $CT \geq 33,5$ ) foram feitas, mas não houve amplificação abaixo desse limite. As amostras coletadas que foram consideradas positivas para a presença de *Dickeya* sp. apresentaram de 40 até 17.000 células presentes nos tecidos dos tubérculos (Tabela 10).

Tabela 9. Quantidade de DNA dos padrões de *Dickeya* sp. empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009

Quantidade DNA (ng/uL)	$C_T$ desvio		n. copias/uL	n. células detectadas
	$C_T$ média	padrão		
125	9,54	0,20	31250000,0	390625000,00
12,5	11,30	0,01	3125000,0	39062500,00
1,25	14,16	0,19	312500,0	3906250,00
0,125	17,84	0,04	31250,0	390625,00
0,0125	21,65	0,05	3125,0	39062,50
0,00125	25,62	0,21	312,5	3906,25
0,000125	29,82	0,20	31,3	390,63
0,0000125	33,51	0,23	3,1	39,06

O *slope* da curva de regressão linear na curva de calibração foi de (-3,554) como mostrado na Figura 12, o qual se encontra dentro do intervalo aceitável de -3,1 a -3,6 (E=90-110%), que é considerado um limite tolerável para a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos (Raymaekers *et al.*, 2009). A eficiência calculada pelo método da curva-padrão assume que eficiências de amplificação entre os padrões de quantificação e amostras

desconhecidas testadas sejam as mesmas, ou seja, os oligonucleotídeos amplificam o fragmento esperado de DNA com a mesma eficiência para as diluições de DNA conhecidas e amostras de campo com concentrações variáveis. Essa eficiência de amplificação mostra o quão sensível será os oligos para detectar a sequência-alvo na PCR (Applied Biosystems, 2008).

O coeficiente de correlação ( $r^2$ ) mostra o quão bom um valor é na predição de outro, onde o valor  $\geq 0,99$  apresentado neste estudo proporcionou confiabilidade para a correlação de dois valores (Applied Biosystems, 2008), o  $C_T$  e a concentração de DNA nas amostras (Figura 12). O DNA presente nas amostras corresponde ao número de células bacterianas, baseando-se no tamanho do genoma de cada espécie bacteriana.

Esse método foi validado com amostras de tubérculos que não apresentavam sintomas causados por *Dickeya* sp. e amostras de tubérculos inoculados para validar também o método de coleta de amostras. Foram testadas 206 amostras de tubérculos coletadas, onde verificou-se que 113 amostras infectadas com *Dickeya* sp., utilizando o método de qPCR para detecção como mostrado na Tabela 10.

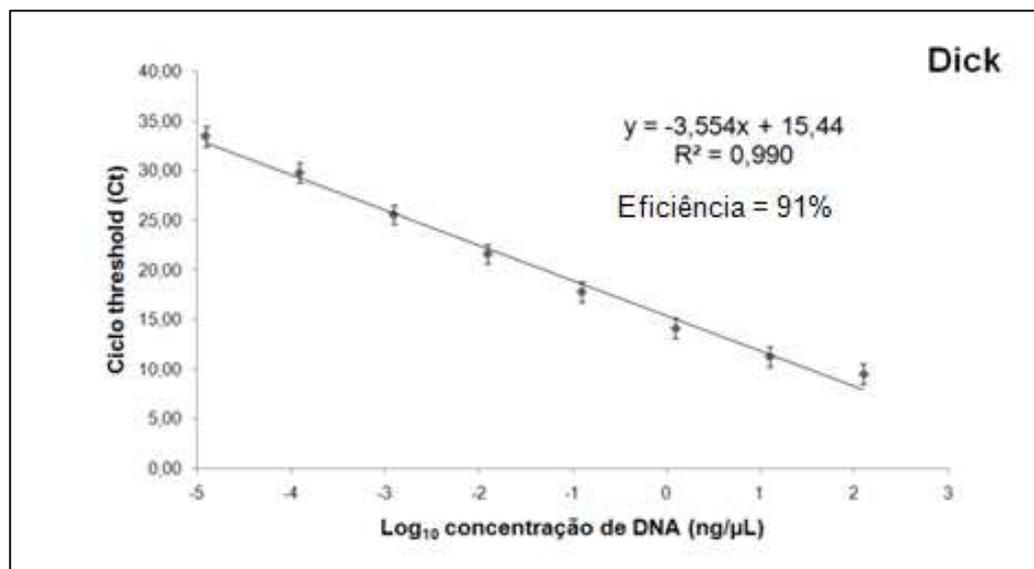


FIGURA 12. Curva de calibração da concentração de DNA (ng/μL) de *Dickeya* sp. em relação ao ciclo *threshold*. Porto Alegre, RS, 2009.

Dessas 113 amostras infectadas com *Dickeya* spp., somente 55 amostras foram identificadas como positivas anteriormente por PCR (Tabela 7 e 10). Esse fato mostra que o método de PCR com os oligos ADE1/ADE2 pode gerar resultados falsos-negativos e com a sensibilidade apresentada do método de qPCR, essas amostras foram consideradas positivas para a presença de *Dickeya* sp. A sensibilidade de qPCR para a detecção de baixos níveis populacionais de *Dickeya* spp. nos tecidos dos tubérculos foi demonstrada.

Laurila *et al.* (2010), também detectou *Dickeya* sp. em amostras de campo através de qPCR, com um limite de detecção de  $10^2$  células bacterianas ou mais por mL. Porém, os autores realizavam o isolamento das estirpes bacterianas das hastes de plantas com sintomas. No presente

estudo, o limite de detecção foi de aproximadamente 40 células bacterianas encontradas diretamente nos tecidos dos tubérculos (Tabela 10). Isso mostra que o método de qPCR aliado ao método de coleta de amostras e extração de DNA através dos cartões FTA foi eficiente na detecção de *Dickeya* sp. em tubérculos.

Os resultados encontrados para incidência de *Dickeya* sp. em um número elevado de amostras de tubérculos nesse estudo corroboram com os resultados também encontrados em países da Europa, onde a incidência dessa espécie e a ocorrência de epidemias de canela-preta tem aumentado severamente (Saddler, 2009; Toth *et al.*, 2009). Em estudos anteriores no Brasil, essa espécie apresentou menor incidência dentre as demais espécies de pectobactérias (Oliveira *et al.*, 2003; El Tassa & Duarte, 2004), o que indica que a incidência de *Dickeya* spp. tem aumentado gradativamente ao longo dos anos. Além disso, o gênero *Dickeya* é composto por seis espécies, onde três dessas podem causar canela-preta e podridão-mole na cultura da batata, com a proposta de mais uma espécie, *D. solani*, que tem causado epidemias de canela-preta na cultura na Europa (Saddler, 2009; Toth *et al.*, 2009). As espécies *D. dianthicola*, *D. dadantii*, *D. zea* e *D. solani* já são reconhecidas como algumas das espécies de pectobactérias que causam canela-preta em todo o mundo. No Brasil, esse foi o primeiro trabalho que relata a incidência elevada desse grupo de pectobactérias em tubérculos, o que indica que surtos epidêmicos de canela-preta causados por esse grupo tem aumentado ao longo dos anos.

TABELA 10. Detecção de *Dickeya* sp. por qPCR pelo sistema SYBR-Green I. Porto Alegre, RS, 2009.

Amostra	Média C <sub>T</sub>	Desvio padrão C <sub>T</sub>	nº células	qPCR oligos mtID
MG-30	27,72	0,23	876,3	+
MG-29	27,77	0,73	845,9	+
MG-33	27,85	0,05	805,3	+
6256	30,24	0,24	171,3	+
6258	30,35	0,36	159,7	+
4639	31,18	0,46	93,1	+
6255	31,28	0,10	87,4	+
6257	31,85	0,47	60,4	+
1015	30,36	0,60	158,9	+
1014	30,95	0,54	107,8	+
1013	31,22	0,59	90,8	+
SC9	29,50	0,50	277,2	+
SC3	30,11	4,40	186,5	+
SC6	32,07	0,22	52,2	+
BOS1	27,82	0,21	819,2	+
1010	30,25	0,52	169,7	+
1005	30,73	0,73	124,7	+
1011	31,28	0,27	87,4	+
1006	32,48	1,13	40,0	+
3919	28,61	0,37	492,0	+
3920	30,50	0,32	144,4	+
1147	32,15	0,57	49,7	+
MG-38	27,55	0,15	978,2	+
MG-41	27,66	0,24	909,0	+
MG-103	30,19	1,16	176,9	+
3762	30,52	0,11	142,7	+
MG-96	30,85	3,76	115,1	+
3761	30,88	0,43	112,9	+
MG-98	30,96	0,22	107,5	+
3760	31,10	0,28	98,0	+
3766	31,43	0,11	79,3	+
MG-102	31,72	0,54	65,5	+
3764	31,74	0,80	64,8	+
3763	32,49	0,46	39,8	+
1007	30,03	0,33	196,7	+
1012	30,99	0,33	105,5	+
1003	32,42	0,95	41,6	+
1016	30,46	0,17	148,9	+
4644	31,85	0,69	60,2	+
4645	32,35	0,67	43,8	+
4642	32,41	0,12	41,9	+
1035	27,68	0,24	900,0	+
1036	28,14	0,87	665,6	+
1039	28,23	0,54	629,9	+

continuação TABELA 10. Detecção de *Dickeya* sp. por qPCR pelo sistema SYBR Green I. Porto Alegre, RS, 2009.

1032	28,43	0,13	552,0	+
1004	28,66	0,13	477,6	+
1033	29,13	0,26	352,5	+
1018	29,68	0,25	245,3	+
1024	29,74	0,23	236,8	+
1008	29,95	0,25	207,2	+
1041	30,20	0,14	175,3	+
1020	30,94	0,77	109,0	+
1042	31,83	0,55	61,0	+
1022	32,03	0,93	53,7	+
1019	32,25	0,76	46,5	+
1021	32,34	0,48	43,9	+
1009	32,46	0,64	40,8	+
MG-35	25,21	0,24	4462,0	+
MG-22	25,33	0,22	4115,0	+
MG-32	27,19	0,10	1232,0	+
MG-31	27,31	0,03	1140,8	+
MG-28	27,43	0,28	1056,5	+
MG-34	27,45	0,40	1044,9	+
4641	25,03	0,22	5020,4	+
4640	25,41	0,27	3901,8	+
5897	26,03	0,46	2615,3	+
5899	26,17	0,52	2397,9	+
5898	26,31	0,19	2191,2	+
MG-15	24,52	0,22	6968,1	+
MG-1	24,21	1,22	8525,6	+
MG-50	24,73	0,22	6093,0	+
MG-56	24,99	0,09	5128,5	+
MG-45	25,13	0,45	4702,2	+
MG-54	25,40	0,98	3932,7	+
MG-55	25,54	0,29	3608,5	+
MG-60	25,89	0,29	2861,3	+
MG-59	25,92	0,57	2812,2	+
MG-69	25,95	0,43	2756,4	+
MG-64	25,96	0,60	2737,6	+
MG-61	26,00	0,34	2673,3	+
MG-68	26,00	0,10	2666,9	+
MG-65	26,06	0,21	2564,8	+
MG-58	26,09	0,42	2514,4	+
MG-70	26,12	0,56	2477,5	+
MG-66	26,16	0,07	2404,9	+
MG-63	26,32	0,38	2168,8	+
MG-62	26,35	0,09	2129,3	+
MG-52	26,43	0,57	2019,4	+
MG-67	26,44	0,35	2012,4	+
MG-73	26,45	0,23	1996,7	+
MG-53	26,47	0,25	1972,7	+

continuação TABELA 10. Detecção de *Dickeya* sp. por qPCR pelo sistema SYBR Green I. Porto Alegre, RS, 2009.

MG-71	26,52	0,27	1911,3	+
MG-51	26,53	0,46	1892,8	+
MG-74	26,54	0,46	1885,1	+
MG-72	26,55	0,23	1875,1	+
MG-46	26,62	0,65	1792,1	+
MG-48	26,66	0,20	1737,3	+
MG-49	26,94	0,16	1454,4	+
MG-57	26,94	0,53	1451,4	+
MG-37	26,96	0,25	1432,1	+
MG-36	27,17	0,33	1254,9	+
MG-47	27,18	0,51	1245,3	+
MG-39	27,21	0,19	1219,6	+
MG-43	27,21	0,48	1217,1	+
MG-40	27,31	0,41	1140,4	+
MG-44	27,43	0,91	1055,7	+
MG-42	27,43	0,08	1054,8	+
RS1	25,99	0,77	2687,9	+
1038	23,13	0,24	17118,5	+
1037	23,16	0,27	16804,5	+
1023	24,67	0,19	6330,9	+
1034	26,03	1,20	2616,1	+
1017	26,65	0,66	1749,3	+

NI: não identificado

<sup>1</sup>: nº de células *Dickeya* sp. detectadas por qPCR

<sup>2</sup>: Resultados positivos por PCR

#### 4.4.2 *Pectobacterium* spp.

Os oligonucleotídeos acnAF/R amplificam um fragmento de DNA de 252 pb do gene acnA das estirpes de referência das espécies de *Pectobacterium* e amostras de campo positivas para *Pectobacterium* spp. como mostrado na Figura 13.

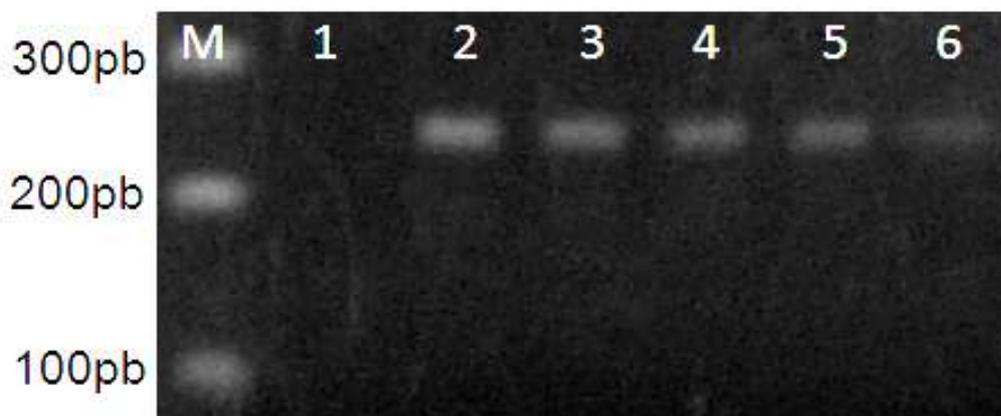


FIGURA 13. Produtos de amplificação das estirpes de referência de *Pectobacterium* spp. M. Marcador de peso molecular 1 Kb DNA plus ladder (Invitrogen); 1. Controle negativo (água deionizada); 2. *Pectobacterium atrosepticum* (Pa 790); 3. *Pectobacterium brasiliensis* (IBSBF 1692); 4. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (IBSBF 791); 5. *Pectobacterium betavasculorum* (IBSBF 787), e 6. Amostra 1027. Porto Alegre, RS, 2009.

Nenhum produto de amplificação foi gerado para *Dickeya* spp. e *R. solanacearum* (Tabela 11), o que indica que os oligos acnAF/R são específicos para *Pectobacterium* spp.

Além disso, os oligonucleotídeos acnAF/R foram analisados *in silico* através da ferramenta BLASTN contra várias sequências depositadas no GenBank, sendo que o *e-value* foi menor para sequências do gene *acnA* de *Pectobacterium* spp. Essas análises mostraram que os oligos são específicos para detecção do gene *acnA* de espécies de *Pectobacterium*.

TABELA 11. Especificidade dos oligonucleotídeos acnAF/R para detecção de *Pectobacterium* spp. por PCR Porto Alegre, RS, 2009.

Estirpes	Origem	Oligos acnAF/R
<b><i>Pectobacterium atrosepticum</i></b>		
Pa 31	Canadá	+
Pa 790 <sup>T</sup>	Reino Unido	+
<b><i>Pectobacterium carotovorum</i></b>		
IBSBF 1442	Brasil	+
IBSBF 791	Dinamarca	+
47	Brasil	+
<b><i>Pectobacterium brasiliensis</i></b>		
IBSBF 1692 (212)	RS, Brasil	+
IBSBF 1697 (213)		+
<b><i>Pectobacterium betavasculorum</i></b>		
IBSBF 787 <sup>T</sup>	EUA	+
<b><i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i></b>		
IBSBF 231 <sup>T</sup>	EUA	-
IBSBF 920	Brasil	-
<b><i>Dickeya dianthicola</i></b>		
IBSBF 856	França	-
<b><i>Dickeya</i> sp.</b>		
CEN80	MG, Brasil	-
<b><i>Ralstonia solanacearum</i></b>		
Biovar 1		
1	RS, Brasil	-
93	SP, Brasil	-
Biovar 2		
126	SP, Brasil	-
R56	RS, Brasil	-

Os oligos acnAF/R foram desenhados com bases degeneradas para amplificar todas as espécies de *Pectobacterium*. A especificidade dos ensaios de qPCR para as espécies *P. atrosepticum*, *P. brasiliensis*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. betavasculorum* foi determinada através das sondas de hidrólise.

Vários ensaios já foram desenhados para a detecção e identificação de fitopatógenos intimamente relacionados filogeneticamente (Bach *et al.*, 2003; Zijlstra & Van Hoof, 2006; Cullen *et al.*, 2007; Arzanlou *et al.*, 2007;

loos et al., 2010) utilizando sondas de hidrólise para diferenciá-los a nível de espécie.

#### **4.4.2.1 *Pectobacterium atrosepticum***

A validação de qPCR para detecção de *P. atrosepticum* foi realizada com a avaliação de parâmetros como especificidade, sensibilidade, precisão, limite de detecção, eficiência de amplificação, coeficiente de correlação da curva-padrão da diluição de DNA e inclinação da curva-padrão (*slope*).

A especificidade do ensaio de qPCR com sonda de hidrólise (TaqMan) para detecção de *P. atrosepticum* foi determinada *in silico* (BLASTN) e *in vitro*, sendo considerado específico para essa espécie (Tabela 12).

TABELA 12. Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores acnAF/R e sondas Pa utilizados em qPCR pelo sistema TaqMan para detecção de *Pectobacterium atrosepticum*. Porto Alegre, RS, 2009.

Estirpes	Origem	Oligos acnAF/R + sonda Pa <sup>a</sup>
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>		
Pa 31	Canadá	+
Pa 790 <sup>T</sup>	Reino Unido	+
<i>Pectobacterium carotovorum</i>		
IBSBF 1442	Brasil	-
IBSBF 791	Dinamarca	-
47	Brasil	-
<i>Pectobacterium brasiliensis</i>		
IBSBF 1692 (212)	RS, Brasil	-
IBSBF 1697 (213)		-
<i>Pectobacterium wasabiae</i>		
IBSBF 807 <sup>T</sup>	Japão	-
<i>Pectobacterium betavasculorum</i>		
IBSBF 787 <sup>T</sup>	EUA	-
<i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i>		
IBSBF 231 <sup>T</sup>	EUA	-
IBSBF 920	Brasil	-
<i>Dickeya dianthicola</i>		
IBSBF 856	França	-
<i>Dickeya</i> sp.		
CEN80	MG, Brasil	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>		
Biovar 1		
1	RS, Brasil	-
93	SP, Brasil	-
Biovar 2		
126	SP, Brasil	-
R56	RS, Brasil	-

<sup>T</sup>Estirpe tipo bacteriana: linhagem de referência em cultura pura com as características de determinada espécie ou subespécie.

<sup>a</sup>+ indica sinal de fluorescência detectado até 32 ciclos ou menos e - indica que nenhum sinal de fluorescência foi detectado após 32 ciclos.

O limite de detecção do ensaio de qPCR para detecção de *P. atrosepticum* foi de 25 células bacterianas detectadas em 10 tubérculos de batata analisados por amostra, que corresponde ao  $C_T$  de 31,5. Amostras foram consideradas positivas até o limite de  $C_T$  de 31,5 e amostras com  $C_T$  maiores do que este limite foram consideradas negativas para a presença de *P. atrosepticum* (Tabela 13). Diluição de DNA padrão abaixo do limite de detecção estabelecido não foi detectado pela técnica de qPCR.

A equação da curva-padrão (curva de calibração)  $y = -3,429 + 13,81$ , com eficiência de reação de 95,7% e  $r^2 = 0,991$  para o gene *acnA* de *P. atrosepticum* foi testado com diluição seriada do DNA variando de  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  a  $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . A curva-padrão mostrou uma correlação linear entre DNA e valores de  $C_T$  (Figura 14).

Tabela 13. Quantidade de DNA dos padrões de *Pectobacterium atrosepticum* empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.

Quantidade DNA (ng/uL)	$C_T$ desvio		n. células/uL	n. células detectadas
	$C_T$ média	padrão		
10	11,38	0,14	2000000	25000000,0
1	13,75	0,3	200000	2500000,0
0,1	16,21	0,11	20000	250000,0
0,01	20,04	0,27	2000	25000,0
0,001	24,25	0,24	200	2500,0
0,0001	27,55	0,32	20	250,0
0,00001	31,51	0,17	2	25,0

A eficiência de amplificação da qPCR para detecção de *P. atrosepticum* foi de 95,7%, com o valor de slope de -3,429. O slope encontra-

se dentro do intervalo aceitável (-3,1~-3,6), com eficiência de 90-110%. O coeficiente de correlação ( $r^2$ ) da curva-padrão foi de 0,991, o que indica que existe relação linear entre o valor de  $C_T$  e a quantidade de DNA dos padrões (Figura 14).

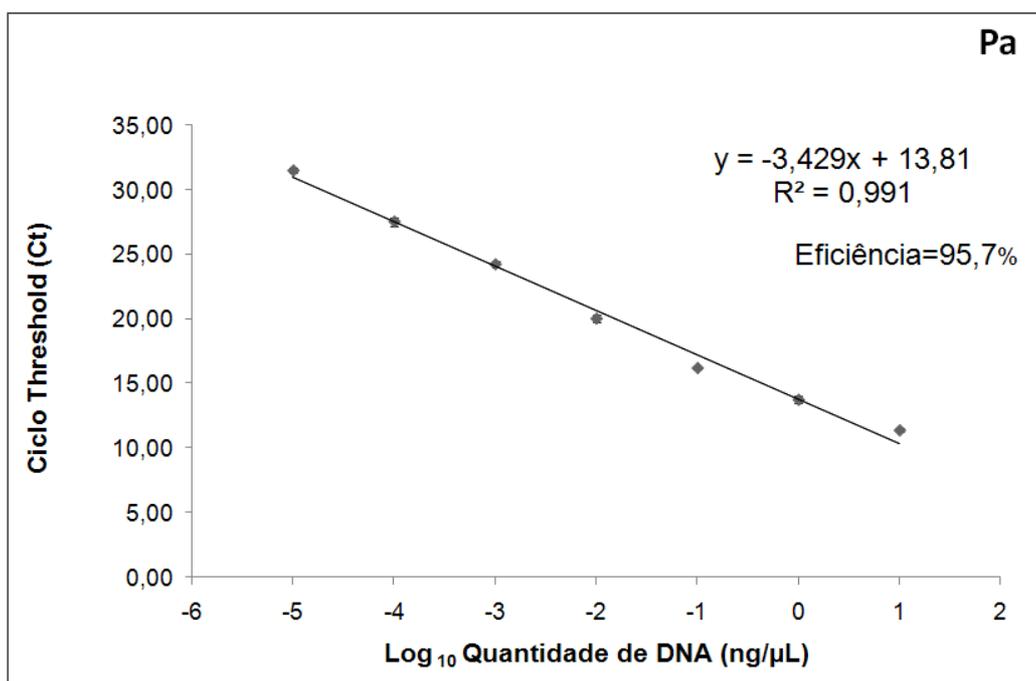


FIGURA 14. Curva de calibração da concentração de DNA ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) de *Pectobacterium atrosepticum* em relação ao ciclo *threshold*. Porto Alegre, RS, 2009.

A precisão do ensaio foi avaliada a partir dos desvios-padrões para cada amostra, na qual foram analisadas três replicatas de reação, na qual os desvios variaram de 0,14 a 0,77 entre os padrões e amostras de campo (Tabelas 13 e 14).

A validação do ensaio de qPCR para detecção foi realizada a partir de teste com as 206 amostras coletadas, na qual somente 19 amostras foram consideradas positivas (Tabela 14). Como relatado anteriormente, nenhuma dessas amostras foram consideradas positivas por PCR, o que mostra que o ensaio baseado em qPCR para detecção de *P. atrosepticum* foi promissor para avaliar infecções latentes dessa espécie. O relato da ocorrência de infecções latentes de *P. atrosepticum* em tubérculos no Brasil tem poucos estudos, e este estudo mostrou que essa espécie está presente em baixa incidência como também relatado por Oliveira *et al.* (2003) e El Tassa & Duarte (2004), porém, estudos devem ser aprofundados para questionar se *P. atrosepticum* é o agente causal da canela-preta, ou são outras espécies que causam a doença no país.

TABELA 14. Detecção de *Pectobacterium atrosepticum* com os oligonucleotídeos acnA e sonda Pa por qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.

Amostra	Média C <sub>T</sub>	Desvio padrão C <sub>T</sub>	nº células	Oligonucleotídeos acnA sonda Pa
1003	30,83	0,43	27,2	+
1004	30,74	0,54	28,8	+
1006	30,65	0,31	30,8	+
1007	30,27	0,60	39,6	+
1008	30,83	0,33	27,2	+
1015	30,62	0,28	31,4	+
1023	23,81	0,20	3034,9	+
1024	30,73	0,44	29,1	+
1025	30,93	0,14	25,5	+
1027	30,57	0,13	32,4	+
1037	25,78	0,76	806,6	+
4598	30,81	0,77	27,6	+

continuação TABELA 14. Detecção de *Pectobacterium atrosepticum* com os oligonucleotídeos acnA e sonda Pa por qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.

4600	30,66	0,40	30,5	+
4601	30,70	0,67	29,6	+
4633	30,62	0,18	31,2	+
4634	30,34	0,33	37,8	+
4638	30,64	0,14	30,8	+
MG-72	27,95	0,19	187,6	+
MG-80	30,08	0,16	45,0	+

#### 4.4.2.2 *Pectobacterium brasiliensis*

A validação de qPCR para detecção de *P. brasiliensis* em tubérculos foi feita pela avaliação de parâmetros como a especificidade e sensibilidade do ensaio, limite de detecção, eficiência de amplificação, coeficiente de amplificação ( $r^2$ ) e *slope* da curva-padrão.

A especificidade do ensaio de qPCR para detecção de *P. brasiliensis* foi avaliada primeiramente *in silico*, através de BLASTN da sonda Pbr, onde menor e-value foram obtidas com sequências dessa espécie. As estirpes de referência foram testadas em qPCR, onde a sonda foi altamente específica para a detecção de *P. brasiliensis*. Não houve amplificação por qPCR com a sonda Pbr das outras espécies de *Pectobacterium*, *Dickeya* spp. e *R. solanacearum* (Tabela 15).

TABELA 15. Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores acnAF/R + sonda Pbr utilizados em qPCR pelo sistema TaqMan para detecção de *Pectobacterium brasiliensis*. Porto Alegre, RS, 2009.

Estirpes	Origem	Oligos acnAF/R + sonda Pbr <sup>a</sup>
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>		
Pa 31	Canadá	-
Pa 790 <sup>T</sup>	Reino Unido	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i>		
IBSBF 1442	Brasil	-
IBSBF 791	Dinamarca	-
47	Brasil	-
<i>Pectobacterium brasiliensis</i>		
IBSBF 1692 (212)	RS, Brasil	+
IBSBF 1697 (213)		+
<i>Pectobacterium wasabiae</i>		
IBSBF 807 <sup>T</sup>	Japão	-
<i>Pectobacterium betavasculorum</i>		
IBSBF 787 <sup>T</sup>	EUA	-
<i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i>		
IBSBF 231 <sup>T</sup>	EUA	-
IBSBF 920	Brasil	-
<i>Dickeya dianthicola</i>		
IBSBF 856	França	-
<i>Dickeya</i> sp.		
CEN80	MG, Brasil	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>		
Biovar 1		
1	RS, Brasil	-
93	SP, Brasil	-
Biovar 2		
126	SP, Brasil	-
R56	RS, Brasil	-

<sup>T</sup>Estirpe tipo bacteriana: linhagem de referência em cultura pura com as características de determinada espécie ou subespécie.

<sup>a</sup>+ indica sinal de fluorescência detectado até 35 ciclos ou menos e - indica que nenhum sinal de fluorescência foi detectado após 35 ciclos.

A curva-padrão de *P. brasiliensis* (gene *acnA*) foi construída com DNA em concentrações que variaram de 100 ng.µL<sup>-1</sup> a 100 fg.µL<sup>-1</sup>(Tabela 16). O limite de detecção do ensaio de qPCR para detecção de *P. brasiliensis* foi de 225 células bacterianas (Tabela 16), com uma eficiência de amplificação de 100%, com um coeficiente de correlação de 0,995 (Figura 15).

Tabela 16. Quantidade de DNA dos padrões de *Pectobacterium brasiliensis* empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.

Quantidade DNA (ng/uL)	C <sub>T</sub>		n. copias/uL	n. células detectadas
	média	desvio padrão		
100	13,85	0,12	22500000,0	225000000,0
10	16,34	0,21	2250000,0	22500000,0
1	19,76	0,33	225000,0	2250000,0
0,1	23,48	0,28	22500,0	225000,0
0,01	27,12	0,13	2250,0	22500,0
0,001	30,24	0,17	225,0	2250,0
0,0001	32,47	0,10	22,5	225,0

Para validar esse ensaio para diagnóstico de doenças causadas por *P. brasiliensis* em amostras de batata, 206 amostras foram submetidas à análises por qPCR através de quantificação absoluta, porém, somente 34 amostras foram positivas para essa espécie (Tabela 17). Dentro desse ensaio foram utilizados tubérculos sem qualquer manifestação de sintomas de podridão-mole.

A eficiência de amplificação de 100% mostrou que o ensaio para detecção de *P. brasiliensis* através de qPCR pelo sistema de quantificação absoluta com sondas de hidrólise é específico e sensível em amostras de

tubérculos sem manifestação de sintomas. O *slope* ou inclinação da curva apresentou-se dentro do limite adequado na qual a eficiência calculada foi de 100%, onde a cada ciclo de PCR, ocorre duplicação da amostra de DNA. O limite de detecção do ensaio foi de 225 células bacterianas detectadas em 10 tubérculos coletados por amostra, que corresponde a  $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de DNA, sendo que nas amostras de campo foram encontradas desde 252 células a  $3,7 \times 10^8$  células. A precisão do ensaio foi avaliada pelos desvios-padrões, ao qual variaram de 0,10 até 3,72 (Tabelas 16 e 17) entre os padrões e amostras de campo.

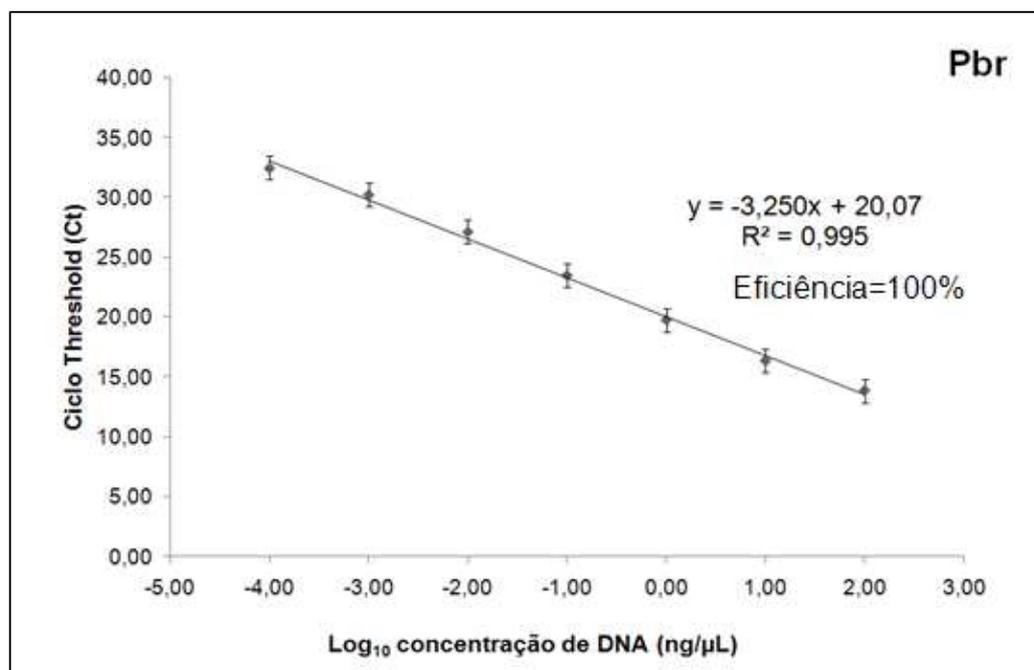


FIGURA 15. Curva de calibração da concentração de DNA ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) de *Pectobacterium brasiliensis* em relação ao ciclo *threshold*. Porto Alegre, RS, 2009.

Com isso, das 206 amostras de tubérculos coletadas somente 34 amostras foram consideradas positivas para *P. brasiliensis*, o que corresponde a 16,5% de incidência dessa bactéria (Figura 20). A incidência de *P. brasiliensis* nos tubérculos sem manifestação dos sintomas já havia sido relatada por El Tassa & Duarte (2004), na qual foram identificados 113 isolados em lavouras do estado do Rio Grande do Sul. No presente trabalho não foram realizados isolamentos, porém, a presença da bactéria em baixos níveis populacionais nos tubérculos foi demonstrada.

A ocorrência de *P. brasiliensis* em outros países como Israel, EUA (Ma *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009) e no sul da África (Van Der Merwe *et al.*, 2010) é um indicativo de que pode estar ocorrendo a disseminação dessa espécie pelo mundo em tubérculos-semente ou ainda em outros hospedeiros sob a forma de infecções latentes. Essa técnica mostrou sensibilidade e especificidade para a detecção dessa espécie em populações baixas nos tecidos, podendo auxiliar em programas de certificação de tubérculos-semente, estudos de epidemiologia e inspeção quarentenária desse patógeno no Brasil e no mundo.

Em outros estudos foi verificado também maior incidência de *P. brasiliensis* em relação às outras espécies de pectobactérias (El Tassa & Duarte, 2004; Ribas, 2007).

TABELA 17. Detecção de *Pectobacterium brasiliensis* por qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores acnA e sonda Pbr Porto Alegre, RS, 2009.

Amostra	Média Ct	Desvio padrão Ct	nº células	Oligonucleotídeos acnA e sonda Pbr
1004	27,30	2,37	13431,0	+
1007	27,71	2,93	10016,4	+
1008	31,74	0,87	577,6	+
1013	26,63	1,47	21521,4	+
1015	27,70	0,32	10086,1	+
1023	21,54	0,15	791792,5	+
1024	29,75	0,51	2367,4	+
1027	29,56	0,14	2700,9	+
1029	29,84	0,29	2221,5	+
1038	32,11	0,12	443,9	+
1041	25,30	0,10	55512,9	+
3766	29,80	3,30	2274,1	+
4633	32,11	0,12	443,9	+
4636	25,30	0,10	55512,9	+
6257	16,54	0,25	27372380,6	+
6258	30,49	0,12	1403,8	+
BOS1	31,11	0,23	902,0	+
MG-77	28,97	0,13	4116,0	+
MG-81	27,43	0,26	12226,0	+
MG-82	24,25	0,80	116294,2	+
MG-83	23,66	0,14	176737,3	+
MG-84	18,18	0,34	8556403,5	+
MG-86	17,34	3,72	15605027,0	+
MG-87	32,50	0,23	337,3	+
MG-88	32,75	0,31	283,2	+
MG-91	12,85	0,15	374739855,9	+
MG-92	21,05	0,12	1123842,2	+
MG-93	23,70	2,73	172349,8	+
MG-95	30,18	0,53	1744,1	+
MG-96	31,11	3,02	905,2	+
MG-97	17,93	0,62	10241524,5	+
MG-99	20,91	0,22	1242318,0	+
MG-104	24,84	0,25	76905,8	+
SC4	32,91	0,66	252,2	+

#### 4.4.2.3 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

O ensaio para detecção de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* com os oligos acnAF/R e a sonda Pcc utilizou o sistema de quantificação absoluta com construção de uma curva-padrão com o DNA padrão diluído.

Os padrões de DNA apresentavam-se a uma concentração de 100 ng. $\mu\text{L}^{-1}$  até 10 fg. $\mu\text{L}^{-1}$  (Tabela 18). Essa concentração de DNA corresponde à  $2,25 \times 10^7$  a 2 células bacterianas, que correspondem ao  $C_T$  de  $8,84 \pm 0,08$  e  $30,62 \pm 0,26$ , respectivamente.

A especificidade do ensaio para detecção de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foi determinada *in vitro* através da qPCR com os oligos acnAF/R e sonda e *in silico* através da ferramenta BLASTN, na qual foram testadas contra várias sequências depositadas no GenBank.

O ensaio de qPCR de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foi específico, uma vez que detectou somente as estirpes dessa espécie (Tabela 18). Não foi verificada amplificação para outras espécies de *Pectobacterium*, *Dickeya* sp. e *R. solanacearum* (Tabela 18). Através do BLASTN, obteve-se menor *e-value* com sequências do gene *acnA* de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, o que indica que a sonda é específica para detectar a presença dessa espécie em amostras.

TABELA 18. Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores acnAF/R e sonda Pcc utilizados em qPCR pelo sistema TaqMan para detecção de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Porto Alegre, RS, 2009.

Estirpes	Origem	Oligos acnAF/R + sonda Pcc <sup>a</sup>
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>		
Pa 31	Canadá	-
Pa 790 <sup>T</sup>	Reino Unido	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i>		
IBSBF 1442	Brasil	+
IBSBF 791	Dinamarca	+
47	Brasil	+
<i>Pectobacterium brasiliensis</i>		
IBSBF 1692 (212)	RS, Brasil	-
IBSBF 1697 (213)		-
<i>Pectobacterium wasabiae</i>		
IBSBF 807 <sup>T</sup>	Japão	-
<i>Pectobacterium betavasculorum</i>		
IBSBF 787 <sup>T</sup>	EUA	-
<i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i>		
IBSBF 231 <sup>T</sup>	EUA	-
IBSBF 920	Brasil	-
<i>Dickeya dianthicola</i>		
IBSBF 856	França	-
<i>Dickeya</i> sp.		
CEN80	MG, Brasil	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>		
Biovar 1		
1	RS, Brasil	-
93	SP, Brasil	-
Biovar 2		
126	SP, Brasil	-
R56	RS, Brasil	-

<sup>T</sup>Estirpe tipo bacteriana: linhagem de referência em cultura pura com as características de determinada espécie ou subespécie.

<sup>a</sup>+ indica sinal de fluorescência detectado até 31 ciclos ou menos e - indica que nenhum sinal de fluorescência foi detectado após 31 ciclos.

A sensibilidade do ensaio baseada no limite de detecção do fragmento do gene *acnA* para *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foi de 28,1 células

detectadas (Tabela 19), na qual corresponde à concentração limite de 2,3 células bacterianas. $\mu\text{L}^{-1}$  (10 fg DNA.  $\mu\text{L}^{-1}$ ). As amostras de campo apresentaram desde 106 até aproximadamente 36.000 células detectadas nos tubérculos (Tabela 20).

Tabela 19. Quantidade de DNA dos padrões de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.

Quantidade DNA (ng/uL)	$C_T$ desvio		n. células/uL	n. células detectadas
	$C_T$ média	padrão		
100	8,84	0,08	22500000,0	281250000,0
10	12,13	0,14	2250000,0	28125000,0
1	14,79	0,09	225000,0	2812500,0
0,1	17,88	0,31	22500,0	281250,0
0,01	22,23	0,23	2250,0	28125,0
0,001	25,77	0,41	225,0	2812,5
0,0001	28,00	0,23	22,5	281,3
0,00001	30,62	0,26	2,3	28,1

A eficiência de amplificação da qPCR com a sonda Pcc e oligonucleotídeos acnAF/R foi de 100%, o que demonstra que além da especificidade dos oligos para a espécie, a detecção de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* também foi sensível. O *slope* ou inclinação da curva-padrão foi de -3,202, ao qual é considerada o padrão ideal onde a eficiência de amplificação é máxima como mostrado na Figura 16. A precisão dos dados foi determinada pelo desvio-padrão dos valores de  $C_T$  entre as amostras na qual variou de 0,08 (DNA padrão) até 0,83 (amostras de campo) como mostrado nas Tabelas 19 e 20.

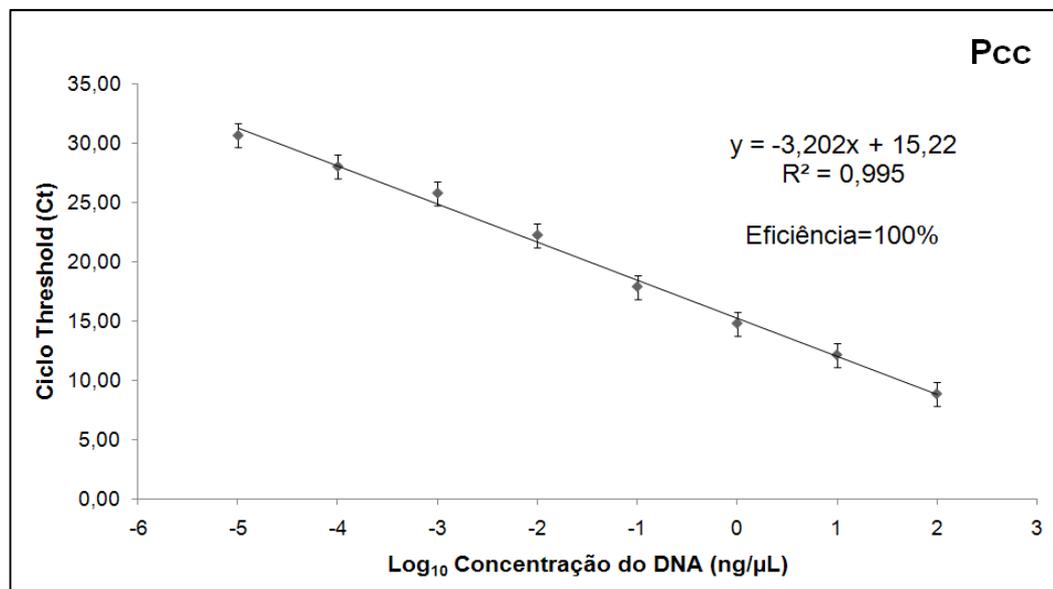


FIGURA 16. Curva de calibração da concentração de DNA ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* em relação ao ciclo *threshold*. Porto Alegre, RS, 2009.

A validação do ensaio de qPCR para o uso em diagnóstico de doenças causadas por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foi feita com 206 amostras coletadas de tubérculos. De 206 amostras coletadas, apenas 13 foram consideradas positivas para a presença dessa espécie, o que corresponde a 6,3% incidência nos tubérculos (Tabela 20 e Figura 20).

TABELA 20. Detecção de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* por qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores acnA e a sonda Pcc. Porto Alegre, RS, 2009.

Amostra	Média C <sub>T</sub>	Desvio padrão C <sub>T</sub>	nº células	Oligos acnA e sonda Pcc
1001	14,55	0,21	4544515,2	+
1023	29,35	0,53	108,6	+
1037	28,03	0,10	279,9	+
SC1	22,04	0,29	20798,5	+
SC3	23,72	0,41	6249,1	+
SC7	22,04	0,46	20926,4	+
IBI1	24,82	0,56	2821,0	+
IBI2	21,79	0,71	24898,5	+
IBI3	24,29	0,33	4129,4	+
IBI4	21,46	0,48	31711,1	+
IBI5	21,27	0,22	36157,6	+
IBI6	27,37	0,83	452,7	+
IBI7	22,28	0,68	17575,1	+

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* foi recentemente relatada causando canela-preta em regiões de clima temperado na Europa (Haan *et al.*, 2008). No presente trabalho, verificou-se a ocorrência de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* nos estados da região sul, na qual apresentam temperaturas mais amenas na época de cultivo da batata.

Em outros países, *P. carotovorum* tem sido considerada um risco para lavouras de batata, mostrando a importância dessa espécie (Haan *et al.*, 2008; Czajkowski *et al.*, 2009). Até o momento, nenhum ensaio foi desenvolvido para detecção de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* utilizando qPCR. Essa espécie também pode causar canela-preta em batata, dependendo mais precisamente do clima com temperaturas amenas na

época de cultivo. Então, o uso desta técnica é justificável para detecção de baixos níveis populacionais dessa espécie em programas de certificação de tubérculos-semente e em levantamentos epidemiológicos.

#### **4.4.2.4 *Pectobacterium betavasculorum***

O ensaio de qPCR com sondas de hidrólise foi desenvolvido para detecção de *P. betavasculorum*, com a construção da curva-padrão com os padrões de DNA com concentrações conhecidas, que variaram de 125 ng.µL<sup>-1</sup> a 12,5 fg.µL<sup>-1</sup> (Tablea 22).

A especificidade do ensaio de qPCR com a sonda Pbet e oligos acnAF/R foi determinada *in vitro* e *in silico*. Os oligos acnAF/R e sonda Pbet detectou somente a estirpe de *P. betavasculorum* presente na Tabela 20. Com relação à especificidade do ensaio, não houve amplificação de nenhuma das outras espécies relatadas no presente estudo.

Dentre as sequências do gene *acnA* depositadas no GenBank, a sonda Pbet apresentou homologia de 100% com sequências de estirpes de *P. betavasculorum* (< *e-value*).

TABELA 21. Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores acnAF/R e sonda Pbet utilizados em qPCR pelo sistema TaqMan para detecção de *Pectobacterium betavasculorum*. Porto Alegre, RS, 2009.

Estirpes	Origem	Oligos acnAF/R + sonda Pcc <sup>a</sup>
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>		
Pa 31	Canadá	-
Pa 790 <sup>T</sup>	Reino Unido	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i>		
IBSBF 1442	Brasil	-
IBSBF 791	Dinamarca	-
47	Brasil	-
<i>Pectobacterium brasiliensis</i>		
IBSBF 1692 (212)	RS, Brasil	-
IBSBF 1697 (213)		-
<i>Pectobacterium wasabiae</i>		
IBSBF 807 <sup>T</sup>	Japão	-
<i>Pectobacterium betavasculorum</i>		
IBSBF 787 <sup>T</sup>	EUA	+
<i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i>		
IBSBF 231 <sup>T</sup>	EUA	-
IBSBF 920	Brasil	-
<i>Dickeya dianthicola</i>		
IBSBF 856	França	-
<i>Dickeya</i> sp.		
CEN80	MG, Brasil	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>		
Biovar 1		
1	RS, Brasil	-
93	SP, Brasil	-
Biovar 2		
126	SP, Brasil	-
R56	RS, Brasil	-

<sup>T</sup>Estirpe tipo bacteriana: linhagem de referência em cultura pura com as características de determinada espécie ou subespécie.

<sup>a</sup>+ indica sinal de fluorescência detectado até 34 ciclos ou menos e - indica que nenhum sinal de fluorescência foi detectado após 34 ciclos.

A sensibilidade do ensaio de qPCR para detecção de *P. betavasculorum* foi de 35,2 células detectadas (limite de detecção) como

mostrada na Tabela 22, o que equivale a concentração de 2,8 células. $\mu\text{L}^{-1}$  (10 fg DNA. $\mu\text{L}^{-1}$ ).

TABELA 22. Quantidade de DNA dos padrões de *Pectobacterium betavasculatorum* empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.

Quantidade DNA (ng/uL)	$C_T$		n. copias/uL	n. células detectadas
	média	desvio padrão		
125	8,47	0,20	28125000,0	351562500,0
12,5	12,68	0,28	2812500,0	35156250,0
1,25	15,58	0,31	281250,0	3515625,0
0,125	18,53	0,39	28125,0	351562,5
0,0125	21,66	0,27	2812,5	35156,3
0,00125	25,44	0,50	281,3	3515,6
0,000125	29,45	0,52	28,1	351,6
0,0000125	33,53	0,48	2,8	35,2

A eficiência de amplificação do ensaio de qPCR para detecção de *P. betavasculatorum* foi de 94%, com slope de -3,475, que se encontram dentro do limite tolerável de eficiência (90-110%). O coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,996 mostra que existe correlação linear entre o valor de  $C_T$  e a concentração de DNA (Figura 17).

Até o momento, nenhum ensaio baseado em qPCR e PCR foi desenvolvido para detecção de *P. betavasculatorum*, mostrando que essa técnica pode ser utilizada para detecção desta espécie em batata e em outros hospedeiros.

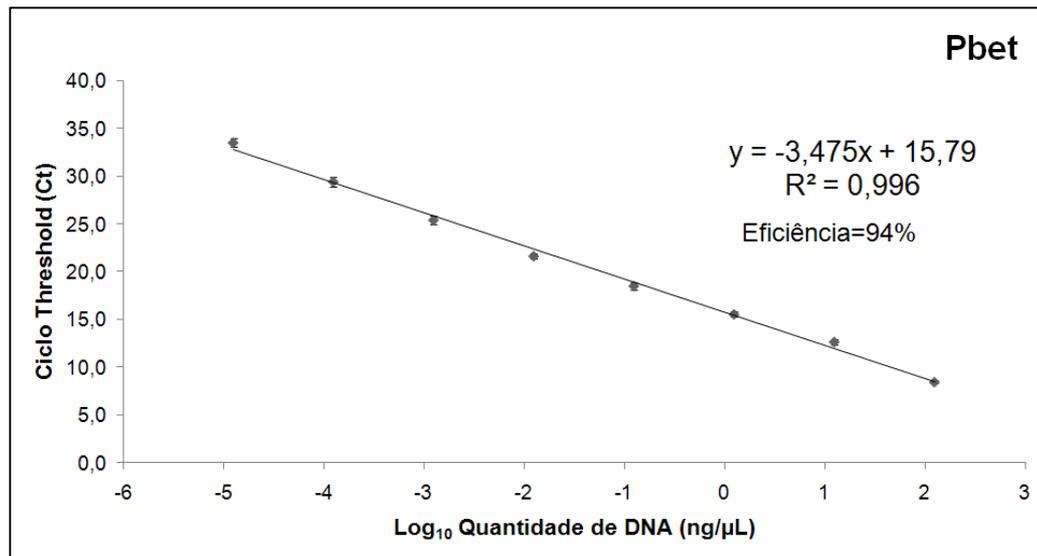


FIGURA 17. Curva de calibração da concentração de DNA ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) de *Pectobacterium betavascularum* em relação ao ciclo threshold. Porto Alegre, RS, 2009.

Das 206 amostras coletadas, apenas quatro amostras foram consideradas como positivas para a presença de *P. betavascularum*. No Brasil, *P. betavascularum* não havia sido identificada em batata. No entanto, como verificado por Pitman *et al.* (2010) outras espécies de *Pectobacterium* podem estar associadas com a podridão-mole ou canela-preta em batata.

TABELA 23. Detecção de *Pectobacterium betavasculorum* por qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores acnAF/R e a sonda Pbet. Porto Alegre, RS, 2009.

Amostra	Média C <sub>T</sub>	Desvio padrão C <sub>T</sub>	nº células	Oligos acnA e sonda Pbet
1004	32,16	0,17	54,81	+
1007	32,10	0,36	56,85	+
1023	26,25	0,13	2754,42	+
1037	25,33	0,31	5067,37	+

Essa bactéria foi primeriramente relatada em beterraba (*Beta vulgaris*), causando necrose vascular e podridão mole (Thomson *et al.*, 1977). O presente trabalho é o primeiro que relata a presença de *P. betavasculorum* em tubérculos de batata, o que mostra que essa espécie também pode estar associada à surtos de canela-preta ou podridão-mole na cultura da batata.

#### 4.4.3 *Ralstonia solanacearum*

Os oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2 já havia sido relatada para detecção de *R. solanacearum* em PCR em diversos estudos (Seal *et al.*, 1999; Silveira *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2007; Figueiró, 2008), porém, até o momento não havia sido testado para a detecção por qPCR pelo método de SYBR Green. No presente estudo, esse par de oligonucleotídeos iniciadores foi testado em qPCR, devido apresentar um tamanho de produto de amplificação (288 pb) passível de ser utilizado pelo método de SYBR Green.

A especificidade dos oligos OLI1/Y2 foi avaliada *in vitro* e *in silico*. Esses oligos foram testados em qPCR e PCR, onde foram verificados que somente as estirpes de referência de *R. solanacearum* produziram um fragmento de 288 pb, que correspondia ao pico esperado em qPCR com uma  $T_m$  de 89,86 °C (Figura 18).

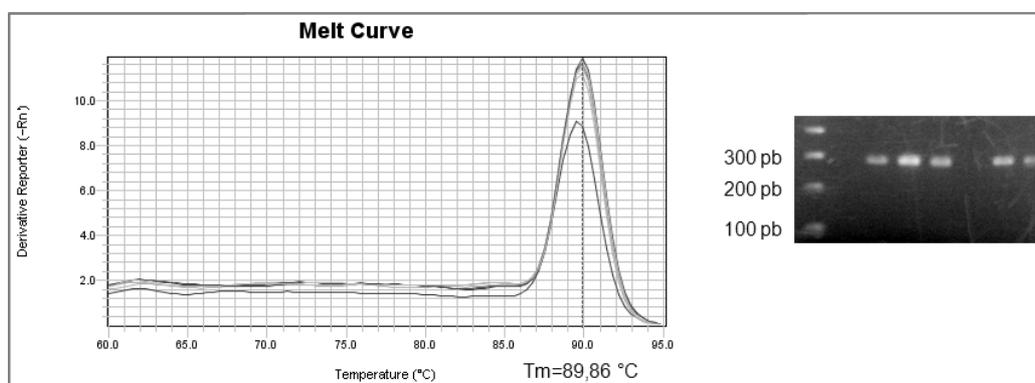


FIGURA 18. Temperatura de desnaturação na curva de dissociação e perfil eletroforético de *Ralstonia solanacearum*. Tamanho do fragmento: 208 pb. Porto Alegre, RS, 2009.

Os oligos OLI1/Y2 detectaram todas as estirpes de referência de *R. solanacearum* (Tabela 24) por PCR e qPCR. Nenhum produto de amplificação foi gerado com os oligos para *Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp.

TABELA 24. Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2 utilizados em qPCR pelo sistema SYBR Green I para detecção de *Ralstonia solanacearum*. Porto Alegre, RS, 2009.

Estirpes	Origem	Oligos OLI1/Y2 <sup>a</sup>
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>		
Pa 31	Canadá	-
Pa 790 <sup>T</sup>	Reino Unido	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i>		
IBSBF 1442	Brasil	-
IBSBF 791	Dinamarca	-
47	Brasil	-
<i>Pectobacterium brasiliensis</i>		
IBSBF 1692 (212)	RS, Brasil	-
IBSBF 1697 (213)		-
<i>Pectobacterium wasabiae</i>		
IBSBF 807 <sup>T</sup>	Japão	-
<i>Pectobacterium betavasculorum</i>		
IBSBF 787 <sup>T</sup>	EUA	-
<i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i>		
IBSBF 231 <sup>T</sup>	EUA	-
IBSBF 920	Brasil	-
<i>Dickeya dianthicola</i>		
IBSBF 856	França	-
<i>Dickeya</i> sp.		
CEN80	MG, Brasil	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>		
Biovar 1		
1	RS, Brasil	+
93	SP, Brasil	+
Biovar 2		
126	SP, Brasil	+
R56	RS, Brasil	+

<sup>T</sup> Estirpe tipo bacteriana: linhagem de referência em cultura pura com as características de determinada espécie ou subespécie.

<sup>a</sup>+ indica sinal de fluorescência detectado até 26 ciclos ou menos e - indica que nenhum sinal de fluorescência foi detectado após 26 ciclos.

A sensibilidade do ensaio de qPCR (limite de detecção) para detecção de *R. solanacearum* foi de aproximadamente 22 células bacterianas detectadas por amostra (10 tubérculos). A sensibilidade foi testada com padrões de DNA diluídos e testados em qPCR, onde foram utilizadas as concentrações de 100 ng.µL<sup>-1</sup> até 10 fg. µL<sup>-1</sup>, com valores de C<sub>T</sub> que variaram de 6,10 ± 0,53 até 26,03 ± 0,42, respectivamente (Tabela 25).

TABELA 25. Quantidade de DNA dos padrões de *Ralstonia solanacearum* empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2009.

Quantidade DNA (ng/uL)	C <sub>T</sub> desvio		n. células/uL	n. células detectadas
	C <sub>T</sub> média	padrão		
100	6,10	0,53	17500000,0	218750000,0
10	8,69	0,09	1750000,0	21875000,0
1	11,83	0,05	175000,0	2187500,0
0,1	15,05	0,38	17500,0	218750,0
0,01	18,33	0,17	1750,0	21875,0
0,001	21,46	0,11	175,0	2187,5
0,0001	24,59	0,22	17,5	218,8
0,00001	26,03	0,42	1,75	21,9

A eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2 foi de 100%, com limite de detecção de aproximadamente de 21,9 células detectadas em qPCR (Figura 19, Tabela 25), com *slope* de -3,297. O coeficiente de correlação de 0,998 mostra que existe correlação linear entre os valores de C<sub>T</sub> e a concentração de DNA. A precisão do ensaio foi determinada pelo desvio-padrão variaram desde 0,05 (DNA padrão) até 0,84 (amostras de campo) como mostrado na Tabela 26.

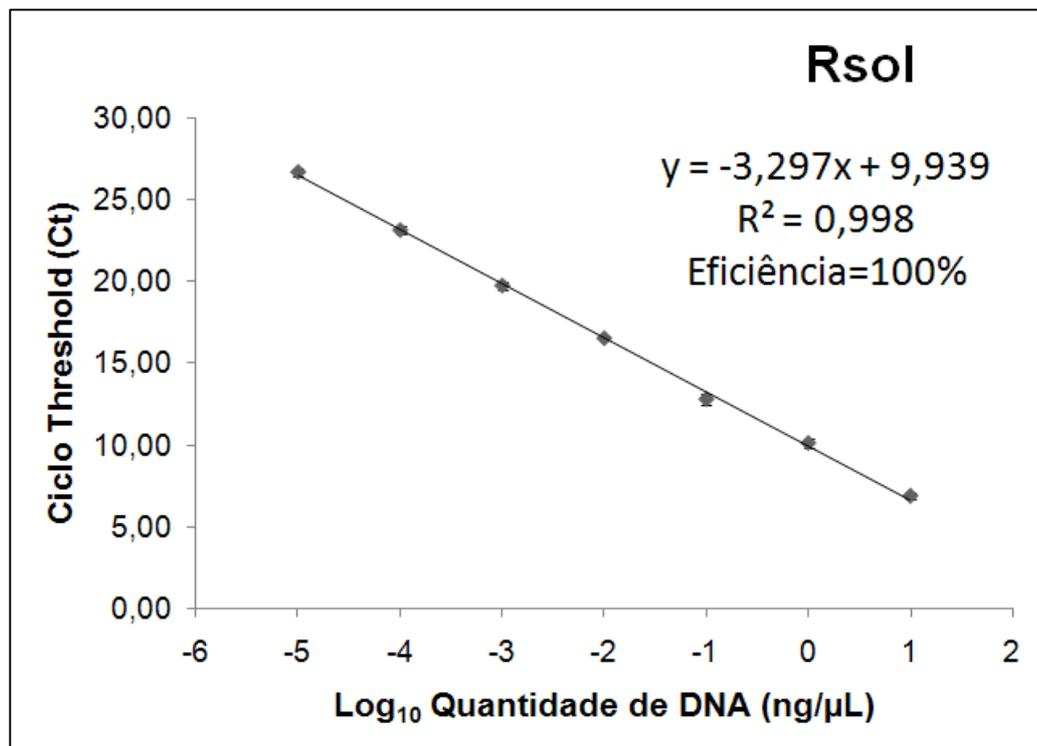


FIGURA 19. Curva de calibração da concentração de DNA ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) de *Ralstonia solanacearum* em relação ao ciclo *threshold*. Porto Alegre, RS, 2009.

O ensaio de qPCR pelo sistema SYBR Green com os oligos OLI1/Y2 para detecção de *R. solanacearum* foi validado com análises de 206 amostras de tubérculos coletadas ao longo dos anos de 2007 até 2009. De 206 amostras analisadas, 108 amostras foram consideradas positivas para a presença de *R. solanacearum*. A PCR convencional considerou como positivas somente nove amostras. O ensaio de qPCR pelo sistema SYBR Green para *R. solanacearum* mostrou-se eficaz para detecção de infecções latentes nos tubérculos, na qual foram detectadas até 22,6 células detectadas.

TABELA 26. Detecção de *Ralstonia solanacearum* por qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2 pelo sistema SYBR Green. Porto Alegre, RS, 2009.

Amostra	Média Ct	Desvio padrão Ct	nº células	Oligos OLI1/Y2
3764	26,38	0,21	34,5	+
3766	26,61	0,37	29,0	+
4598	26,69	0,27	27,2	+
4599	26,22	0,22	39,0	+
4600	26,62	0,36	28,6	+
4601	26,12	0,33	42,0	+
4632	26,24	0,16	38,4	+
4633	26,17	0,24	40,6	+
4634	26,78	0,84	25,3	+
4635	26,89	0,70	23,3	+
4636	26,19	0,26	39,9	+
5897	24,82	0,10	114,2	+
5898	25,45	0,27	70,7	+
5899	25,36	0,26	75,5	+
6255	26,90	0,24	23,2	+
6256	26,38	0,31	34,5	+
6257	26,43	0,29	33,2	+
6258	26,58	0,28	29,6	+
MG-101	26,79	0,61	25,1	+
MG-102	26,70	0,13	27,0	+
MG-103	26,83	0,16	24,3	+
MG-104	26,92	0,44	22,7	+
MG-12	26,77	1,16	25,6	+
MG-13	26,36	0,24	35,1	+
MG-14	26,55	0,65	30,2	+
MG-15	26,67	0,46	27,6	+
MG-16	26,81	0,42	24,7	+
MG-17	26,87	0,19	23,7	+
MG-18	26,29	0,75	37,1	+
MG-19	26,55	0,15	30,2	+
MG-20	26,79	0,15	25,2	+
MG-21	26,21	0,09	39,3	+
MG-22	26,36	0,45	35,0	+
MG-23	26,71	0,28	26,6	+
MG-24	26,64	0,23	28,2	+

continuação TABELA 26. Detecção de *Ralstonia solanacearum* por qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2. Porto Alegre, RS, 2009.

MG-25	26,62	0,17	28,5	+
MG-26	26,67	0,08	27,6	+
MG-27	26,63	0,16	28,4	+
MG-28	26,74	0,02	26,1	+
MG-29	26,69	0,18	27,0	+
MG-30	26,40	0,38	34,0	+
MG-31	26,43	0,44	33,2	+
MG-32	26,67	0,38	27,5	+
MG-33	21,16	0,16	1916,9	+
MG-34	26,57	0,13	29,7	+
MG-35	26,80	0,06	25,0	+
MG-36	26,40	0,84	34,0	+
MG-37	26,90	0,36	23,1	+
MG-38	26,81	0,11	24,8	+
MG-39	26,89	0,42	23,3	+
MG-40	26,31	0,32	36,3	+
MG-41	26,79	0,12	25,1	+
MG-42	26,34	0,15	35,4	+
MG-43	25,91	0,55	49,7	+
MG-44	26,67	0,03	27,6	+
MG-45	26,00	0,26	46,3	+
MG-46	26,34	0,10	35,6	+
MG-47	26,39	0,01	34,2	+
MG-48	26,13	0,29	41,6	+
MG-49	26,29	0,08	36,9	+
MG-50	25,91	0,44	49,5	+
MG-51	25,91	0,20	49,3	+
MG-52	26,10	0,19	42,8	+
MG-53	25,83	0,41	52,5	+
MG-54	25,63	0,53	61,6	+
MG-55	25,84	0,32	52,1	+
MG-56	26,18	0,14	40,1	+
MG-57	25,98	0,07	46,8	+
MG-58	26,16	0,14	40,8	+
MG-59	25,94	0,08	48,5	+
MG-60	26,18	0,24	40,2	+
MG-61	26,31	0,40	36,3	+

continuação TABELA 26. Detecção de *Ralstonia solanacearum* por qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2. Porto Alegre, RS, 2009.

MG-62	26,07	0,05	43,7	+
MG-63	26,02	0,13	45,4	+
MG-69	25,29	0,50	80,0	+
MG-71	25,45	0,45	70,4	+
MG-72	25,19	0,11	86,0	+
MG-73	25,03	0,35	97,8	+
MG-74	24,88	0,22	109,5	+
MG-76	26,93	0,65	22,6	+
MG-77	26,53	0,26	30,7	+
MG-78	26,88	0,62	23,5	+
MG-79	26,62	0,14	28,6	+
MG-80	26,80	0,39	24,9	+
MG-81	26,86	0,25	23,8	+
MG-83	25,56	0,23	65,0	+
MG-84	25,47	0,42	69,6	+
MG-85	25,58	0,08	63,8	+
MG-86	25,47	0,39	69,2	+
MG-87	25,67	0,16	59,3	+
MG-88	25,45	0,23	70,3	+
MG-89	25,60	0,40	62,6	+
MG-90	25,65	0,17	60,5	+
MG-91	25,56	0,14	64,6	+
MG-92	25,13	0,08	90,1	+
MG-93	24,90	0,12	107,5	+
MG-94	23,56	0,05	161,6	+
MG-95	25,54	0,33	65,9	+
MG-96	25,79	0,15	54,1	+
MG-97	26,54	0,26	30,5	+
SC1	20,50	0,22	3191,5	+
SC2	20,85	0,15	2438,9	+
SC3	19,64	0,21	6209,3	+
SC4	21,45	0,12	1535,1	+
SC5	21,15	0,39	1932,3	+
SC6	21,34	0,11	1666,5	+
SC7	19,52	0,09	6782,1	+
SC8	20,61	0,09	2933,8	+

A metodologia de qPCR já vem sendo amplamente utilizada para detecção de *R. solanacearum* com o uso de SYBR Green e sondas de hidrólise (Weller *et al.*, 2000; Ozakman & Schaad, 2003; Swanson *et al.*, 2007; Kubota *et al.*, 2008; Smith & De Boer, 2008; Vincelli & Tisserat, 2008; Albuquerque *et al.*, 2009; Norman *et al.*, 2009; Nouri *et al.*, 2009; Toukam *et al.*, 2009; Wicker *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). Em ensaio recente, Chen *et al.* (2010) também utilizou o sistema SYBR Green para detecção de *R. solanacearum* em amostras de plantas e solo com oligonucleotídeos específicos para o gene que codifica uma UDP-3 O-acil-GlcNAc desacetilase. O limite de detecção encontrado pelos autores foi de  $10^2$  UFC/g haste de tomateiro e de solo hortícola. Isso mostra que o ensaio desenvolvido com os oligos OLI1 e Y2 foi mais sensível para detecção em amostras de tubérculos de batata. A alta sensibilidade e especificidade do ensaio de qPCR para detecção de *R. solanacearum* com esse par de oligos mostrou-se ser uma ferramenta usual para detecção e quantificação dessa espécie bacteriana em diagnósticos precisos.

O uso de um par de oligonucleotídeos iniciadores universal em qPCR para avaliar inicialmente a presença dessa bactéria em infecções latentes nunca foi testado e pode ser promissor para o diagnóstico. Além disso, como existe uma variabilidade muito grande entre as estirpes de *R. solanacearum*, o desenho de oligonucleotídeos iniciadores baseando-se em genes *housekeeping* no lugar do DNA ribossomal 16S, 23S e regiões intergênicas

que separam os mesmos pode auxiliar no desenvolvimento da identificação das estirpes através de HRM (dissociação de alta resolução).

A elevada incidência de *R. solanacearum* em tubérculos-semente corrobora com trabalhos anteriores no Brasil (Maciel *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2002; Siveira *et al.*, 2007). A presença de *R. solanacearum* nos tubérculos mostra que essa espécie bacteriana é um patógeno importante para a cultura, visto que em alguns países é considerada como uma praga quarentenária A1, e que ainda vêm sendo disseminada através dos tubérculos-semente, sendo essa considerada a principal forma de disseminação dessa espécie bacteriana. O presente trabalho mostrou que infecções latentes causadas por *R. solanacearum* vem ocorrendo, visto que baixos níveis populacionais estavam presentes nos tubérculos sem a presença dos sintomas nos mesmos.

#### **4.5 Avaliação da diversidade populacional de bactérias fitopatogênicas encontradas nos tubérculos**

As análises de perfis populacionais das bactérias-alvo presentes, obtidos dos dados da qPCR, em 206 amostras de tubérculos mostraram a predominância de *Dickeya* sp. (54,9%) e *R. solanacearum* (52,9%), seguidas *P. brasiliensis* (16,5%), *P. atrosepticum* (9,2%), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (6,3%) e *P. betavasculorum* (1,9%) (Figura 20).

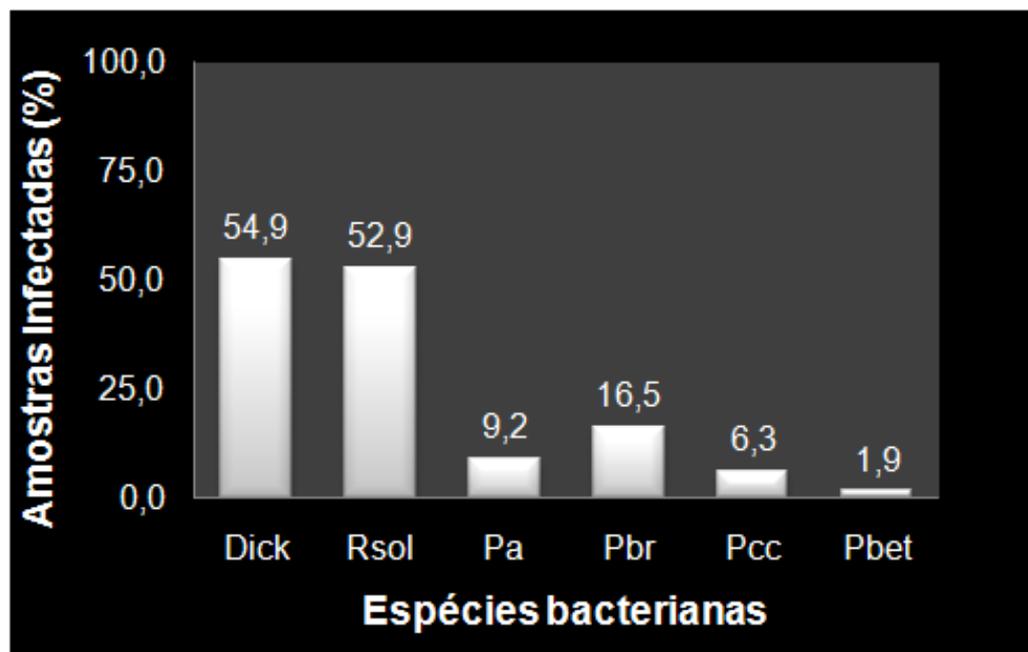


FIGURA 20. Amostras infectadas (%) pelas espécies *Dickeya* sp. (Dick), *Ralstonia solanacearum* (Rsol), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) e *Pectobacterium betavascularum* (Pbet). Porto Alegre, RS, 2009.

A distribuição populacional encontrada nas 206 amostras coletadas mostra ainda que somente 12,6% das amostras não apresentavam nenhuma das espécies bacterianas, e que aproximadamente 87,4% das amostras encontravam-se infectadas com pelo menos uma das espécies (Apêndice 1).

*Dickeya* spp. estava presente em 54,9% das amostras coletadas, sendo que 20,8% das amostras apresentavam somente essa espécie (Figuras 20 e 21). No entanto, associações com essa espécie foram detectadas em 1,9% (*Dickeya* sp., *P. brasiliensis* e *R. solanacearum*), 1,5% (*Dickeya* sp. e *P. atrosepticum*; *Dickeya* sp., *P. brasiliensis* e *P.*

*atrosepticum*), 1,0% (*Dickeya* sp., *P. atrosepticum*, *P. brasiliensis* e *P. betavasculorum*) e em 0,5% (*Dickeya* sp., *P. atrosepticum* e *R. solanacearum*; *Dickeya* sp., *P. atrosepticum*, *P. brasiliensis*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. betavasculorum*; *Dickeya* sp., *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. betavasculorum*; *Dickeya* sp. e *P. brasiliensis*; e *Dickeya* sp., *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *R. solanacearum*) das amostras.

*Ralstonia solanacearum* esteve presente em 52,9% das amostras coletadas (Figuras 20 e 21). No entanto, apenas 13,4% das amostras encontravam-se infectadas somente com essa espécie (Apêndice 1). O restante das amostras infectadas com *R. solanacearum* sempre foi associada a alguma outra espécie, com maiores percentuais de *R. solanacearum* e *Dickeya* sp. (24,8%); *R. solanacearum* e *P. brasiliensis* (7,3%), *R. solanacearum* e *P. atrosepticum* (2,4%), *Dickeya* spp. mais *P. brasiliensis* e *R. solanacearum* (1,9%). O restante das amostras apresentaram associações com menor frequência (1,0 e 0,5%).

Tubérculos-semente podem estar entrando no país com infecções latentes causadas pelas espécies relatadas no estudo, visto que maiores incidências ocorreram com essas espécies bacterianas. Chile, Bolívia e Holanda são grandes exportadores de tubérculos-semente para o Brasil, onde somente em 2008, importou-se em tubérculos-semente 350 ton do Chile, 2,9 ton da Bolívia e 1700 ton da Holanda (Aliceweb, 2009). O volume é bastante grande e a entrada de estirpes pode estar ocorrendo através de

infecções latentes. As infecções latentes são caracterizadas pela presença de células bacterianas em baixo nível populacional, sem a presença dos sintomas, o que conseqüentemente impede a detecção dessas estirpes pelos métodos empregados, tais como PCR convencional e ELISA.

Todas as espécies relatadas no presente trabalho podem estar sendo disseminadas por todas as áreas produtoras de batata no Brasil, visto que dentro da maioria das regiões produtoras que foram amostradas, pelo menos uma ou mais amostras estavam infectadas com algumas dessas espécies.

O percentual elevado de *Dickeya* spp. em tubérculos-semente é alarmante, uma vez que nos últimos anos, as perdas causadas por canela-preta causada por *Dickeya* spp. na Europa tem aumentado a cada ano. O Brasil importa anualmente quase 2000 ton de tubérculos-semente da União Européia (Aliceweb, 2009). A Holanda é um dos países aonde vem ocorrendo surtos epidêmicos dessa doença, sendo causada principalmente pela *Dickeya* sp. Dessa forma, o risco de importação de tubérculos com infecções latentes no país é alto (Slawiak *et al.*, 2009). Até o momento, não há muitos registros na literatura da ocorrência de *Dickeya* spp. em tubérculos-semente no Brasil e no mundo, e o que se tem visto é a ocorrência de surtos epidêmicos da doença em campo, sem a avaliação dos tubérculos-semente. A ausência de análises dos tubérculos-semente e de ferramentas sensíveis para a detecção de populações bacterianas em baixos níveis pode ter contribuído para que essas espécies não tenham sido ainda detectadas em amostras de tubérculos-semente.

*Ralstonia solanacearum*, dependendo da raça/biovar, é considerada praga quarentenária A1 (NAPPO, EPPO). Esta pesquisa mostrou uma incidência preocupante desta bactéria. Utilizando outras ferramentas, outros trabalhos mostraram a presença desta bactéria em tubérculos (Maciel *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2007; Figueiró, 2008). A produção de sondas ou oligonucleotídeos iniciadores que possam identificar raças/biovars, filotipos, sequevars de *R. solanacearum* seria de grande valia para estudos epidemiológicos através de qPCR.

A incidência associada de *Dickeya* sp. e *R. solanacearum* nos tubérculos em proporções elevadas é um resultado alarmante, visto que as duas espécies podem causar sintomas de murcha em plantas de batata, e a murcha bacteriana visualizada à campo pode ser causada tanto por *Dickeya* sp. ou por *R. solanacearum* ou por ambas. Até o momento, nenhum relato dessa associação foi verificado, o que necessita de mais estudos para verificar se a ocorrência de murcha no Brasil está associada com essas espécies.

Em levantamentos anteriores realizados no Brasil, a presença de *P. atrosepticum* foi questionada, estando presente em percentuais baixos no Brasil, predominando *P. brasiliensis* (Duarte *et al.*, 2004; El Tassa & Duarte, 2004; El Tassa & Duarte, 2006; Ribas, 2007). Os resultados obtidos na presente pesquisa mostraram resultados semelhantes, onde ocorreu a presença dessas duas espécies, em associação com outras espécies ou isoladas.

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* esteve presente em 4,3% das amostras isoladamente, o que denota que essa espécie tem se mostrado presente nos tubérculos, porém, não se sabe se esta espécie estaria associada com a canela-preta ou com podridão-mole dos tubérculos. Alguns relatos dessa espécie em países de clima temperado está associada com a canela-preta em batata (Haan *et al.*, 2008), o que reforça que essa espécie pode causar canela-preta no Brasil.

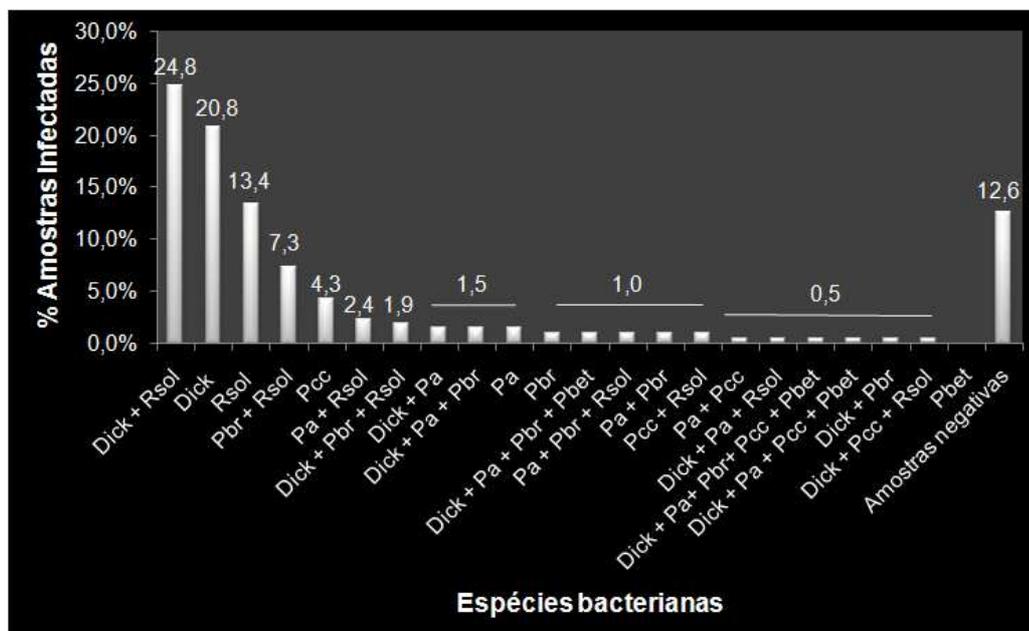


FIGURA 21. Incidência de bactérias-alvo nos tubérculos de batata, individualmente ou associadas. Bactérias detectadas no estudo: *Dickeya* sp. (Dick), *Ralstonia solanacearum* (Rsol), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) e *Pectobacterium betavascularum* (Pbet). Porto Alegre, RS, 2009.

*Pectobacterium betavasculorum* que não havia sido encontrada no Brasil em tubérculos de batata, foi encontrada em 1,9% das amostras, sempre associada com outras espécies, não sendo verificada isoladamente nos tubérculos.

Os resultados mostrados por essa pesquisa mostram o primeiro relato de associação entre pectobactérias e *R. solanacearum* nos tecidos dos tubérculos. Entretanto, nenhum relato da ocorrência dessas associações na literatura foi encontrado para elucidar o significado epidemiológico dessas associações.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, nas condições em que o estudo foi conduzido, chegou-se às seguintes conclusões para o presente trabalho:

1. O uso de cartões FTA para coleta dos tubérculos possibilita redução no tempo de coleta e extração do DNA, podendo ser usados em estudos epidemiológicos, certificação de tubérculos-semente e inspeção quarentenária. Esse método não necessita de enriquecimento prévio das amostras em meios de cultivo para detecção sensível por PCR e qPCR das espécies bacterianas em estudo. Além disso, a logística de coleta das amostras não necessita que os tubérculos sejam transportados até o laboratório para as posteriores análises, visto que as amostras de DNA são transportadas nos cartões após a transferência (pressão direta dos tubérculos) no local de coleta;
2. Os oligonucleotídeos e sondas desenhados a partir dos genes *acnA* e *mtlD* para detecção através de qPCR podem ser utilizados na detecção de pectobactérias (*Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp.) para levantamentos epidemiológicos, certificação de tubérculos-semente e inspeções

quarentenárias. O método de qPCR com os oligos e sondas para os genes *acnA* (*Pectobacterium* spp.) e *mtlD* (*Dickeya* sp.) é capaz de detectar um número reduzido de células bacterianas presentes nas amostras;

3. *Dickeya* sp. está ocorrendo no Brasil, com elevada incidência em tubérculos. Este fato corrobora com os resultados encontrados na Europa, onde foram verificados um número elevado de surtos epidêmicos de canela-preta causados por *D. dianthicola* e *D. solani*. Este é o primeiro relato de incidência elevada de *Dickeya* sp. em tubérculos no Brasil;

4. Associações entre *Pectobacterium* spp., *Dickeya* sp. e *R. solanacearum* ocorrem em tubérculos, onde entre *Dickeya* sp. e *R. solanacearum* este percentual é mais alto e este fato é um indicativo de que essa associação pode resultar em murcha bacteriana na cultura da batata no Brasil;

5. *Ralstonia solanacearum* também ocorre isoladamente no Brasil, em baixos níveis populacionais nos tubérculos assintomáticos;

6. *Pectobacterium brasiliensis* está presente em maior percentual do que *P. atrosepticum* e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* no Brasil, porém, em associação com *Pectobacterium* spp., *Dickeya* sp. e *R. solanacearum*;

7. *Pectobacterium betavasculorum* ocorre em tubérculos, associada a outras espécies de pectobactérias, sendo o primeiro relato dessa espécie na cultura da batata.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude da incidência elevada de *Dickeya* sp. nos tubérculos e das pesquisas recentes mostrando a heterogeneidade do gênero, o desenho de sondas e oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada uma das espécies permitiria um levantamento, através de qPCR, da situação desse gênero nos tubérculos-semente e plantas nas lavouras brasileiras.

Um possível significado epidemiológico da incidência associada de *Dickeya* sp., *R. solanacearum*, *P. atrosepticum*, *P. brasiliensis*, *P. carotovorum* e *P. betavasculorum* em tubérculos deve ser postulado e merece ser elucidado através de novas pesquisas.

Além disso, *R. solanacearum*, uma espécie bastante heterogênea, necessita de estudos que incluam, além de métodos moleculares bastante robustos (ex. qPCR) para detecção, métodos que identifiquem biovar, filotipo e sequevar, simultaneamente. Com isso, no momento em que ocorre a detecção da bactéria, o perfil da estirpe que está ocorrendo no campo é identificado, comparando-se com a ocorrência em outros países. Esse tipo

de informação apresenta importância de cunho epidemiológico e de manejo da murcha.

A partir deste trabalho, surge ainda a necessidade de mais estudos para avaliar a incidência dessas bactérias, verificando se ocorrem associações entre elas, e ainda verificar a ocorrência de espécies ainda não identificadas em batata, ou que ocorrem em outros hospedeiros (ex. *P. betavasculorum* e *P. wasabiae*).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGINDOTAN, B. O.; SHIEL, P. J.; BERGER, P. H. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Columbia, v. 142, p. 1-9, 2007.

ALBUQUERQUE, P.; MENDES, M. V.; SANTOS, C. L.; MORADAS-FERREIRA, P.; TAVARES, F. DNA signature-based approaches for bacterial detection and identification. **Science of the Total Environment**, Cambridge, v. 407, n. 12, p. 3641-3651, 2009. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.10.054.

ALICEWEB. **Importação de batata-semente janeiro de 2009 à agosto de 2009**. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>>. Acesso em: 25 set. 2009.

ALTSCHUL, S. A.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. p. 3389-3402, 1997.

APPLIED BIOSYSTEMS. 2008. **Real-Time PCR: entendendo o C<sub>T</sub>**. Disponível em: <[http://www.appliedbiosystems.com.br/site/suporte\\_documento.asp](http://www.appliedbiosystems.com.br/site/suporte_documento.asp)>. Acesso em: 20 fev. 2009.

ARZANLOU, M.; ABELN, E. C. A.; KEMA, G. H. J.; WAALWIJK, C.; CARLIER, J.; VRIES, I.; GUZMÁN, M.; CROUS, P. W. Molecular diagnostics for the sigatoka disease complex of banana. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, p. 1112-1118, 2007.

BACH, H.-J.; JESSEN, I.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J. C. A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v. 52, p. 85-91, 2003.

BOUDAZIN, G.; LE ROUX, A. C.; JOSI, K.; LABARRE, P.; JOUAN, B. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 4, p.373-380, 1999.

BRENNER, D. J.; STEIGERWALT, A. G.; MIKLOS, G. V.; FANNING, G. R. Deoxyribonucleic acid relatedness among *Erwinia* and other Enterobacteriaceae: the soft rot organisms (Genus *Pectobacterium* Waldee). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Palo Alto, v.23, n. 3, p. 205-216, 1973.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

BUSTIN, S. A. **Why the need for qPCR publication guidelines?-The case for MIQE**. Methods, New York, 2010. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/ymeth>>. Acesso em: 25 jan. 2010. DOI: 10.1016/j.meth.2009.12.006

CAMARGO FILHO, W. P. A. H. S. Mercado de batata no Brasil: análise de produção, importação e preços. **Informações econômicas**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 71-76, 2005.

CHAMPOSISEAU, P. G.; JONES, J. B.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* race 3 Biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. **Plant Health Progress**, St. Paul, mar. 2009. DOI: 10.1094/PHP-2009-0313-01-RV.

CHARKOWSKI A. The soft rot *Erwinia*. In: GNANAMANICKAM, S. S., **Plant-associated Bacteria**. New York: Springer, 2006. p. 423-505.

CHEN, Y.; ZHANG, W. Z.; LIU, X.; MA, Z. H.; LI, B.; ALLEN, C.; GUO, J. H. A real time PCR assay for the quantitative detection of *Ralstonia solanacearum* in horticultural soil and plant tissues. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hong Kong, v. 20, n. 1, p. 193-201, 2010.

CHENG, J.-H.; HUANG, C.-L.; LIN, C.-C.; CHEN, C.-C.; CHANG, Y.-C.; CHANG, S.-S.; TSENG, C.-P. Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA Real-time PCR. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 52, n. 11, p. 1997-2004, 2006.

CIB. **Mercado interno e externo**. Disponível em:< [www.cib.com.br](http://www.cib.com.br) >. Acesso em: 20 mar. 2008.

CIB. **A Batata no Brasil**. Disponível em:< [www.cib.com.br](http://www.cib.com.br) >. Acesso em: 20 mar. 2008.

CIB. **Batata-semente**. Disponível em:< [www.cib.com.br](http://www.cib.com.br) >. Acesso em: 20 mar. 2008.

CZAJKOWSKI, R.; GRABE, G. J.; VAN DER WOLF, J. M. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, n. 2, p. 263-275, 2009. DOI: 10.1007/s10658-009-9480-9.

CULLEN, D. W.; TOTH, I. K.; BOONHAN, N.; WALSH, K.; BARKER, I.; LEES, A. K. Development and validation of conventional and quantitative polymerase chain reaction assays for the detection of storage rot potato pathogens, *Phytophthora erythroseptica*, *Pythium ultimum* and *Phoma foveata*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 309-315, 2007.

DARRASSE, D. A.; PRIOU, S.; KOTOUJANSKY, A.; BERTHEAU, Y. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. p. 1437-1443, 1994.

DE BOER, S. H.; WARD, L. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. p. 854-858, 1995.

DE BOER, S. H. Characterization of pectolytic erwinias as highly sophisticated pathogens of plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 9, p. 893-899, 2003.

DE BOER, S. H.; ELPHINSTONE, J. G.; SADDLER, G. S. Molecular detection strategies for phytopathogenic bacteria. In: PUNJA, Z. K., DE BOER, S. H.; SANFARCON, H. I. **Biotechnology and Plant disease management**. Oxford: Oxford Press, 2007. p. 165-166.

DEGEFU, Y.; VIRTANEN, E.; VAYRYNEN, T. Pre-PCR Processes in the Molecular Detection of Blackleg and Soft Rot Erwiniae in Seed Potatoes. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 6, p. 370-378, 2009. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2008.01504.x.

DELLAGI, A.; BIRCH, P. R. J.; HEILBRONN, J.; LYON, G. D.; TOTH, I. K. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*. **Microbiology**, New York, v. 146, n. p. 165-171, 2000.

DIALLO, S.; LATOUR, X.; GROBOILLOT, A.; SMADJA, B.; COPIN, P.; ORANGE, N.; FEUILLOLEY, M. G. J.; CHEVALIER, S. Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, n. 2, p. 349-354, 2009.

DI PINTO, A.; FORTE, V. T.; GUASTADISEGNI, M. C.; MARTINO, C.; SCHEMA, F. P.; TANTILLO, G. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. **Food Control**, New York, p. 76-80, 2007.

DIRECTOR-MYSKA, A. E.; POGOZELSKI, W. K.; LOFTS, R. S.; PRASANNA, P. G. S.; HAMEL, C. J. C.; BLAKELY, W. F. Quantitative plasmid mixture analysis using the fluorogenic 5'-nuclease polymerase chain reaction assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Hoboken, v. 37, n. 2, p.147-154, 2001.

DUARTE, V.; DE BOER, S. H.; WARD, L. J.; DE OLIVEIRA, A. M. R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 3, p. 535-545, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02173.x.

DYER, A.; SOOLE, K.; MATSUMOTO, G. Quantitative TaqMan PCR without a real-time thermal cycler: An assay for fish insulin-like growth factor I messenger RNA. **Marine Biotechnology**, New York, v. 3, n. 1, p.16-21, 2001.

EL TASSA, S. O. M. **Identificação e caracterização molecular de pectobactérias associadas à batata-semente no Rio Grande do Sul**. 78 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotenia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

EL TASSA, S. O. M.; DUARTE, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. p. 620-625, 2004.

EL TASSA, S. O. M.; DUARTE, V. Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* através de PCR-RFLP do gene RecA **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. p. 23-28, 2006.

EPPO. **European and Mediterranean Plant Protection Organization**. Disponível em: <<http://www.eppo.org/>>. Acesso em: 01 dez. 2009.

FAO. **The global potato economy**. Disponível em: <[www.potato2008.org](http://www.potato2008.org/)>. Acesso em: 20 ago 2008.

FAO. **Potato world**. Disponível em: <[www.potato2008.org](http://www.potato2008.org/)>. Acesso em: 20 out. 2008.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p. 449-462.

FESSEHAIE, A.; DE BOER, S. H.; LEVESQUE, C. A. Molecular characterization of DNA encodign 16S-23S rRNA intergenic spacer regions

and 16 S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. p. 387-398, 2002.

FESSEHAIE, A.; DE BOER, S. H.; LEVESQUE, C. A. An oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. p. 262-269, 2003.

FIGUEIRÓ, A. A. **Detecção de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata através de PCR qualitativa e quantitativa**. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

FRÉCHON, D.; EXBRAYAT, P.; HELIAS, V.; HYMAN, L. J.; JOUAN, B.; LLOP, P.; LOPEZ, M. M.; PAYET, N.; PEROMBELON, M. C. M.; TOTH, I. K.; VAN BECKHOVEN, J. R. C. M.; VAN DER WOLF, J. M.; BERTHEAU, Y. Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. **Potato Research**, Wageningen, v. 41, n. 2, p. 163-173, 1998.

FULTON, T. M.; CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S. D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plant. **Plant Molecular Reporter**, New York, v. 13, n. 3, p. 207-209, 1995.

GARDAN, L.; GOUY, C.; CHRISTEN, R.; SAMSON, R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Palo Alto, v. 53, n. p. 381-391, 2003. DOI: 10.1099/ijls.0.02423-0.

GILLINGS, M.; FAHY, P.; DAVIES, C. Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. **Letters in Applied Microbiology**, Cardiff, v. n. 17, p. 44-48, 1993.

GLASNER, J. D.; MARQUEZ-VILLAVICENCIO, M.; KIM, H. S.; JAHN, C. E.; MA, B.; BIEHL, B. S.; RISSMAN, A. I.; MOLE, B.; YI, X.; YANG, C. H.; DANGL, J. L.; GRANT, S. R.; PERNA, N. T.; CHARKOWSKI, A. O. Niche-Specificity and the Variable Fraction of the *Pectobacterium* Pan-Genome. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 21, n. 12, p. 1549-1560, 2008. DOI: 10.1094/Mpmi-21-12-1549.

GONZALES, J. L.; LOZA, A.; CHACON, E. Sensivity of different *Trypanosoma vivax* specific primers for the diagnosis of livestock trypanosomosis using different DNA extraction methods. **Veterinary Parasitology**, New York, v. 136, p. 119-126, 2006.

GUDMESTAD, N. C.; MALLIK, I.; PASCHE, J. S.; ANDERSON, N. R.; KINZER, K. A real-time PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp.

*sepedonicus* based on the cellulase A gene sequence. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, n. 6, p. 649-659, 2009.

GUIDOT, A.; ELBAZ, M.; CARRERE, S.; SIRI, M. I.; PIANZZOLA, M. J.; PRIOR, P.; BOUCHER, C. Specific Genes from the Potato Brown Rot Strains of *Ralstonia solanacearum* and Their Potential Use for Strain Detection. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, n. 9, p.1105-1112, 2009.

GUNDRY, C. N.; VANDERSTEEN, J. G.; REED, G. H.; PRYOR, R. J.; CHEN, J.; WITWER, C. T. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 49, n. 3, p. 396-406, 2003.

HAAN, E. G.; DEKKER-NOOREN, T. C. E. M.; VAN DEN BOVENKAMP, G. W.; SPEKSNIJDER, A. G. C. L.; VAN DER ZOUWEN, P. S.; VAN DER WOLF, J. M. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, n. p. 561-569, 2008.

HAUBEN, L.; MOORE, E. R. B.; VAUTERIN, L.; STEENACKERS, M.; MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; SWINGS, J. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. **Systematic and Applied Microbiology**, Maryland Heights, v. 21, n. 3, p. 384-397, 1998.

HAYWARD, A. C.FEGAN, M. The *Ralstonia solanacearum* species complex: Genetic diversity and physiology of the pathogen and ecology of bacterial wilt. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 6, p.S121-S121, 2004.

HONG, J. C.; MOMOL, M. T.; JONES, J. B.; JI, P. S.; OLSON, S. M.; ALLEN, C.; PEREZ, A.; PRADHANANG, P.; GUVEN, K. Detection of *Ralstonia solanacearum* in Irrigation Ponds and Aquatic Weeds Associated with the Ponds in North Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 12, p.1674-1682, 2008.

HORITA, M.TSUCHIYA, K. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 4, p.399-407, 2001.

HUANG, J.; WU, J.; LI, C.; XIAO, C.; WANG, G. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil with quantitative, real-time PCR assays. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 107, n. 5, p. 1729-1739, 2009.

IBEKWE, A. M.; WATT, P. M.; GRIEVE, C. M.; SHARMA, V. K.; LYONS, S. R. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157 : H7 in dairy wastewater wetlands. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p.4853-4862, 2002.

IBGE. **Confronto das safras de 2008 e 2009 e estimativas para 2010**. Disponível em:<[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em: 12 dez. 2009.

ILAGAN, Y. A.; LAVINA, W. A.; NATURAL, M. P.; RAYMUNDO, A. K. Genetic homogeneity of the banana-infecting strains of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. in the Philippines. **Philippine Agricultural Scientist**, Laguna, v. 86, n. 4, p.394-402, 2003.

INRA; CNRS; LIPM. ***Ralstonia solanacearum* GMI1000, MOLK2 and IPO1609: A phytopathogenic bacterium with a wide host range.** 2003. Disponível em: <<http://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/ralso.cgi>> Acesso em: 05 ago. 2009.

IVEY, M. L. L.; GARDENER, B. B. M.; OPINA, N.; MILLER, S. A. Diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting eggplant in the Philippines. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, n. 11, p.1467-1475, 2007.

IOOS, R.; FABRE, B.; SAURAT, C.; FOURRIER, C.; FREY, P.; MARÇAIS, B. Development, comparison, and validation of real-time and conventional PCR tools for the detection of the fungal pathogens causing Brown Spot and Red Band Needle Blights of pine. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, n. 1, p. 105-114, 2010.

JABOUNSKI, R. E.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. p. 185-195, 1986.

JEONG, Y.; KIM, J.; KANG, Y.; LEE, S.; HWANG, I. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 10, p.1277-1287, 2007.

JI, P. S.; ALLEN, C.; SANCHEZ-PEREZ, A.; YAO, J.; ELPHINSTONE, J. G.; JONES, J. B.; MOMOL, A. T. New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 2, p.195-203, 2007.

KANG, H. W.; KWON, S. W.; GO, S. J. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 127-133, 2003.

KANG, M. J.; LEE, M. H.; SHIM, J. K.; SEO, S. T.; SHRESTHA, R.; CHO, M. S.; HAHN, J. H.; PARK, D. S. PCR-based specific detection of *Ralstonia solanacearum* by amplification of cytochrome c1 signal peptide sequences. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 17, n. 11, p.1765-1771, 2007.

KAPSA, J. S. Important Threats in Potato Production and Integrated Pathogen/Pest Management. **Potato Research**, New York, v. 51, p. 385-401, 2008.

KIM, H. S.; MA, B.; PERNA, N. T.; CHARKOWSKI, A. O. Phylogeny and Virulence of Naturally Occurring Type III Secretion System-Deficient *Pectobacterium* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 13, p. 4539-4549, 2009. DOI: 10.1128/Aem.01336-08.

KUBOTA, R.; VINE, B. G.; ALVAREZ, A. M.; JENKINS, D. M. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, n. 9, p.1045-1051, 2008.

KUBO, S.; FUJITA, Y. Application of FTA technology to extraction of sperm DNA from mixed body fluids containing semen. **Legal Medicine**, Tokyo, v. 8, n. 1, p. 43-47, 2006.

LAMPEL, K. A.; ORLANDI, P. A.; KORNEGAY, L. Improved Template Preparation for PCR-Based Assays for Detection of Food-Borne Bacterial Pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4539-4542, 2000.

LAMPEL, K. A.; DYER, D.; KORNEGAY, L.; ORLANDI, P. A. Detection of *Bacillus* spores using PCR and FTA Filters. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, p. 1036-1038, 2004.

LAURILA, J.; AHOLA, V.; LEHTINEN, A.; JOUTSJOKI, T.; HANNUKKALA, A.; RAHKONEN, A.; PIRHONEN, M. Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, n. 2, p. 213-225, 2008. DOI: 10.1007/s10658-008-9274-5.

LAURILA, J.; HANNUKKALA, A.; NYKYRI, J.; PASANEN, M.; HÉLIAS, V.; GARLANT, L.; PIRHONEN, M. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, p. 249-262, 2010. DOI: 10.1007/s10658-009-9537-9.

LEHMAN, S. M.; KIM, W.-S.; CASTLE, A. J.; SVIRCEV, A. M. Duplex Real-Time Polymerase Chain Reaction reveals competition between *Erwinia amylovora* and *E. pyrifoliae* on pear blossoms. **Phytopathology**, St Paul, v. 98, n. 6, p. 673-679, 2008.

LIU, Y. Q.; KANDA, A.; YANO, K.; KIBA, A.; HIKICHI, Y.; AINO, M.; KAWAGUCHI, A.; MIZOGUCHI, S.; NAKAHO, K.; SHIOMI, H.; TAKIKAWA, Y.; OHNISHI, K. Molecular typing of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum* in relation to the ability to induce a hypersensitive reaction in tobacco. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 75, n. 5, p.369-380, 2009.

LI, W.; LEVY, L.; HARTUNG, J. S. Quantitative distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in Citrus plants with Citrus Huanglongbing. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, n. 2, p. 139-144, 2009.

LOPES, S. A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G. F.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; FERNANDES, N. G.; CAMBRA, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in Citrus plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, n. 3, p. 301-306, 2009.

MA, B.; HIBBING, M. E.; KIM, H. S.; REEDY, R. M.; YEDIDIA, I.; BREUER, J.; BREUER, J.; GLASNER, J. D.; PERNA, N. T.; KELMAN, A.; CHARKOWSKI, A. O. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, n. 9, p. 1150-1163, 2007. DOI: 10.1094/Phyto-97-9-1150.

MACIEL, J. L. N.; DUARTE, V.; SILVEIRA, J. R. P.; VAN DER SAND, S. T. Frequência de biovares de *Ralstonia solanacearum* em diferentes cultivares e épocas de cultivo de batata no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. p. 741-744, 2001.

MUTHUKRISHNAM, M.; SINGANALLUR, N. B.; RALLA, K.; VILLUPPANOOR, S. A. Evaluation of FTA<sup>®</sup> cards as a laboratory and field sampling device for the detection of foot-and-mouth disease virus and serotyping by RT-PCR and real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, New York, v. 151, p. 311-216, 2008.

MAS, S.; CRESCENTI, A.; GASSÓ, P.; VIDAL-TABOADA, J. M.; LAFUENTE, A. DNA Cards: determinants of DNA yield and quality in collecting genetic samples for pharmacogenetic studies. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Oxford, v. 101, n. p. 132-137, 2007.

NAPPO. **North American Plant Protection Organization's (NAPPO): Phytosanitary Alert System**. Disponível em: <<http://www.pestalert.org/>>. Acesso em: 01 dez. 2009.

NASSAR, A.; DARRASSE, D. A.; LEMARTE, M.; KOTOUJANSKY, A.; DERVIN, C.; VEDEL, R.; BERTHEAU, Y. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. p. 2228-2235, 1996.

NDUNGURU, J.; TAYLOR, N. J.; YADAV, J.; ALY, H.; LEGG, J. P.; AVELING, T.; THOMPSON, G.; FAUQUET, C. M. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. **Virology Journal**, London, v.45, n. 2, 1-12, 2005.

NECHVATAL; J. M.; RAM, J. L.; BASSON, M. D.; NAMPRACHAN; P.; NIEC, S. R.; BADSHA, K. Z.; MATHERLY, L. H.; MAJUMDAR, A. P. N.; KATO, I. Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of

bacterial and human markers from human feces. **Journal of Microbiological Methods**, New York, v. 72, p. 124-132, 2008.

NORMAN, D. J.; ZAPATA, M.; GABRIEL, D. W.; DUAN, Y. P.; YUEN, J. M. F.; MANGRAVITA-NOVO, A.; DONAHOO, R. S. Genetic Diversity and Host Range Variation of *Ralstonia solanacearum* Strains Entering North America. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, n. 9, p.1070-1077, 2009.

NOURI, S.; BAHAR, M.; FEGAN, M. Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2T strains outside South America. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, n. 2, p.243-249, 2009.

OLIVEIRA, A. M. R. **Incidência e variabilidade genética de erwinias pectolíticas associadas à Canela Preta em lavouras de batata no Estado do Rio Grande do Sul**. 83 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

OLIVEIRA, A. M. R.; DUARTE, V.; SILVEIRA, J. R. P.; E MORAES, M. G. Incidence of pectolytic erwinias associated with blackleg of potato in Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. p. 49-53, 2003.

ORLANDO, C.; PINZANI, P.; PAZZAGLI, M. Developments in quantitative PCR. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 36, n. 5, p.255-269, 1998.

OSMAN, F.; ROWHANI, A. Application of a spotting sampe preparation technique of the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, Columbia, v. 133, p. 130-136, 2006.

OWCZARZY, R.; TATAUROV, A. V.; WU, Y.; MANTHEY, J. A.; MCQUISTEN, K. A.; ALMABRAZI, H. G.; PEDERSEN, K. F.; LIN, Y.; GARRETSON, J.; MCENTAGGART, N. O.; SAILOR, C. A.; DAWSON, R. B. E PEEK, A. S. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, n. p. 163-169, 2008.

OZAKMAN, M.; SCHAAD, N. W. A real-time BIO-PCR assay for detection of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in asymptomatic potato tubers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 25, n. 3, p.232-239, 2003.

PALACIO-BIELSA, A.; CAMBRA, M. A.; LOPEZ, M. M. Characterisation of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 148, n. 2, p. 157-164, 2006. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2006.00045.x.

PALACIO-BIELSA, A.; CAMBRA, M. A.; LOPEZ, M. M. First report of bacterial soft rot on onion caused by *Dickeya* sp. (ex *Pectobacterium chrysanthemi*) in Spain. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, n. 4, p. 722-722, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2007.01589.x.

PALMA, J. **Seleção de oligonucleotídeos iniciadores visando compor um arranjo de sondas de DNA que identifique estirpes de Pectobactérias**. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.

PAPIN, J. F.; VAHRSON, W.; DITTMER, D. P. SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile virus circumvents false-negative results due to strain variability. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 4, p.1511-1518, 2004.

PASTRIK, K. H.; MAISS, E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, n. 11-12, p.619-626, 2000.

PASTRIK, K. H.; ELPHINSTONE, J. G.; PUKALL, R. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 9, p.831-842, 2002.

PEREIRA, A. S. D. J. **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Clima Temperado, 2003. 567 p.

PERNA, N. T.; FREDERICK, R. B.; BYRNES, A.; DARLING, A.; GILSON, M.; GLASNER, J. D.; LISS, P.; PLUNKETT III, G.; PRASAD, T.; RUSCH, M. **ASAP (A Systematic Annotation Package for Community Analysis of Genomes)**. 2007. Disponível em: <<http://asap.ahabs.wisc.edu/asap/home.php>> Acesso em: 20 out. 2007.

PÉROMBELON, M. C. M. Potato blackleg: Epidemiology, host-pathogen interaction and control. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 98, n. p. 135-146, 1992a.

PÉROMBELON, M. C. M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, p. 1-12, 2002b.

PETERS, J.; SLEDZ, W.; BERGERVOET, J. H. W.; VAN DER WOLF, J. M. An enrichment microsphere immunoassay for the detection of *Pectobacterium atrosepticum* and *Dickeya dianthicola* in potato tuber extracts. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, n. 2, p.97-107, 2007.

PITMAN, A. R.; WRIGHT, P. J.; GALBRAITH, M. D.; HARROW, S. A. Biochemical and genetic diversity of pectolytic enterobacteria causing soft rot

disease of potatoes in New Zealand. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 37, n. 6, p. 559-568, 2008. DOI: 10.1071/Ap08056.

PITMAN, A. R.; HARROW, S. A.; VISNOVSKY, S. B. Genetic characterization of *Pectobacterium wasabiae* causing soft rot disease of potato in New Zealand. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/q4818k3t5542514n/?p=e26368f1399c494cad401bdc31527dd8&pi=26>. 30 out. 2009. Acesso em 15 dez. 2009. DOI: 10.1007/s10658-009-9551-y.

POUSSIÉ, S.; VANDEWALLE, P.; LUISETTI, J. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 5, p.2184-2194, 1999.

PROKOP, S. **Potatoes, nutrition and diet**. Disponível em:<[www.potato2008.org](http://www.potato2008.org)>. Acesso em: 18 Jul. 2008.

PURVIS, L. B.; VILLEGAS, P.; PEROZO, F. Evaluation of FTA paper and phenol for storage, extraction and molecular characterization of infectious bursal disease virus. **Journal of Virological Methods**, New York, v. 138, p. 66-69, 2006.

RAJENDRAM, D.; AYENZA, R.; HOLDER, F. M.; MORAN, B.; LONG, T.; SHAH, H. N. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v. 67, n. p. 582-592, 2006.

RAYMAEKERS, M.; SMETS, R.; MAES, B.; CARTUYVELS, R. Checklist for optimization and validation of Real-Time PCR assays. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 23, p. 145-151, 2009.

REED, G. H.; KENT, J. O.; WITTEWER, C. T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 597-608, 2007.

RIBAS, A. D. **Detecção de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* em plantas de batata através de PCR com oligonucleotídeos iniciadores a partir das seqüências dos genes *pnl* e *rdg***. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ROE, B. A.; CRABTREE, J. S.; KHAN, S. A. **DNA isolation and sequencing: essential techniques series**. New York: Wiley, 176 p. 1996.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 5, n. 2, p. 69-76, 1985.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279 p. Cap. 4: Método de diluição em placas para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão; Cap. 12: Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão.

ROMMEL, C. C. **Etiologia e epidemiologia de morte de flores de pereiras européias (*Pyrus communis* L.) no estado do Rio Grande do Sul**. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ROY, Y.; NASSUTH, A. Detection of plant genes, gene expression, and viral RNA from tissues print on FTA<sup>®</sup> cards. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 23, n. 4, 2005.

SADLLER, G. "***Dickeya solani***": a new threat to GB potato production. 2009. Disponível em: <[www.potato.org.uk/media\\_files/events/bp2009\\_saddler\\_dickeya\\_final.pdf](http://www.potato.org.uk/media_files/events/bp2009_saddler_dickeya_final.pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2009.

SAMSON, R.; LEGENDRE, J. B.; CHRISTEN, R.; FISCHER-LE SAUX, M.; ACHOUAK, W.; GARDAN, L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Palo Alto, v. 55, n. p. 1415-1427, 2005. DOI: 10.1099/ijs.0.02791-0.

SCHAAD, N. W.; BERTHIER-SCHAAD, Y.; SECHLER, A.; KNORR, D. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated Real-Time fluorescence detection system. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 12, p. 1095-1100, 1999.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3 ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 2001. 164 p.

SCHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D. Real Time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 24, n. p. 250-258, 2002.

SCHWARTZ, S. B.; THURMAN, K. A.; MITCHELL, S. L.; WOLFF, J. B.; WINCHELL, J. M. Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates using real-

time PCR and high-resolution melt analysis. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. Berlin, v. 15, n. p. 756-762, 2009.

SEAL, S. E.; TAGHAVI, M.; FEGAN, N.; HAYWARD, A. C.; FEGAN, M. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. **Plant Pathology**, Oxford, v. 48, n. 1, p.115-120, 1999.

SILVEIRA, J. R. P. **Produção e utilização de anti-soros na diagnose de *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al. subsp. *atroseptica* (Van Hall) Dye, *E. carotovora* (Jones) Bergey et al. subsp. *carotovora* (Jones) Dye e *E. chrysanthemi* (Bulkholder, McFadden & Dimock)**. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 1992.

SILVEIRA, J. R. P.; DUARTE, V.; MORAES, M. G. Ocorrência das biovars 1 e 2 de *Ralstonia solanacearum* em lavouras de batata no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. p. 450-453, 2002.

SILVEIRA, J. R. P.; DUARTE, V.; MORAES, M. G.; LOPES, C. A.; FERNANDES, J. M.; BARNI, V.; MACIEL, J. L. N. Epidemiological Analysis of clones and cultivars of potato in soil naturally infested with *Ralstonia solanacearum* biovar 2. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. p. 181-188, 2007.

SLAWIAK, M.; LOJKOWSKA, E.; VAN DER WOLF, J. M. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 794-794, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02028.x.

SLAWIAK, M.; VAN BECKHOVEN, J. R. C. M.; SPEKSNIJDER, A. G. C. L.; CZAJKOWSKI, R.; GRABE, G.; VAN DER WOLF, J. M. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, n. 2, p. 245-261, 2009. DOI: 10.1007/s10658-009-9479-2.

SMITH, L. M.; BURGOYNE, L. A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. **BMC Ecology**, London, v. 4, p. 4, 2004.

SMITH, D. S.; DE BOER, S. H. An internal reaction control for use in a TaqMan polymerase chain reaction test for *Ralstonia solanacearum* race 3 (biovar 2). **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 30, n. 2, p.379-379, 2008.

STEVEN, P.; VAN ELSAS, J. D. Genetic and phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 strains obtained from Dutch waterways. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 97, n. 2, p. 171-188, 2010.

SWANSON, J. K.; MONTES, L.; MEJIA, L.; ALLEN, C. Detection of latent infections of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 in geranium. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 7, p.828-834, 2007.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEY, M. E.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

THÉBAUD, G.; YVON, M.; ALARY, R.; SAUVION, N.; LABONNE, G. Efficient transmission of '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' is delayed by eight months due to a long latency in its host-alternating vector. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, n. 3, p. 265-273, 2009.

THOMSON, S. V.; SCHROTH, M. N.; HILLS, F. J.; WHITNEY, E. D. Bacterial vascular necrosis and rot of sugar beet: general description and etiology. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, n. p. 1183-1189, 1977.

THOMSON, D.; HENRY, R. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. **Biotechniques**, New York, v. 19, p. 349-400, 1995.

TOTH, I. K.; BELL, K. S.; HOLEVA, M. C.; BIRCH, P. R. J. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 4, n. 1, p. 17-30, 2003.

TOTH, I.; ELPHINSTONE, J.; SADDLER, G. 2009. **Onward into battle: *Dickeya (Erwinia chrysanthemi)*: gets the upper hand**. Disponível em: <[www.scri.ac.uk/scri/file/PiP/pip09\\_Dickeya\\_Toht.pdf](http://www.scri.ac.uk/scri/file/PiP/pip09_Dickeya_Toht.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2009.

TOTH, I.; ELPHINSTONE, J. 2008. ***Erwinia chrysanthemi (Dickeya spp.)*: The facts**. Disponível em: <[www.scri.ac.uk/scri/file/PiP/Erwinia.pdf](http://www.scri.ac.uk/scri/file/PiP/Erwinia.pdf)>. Acesso em: 15 set. 2008.

TOUKAM, M. S.; CELLIER, G.; WICKER, E.; GUILBAUD, C.; KAHANE, R.; ALLEN, C.; PRIOR, P. Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, n. p. 1123-1130, 2009.

TSOR, L.; ERLICH, O.; HAZANOVSKY, M.; ZIG, U.; SLAWIAK, M.; GRABE, G.; VAN DER WOLF, J. M.; VAN DE HAAR, J. J. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, n. 3, p. 311-320, 2009.

TUMELERO, A. I. **Identificação e quantificação de *Pectobacterium* sp. em batata-semente**. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2003.

VAN DER MERWE, J. J.; COUTINHO, T. A.; KORSTEN, L.; VAN DER WAALS, J. E. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, p. 175-185, 2010. DOI: 10.1007/s10658-009-9531-2.

VAN DER WOLF, J. M.; VAN BECKHOVEN, J. R. C. M.; DE HAAN, E. G.; VAN DEN BOVENKAMP, G. W.; LEONE, G. O. M. Specific detection of *Ralstonia solanacearum* 16S rRNA sequences by AmpliDet RNA. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 1, p.25-33, 2004.

VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E. A.; MENCK, C. F. M.; DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P.; SIMPSON, A. J. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, n. p.169-189, 2002.

VINCELLI, P.; TISSERAT, N. Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 5, p.660-669, 2008.

WANG, H.; QI, M.; CUTLER, J. A. A simple method of preparing plant sample of PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, p. 4153-4154, 1993.

WELLER, S. A.; ELPHINSTONE, J. G.; SMITH, N. C.; BOONHAM, N.; STEAD, D. E. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 7, p.2853-2858, 2000.

WELLER, S. A.; BERESFORD-JONES, N. J.; HALL, J.; THWAITES, R.; PARKINSON, N.; ELPHINSTONE, J. G. Detection of *Xanthomonas fragariae* and presumptive detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*, from strawberry leaves, by real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v. 70, p. 379-383, 2007.

WEN, A.; MALLIK, I.; ALVARADO, V. Y.; PASCHE, J. S.; WANG, X.; LI, W.; LEVY, L.; LIN, H.; SCHOLTHOF, H. B.; MIRKOV, T. E.; RUSH, C. M.; GUDMESTAD, N. C. Detection, distribution, and genetic variability of '*Candidatus Liberibacter*' species associated with Zebra complex disease of potato in North America. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, n. 11, 2009.

WHATMAN. **FTA protocols: collect, transport, archive and access nucleic acids-all at room temperature; WB120047**. Disponível em:<www.whatman.com>. Acesso em: 15 nov. 2007.

WHATMAN. 2003. **Room temperature sample collection, storage and purification of nucleic acids**. Disponível em: <www.whatman.com>. Acesso em: 15 nov. 2007.

WICKER, E.; GRASSART, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M.; PRIOR, P. *Ralstonia solanacearum* Strains from Martinique (French West Indies) Exhibiting a New Pathogenic Potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 2, p.558-558, 2009.

WITTWER, C. T.; REED, G. H.; GUNDRY, C. N.; VANDERSTEEN, J. G.; PRYOR, R. J. High resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 49, n. 6, p. 853-860, 2007.

WOLF, J. B. **Applied molecular biology, beginning laboratory manual**. Disponível em: <<http://www.research.umbe.edu/~jwolf/method1.html>> Acesso em: 10 mar. 2009.

ZIJLSTRA, C.; VAN HOOFF, R. A. A multiplex Real time Polymerase Chain Reaction (TaqMan) assay for the simultaneous detection of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, p. 1255-1262, 2006.

## 8 APÊNDICE

APÊNDICE 1. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya* sp. (Dick), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *P. brasiliensis* (Pbr), *P. carotovorum* (Pcc), *P. betavascolorum* (Pbet) e *Ralstonia solanacearum* (Rsol). Porto Alegre, RS, 2009.

Nº	Amostras	Município	Estado	País	Cultivar	Dick	Pa	Pbr	Pcc	Pbet	Rsol
1	1001	S. Francisco de Paula	RS	Brasil	Ágata	-	-	-	+	-	-
2	1002	Ibiraíaras	RS	Brasil	Vivaldi	-	-	-	-	-	-
3	1003	S. Francisco de Paula	RS	Brasil	Asterix	+	+	-	-	-	-
4	1004	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	+	+	+	-	+	-
5	1005	Ibiraíaras	RS	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
6	1006	Ibiraíaras	RS	Brasil	Asterix	+	+	-	-	-	-
7	1007	S. Francisco de Paula	RS	Brasil	Ágata	+	+	+	-	+	-
8	1008	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	+	+	+	-	-	-
9	1009	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
10	1010	Ibiraíaras	RS	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
11	1011	Ibiraíaras	RS	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
12	1012	S. Francisco de Paula	RS	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
13	1013	Contenda	PR	Brasil	Ágata	+	-	+	-	-	-
14	1014	Contenda	PR	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
15	1015	Contenda	PR	Brasil	Ágata	+	+	+	-	-	-
16	1016	S. José dos Ausentes	RS	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
17	1017	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
18	1018	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
19	1019	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
20	1020	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
21	1021	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
22	1022	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
23	1023	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	+	+	+	+	+	-
24	1024	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	+	+	+	-	-	-
25	1025	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	-	+	-	-	-	-
26	1026	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	-	-	-	-	-	-
27	1027	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	-	+	+	-	-	-

continuação APÊNDICE 1. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya* sp. (Dick), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *P. brasiliensis* (Pbr), *P. carotovorum* (Pcc), *P. betavasculorum* (Pbet) e *Ralstonia solanacearum* (Rsol). Porto Alegre, RS, 2009.

28	1028	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	-
29	1029	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	-	-	+	-	-	-
30	1030	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	-
31	1031	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	-
32	1032	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
33	1033	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
34	1034	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
35	1035	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
36	1036	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
37	1037	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	+	+	-	+	+	-
38	1038	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	+	-	+	-	-	-
39	1039	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
40	1040	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	-	-	-	-	-	-
41	1041	Tainhas	RS	Brasil	Ágata	+	-	+	-	-	-
42	1042	Tainhas	RS	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
43	1146	NI	NI	Holanda	Ágata	-	-	-	-	-	-
44	1147	NI	NI	Holanda	Markies	+	-	-	-	-	-
45	3760	Pouso Alegre	MG	Brasil	Monalisa	+	-	-	-	-	-
46	3761	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	+	-	-	-	-	-
47	3762	Pouso Alegre	MG	Brasil	Baraka	+	-	-	-	-	-
48	3763	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
49	3764	Pouso Alegre	MG	Brasil	Monalisa	+	-	-	-	-	+
50	3765	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	-	-	-	-	-	-
51	3766	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	+	-	+	-	-	+
52	3918	NI	NI	Bolívia	Cupido	-	-	-	-	-	-
53	3919	NI	NI	Bolívia	Ágata	+	-	-	-	-	-
54	3920	NI	NI	Bolívia	Asterix	+	-	-	-	-	-
55	4598	Serra do Salitre	MG	Brasil	Atlantic	-	+	-	-	-	+
56	4599	Serra do Salitre	MG	Brasil	Atlantic	-	-	-	-	-	+
57	4600	Serra do Salitre	MG	Brasil	Atlantic	-	+	-	-	-	+
58	4601	Serra do Salitre	MG	Brasil	Atlantic	-	+	-	-	-	+
59	4632	Capão Alto	SC	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	+
60	4633	Capão Alto	SC	Brasil	Asterix	-	+	+	-	-	+
61	4634	Capão Alto	SC	Brasil	Monalisa	-	+	-	-	-	+
62	4635	Capão Alto	SC	Brasil	Cupido	-	-	-	-	-	+
63	4636	Capão Alto	SC	Brasil	Rodeo	-	-	+	-	-	+
64	4638	Capão Alto	SC	Brasil	Cupido	-	+	-	-	-	-
65	4639	Capão Alto	SC	Brasil	Monalisa	+	-	-	-	-	-

continuação APÊNDICE 1. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya* sp. (Dick), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *P. brasiliensis* (Pbr), *P. carotovorum* (Pcc), *P. betavasculorum* (Pbet) e *Ralstonia solanacearum* (Rsol). Porto Alegre, RS, 2009.

66	4640	Capão Alto	SC	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
67	4641	Capão Alto	SC	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
68	4642	São Joaquim	SC	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
69	4643	São Joaquim	SC	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	-
70	4644	São Joaquim	SC	Brasil	Caesar	+	-	-	-	-	-
71	4645	São Joaquim	SC	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
72	5897	NI	NI	Chile	Asterix	+	-	-	-	-	+
73	5898	NI	NI	Chile	Vivaldi	+	-	-	-	-	+
74	5899	NI	NI	Chile	Caesar	+	-	-	-	-	+
75	6255	Capão Alto	SC	Brasil	Caesar	+	-	-	-	-	+
76	6256	Capão Alto	SC	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	+
77	6257	Capão Alto	SC	Brasil	Ágata	+	-	+	-	-	+
78	6258	Capão Alto	SC	Brasil	Cupido	+	-	+	-	-	+
79	BOS1	Ibiraíaras	RS	Brasil	Ágata	+	-	+	-	-	-
80	BOS2	Ibiraíaras	RS	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	-
81	IBI1	Ibiraíaras	RS	Brasil	Asterix	-	-	-	+	-	-
82	IBI2	Ibiraíaras	RS	Brasil	Asterix	-	-	-	+	-	-
83	IBI3	Ibiraíaras	RS	Brasil	Asterix	-	-	-	+	-	-
84	IBI4	Ibiraíaras	RS	Brasil	Ágata	-	-	-	+	-	-
85	IBI5	Ibiraíaras	RS	Brasil	Asterix	-	-	-	+	-	-
86	IBI6	Ibiraíaras	RS	Brasil	Asterix	-	-	-	+	-	-
87	IBI7	Ibiraíaras	RS	Brasil	Ágata	-	-	-	+	-	-
88	IBI8	Ibiraíaras	RS	Brasil	Asterix	-	-	-	-	-	-
89	IBI9	Ibiraíaras	RS	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	-
90	MG-1	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
91	MG-2	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	-
92	MG-3	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	-	-	-	-	-	-
93	MG-4	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	-	-	-	-
94	MG-5	Pouso Alegre	MG	Brasil	Voyager	-	-	-	-	-	-
95	MG-6	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	-	-	-	-	-	-
96	MG-7	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	-
97	MG-8	Pouso Alegre	MG	Brasil	Baraka	-	-	-	-	-	-
98	MG-9	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	-	-	-	-	-	-
99	MG-10	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	-
100	MG-11	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	-	-	-	-	-	-
101	MG-12	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	-	-	-	+
102	MG-13	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	-	-	-	+
103	MG-14	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	-	-	-	+

continuação APÊNDICE 1. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya* sp. (Dick), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *P. brasiliensis* (Pbr), *P. carotovorum* (Pcc), *P. betavasculorum* (Pbet) e *Ralstonia solanacearum* (Rsol). Porto Alegre, RS, 2009.

104	MG-15	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	+
105	MG-16	Bueno Brandão	MG	Brasil	Naturela	-	-	-	-	-	+
106	MG-17	Bueno Brandão	MG	Brasil	Opaline	-	-	-	-	-	+
107	MG-18	Bueno Brandão	MG	Brasil	Chipie	-	-	-	-	-	+
108	MG-19	Bueno Brandão	MG	Brasil	Zafira	-	-	-	-	-	+
109	MG-20	Bueno Brandão	MG	Brasil	Emeraude	-	-	-	-	-	+
110	MG-21	Bueno Brandão	MG	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	+
111	MG-22	Bueno Brandão	MG	Brasil	Ambition	+	-	-	-	-	+
112	MG-23	Bueno Brandão	MG	Brasil	Armada	-	-	-	-	-	+
113	MG-24	Bueno Brandão	MG	Brasil	Almera	-	-	-	-	-	+
114	MG-25	Bueno Brandão	MG	Brasil	Sinora	-	-	-	-	-	+
115	MG-26	Bueno Brandão	MG	Brasil	Eole	-	-	-	-	-	+
116	MG-27	Bueno Brandão	MG	Brasil	Manitou	-	-	-	-	-	+
117	MG-28	Bueno Brandão	MG	Brasil	Fontane	+	-	-	-	-	+
118	MG-29	Bueno Brandão	MG	Brasil	Mustang	+	-	-	-	-	+
119	MG-30	Bueno Brandão	MG	Brasil	Rudolf	+	-	-	-	-	+
120	MG-31	Bueno Brandão	MG	Brasil	Faluka	+	-	-	-	-	+
121	MG-32	Bueno Brandão	MG	Brasil	Soléia	+	-	-	-	-	+
122	MG-33	Bueno Brandão	MG	Brasil	Colorado	+	-	-	-	-	+
123	MG-34	Bueno Brandão	MG	Brasil	Gourmandine	+	-	-	-	-	+
124	MG-35	Bueno Brandão	MG	Brasil	Monalisa	+	-	-	-	-	+
125	MG-36	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	+
126	MG-37	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	+	-	-	-	-	+
127	MG-38	Pouso Alegre	MG	Brasil	Voyager	+	-	-	-	-	+
128	MG-39	Pouso Alegre	MG	Brasil	Baraka	+	-	-	-	-	+
129	MG-40	Pouso Alegre	MG	Brasil	Markies	+	-	-	-	-	+
130	MG-41	Pouso Alegre	MG	Brasil	Voyager	+	-	-	-	-	+
131	MG-42	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	+
132	MG-43	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	+
133	MG-44	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	+	-	-	-	-	+
134	MG-45	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	+	-	-	-	-	+
135	MG-46	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	+
136	MG-47	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	+	-	-	-	-	+
137	MG-48	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	+
138	MG-49	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	+	-	-	-	-	+
139	MG-50	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	+	-	-	-	-	+
140	MG-51	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	+
141	MG-52	Pouso Alegre	MG	Brasil	Monalisa	+	-	-	-	-	+

continuação APÊNDICE 1. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya* sp. (Dick), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *P. brasiliensis* (Pbr), *P. carotovorum* (Pcc), *P. betavasculorum* (Pbet) e *Ralstonia solanacearum* (Rsol). Porto Alegre, RS, 2009.

142	MG-53	Pouso Alegre	MG	Brasil	Voyager	+	-	-	-	-	+
143	MG-54	Pouso Alegre	MG	Brasil	Markies	+	-	-	-	-	+
144	MG-55	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	+
145	MG-56	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	+	-	-	-	-	+
146	MG-57	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	+
147	MG-58	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	+
148	MG-59	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	+
149	MG-60	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	+
150	MG-61	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	+
151	MG-62	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	+	-	-	-	-	+
152	MG-63	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	+	-	-	-	-	+
153	MG-64	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
154	MG-65	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
155	MG-66	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	+	-	-	-	-	-
156	MG-67	Pouso Alegre	MG	Brasil	Baraka	+	-	-	-	-	-
157	MG-68	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	+	-	-	-	-	-
158	MG-69	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	+
159	MG-70	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	+	-	-	-	-	-
160	MG-71	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	+
161	MG-72	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	+	+	-	-	-	+
162	MG-73	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	+	-	-	-	-	+
163	MG-74	Pouso Alegre	MG	Brasil	Voyager	+	-	-	-	-	+
164	MG-75	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	-	-	-	-
165	MG-76	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	-	-	-	-	-	+
166	MG-77	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	-	-	+	-	-	+
167	MG-78	Pouso Alegre	MG	Brasil	Voyager	-	-	-	-	-	+
168	MG-79	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	-	-	-	+
169	MG-80	Pouso Alegre	MG	Brasil	Monalisa	-	+	-	-	-	+
170	MG-81	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	+	-	-	+
171	MG-82	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	+	-	-	-
172	MG-83	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	-	-	+	-	-	+
173	MG-84	Pouso Alegre	MG	Brasil	Rodeo	-	-	+	-	-	+
174	MG-85	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	+
175	MG-86	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	+	-	-	+
176	MG-87	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	+	-	-	+
177	MG-88	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	-	-	+	-	-	+
178	MG-89	NI	NI	Chile	Asterix	-	-	-	-	-	+
179	MG-90	Pouso Alegre	MG	Brasil	Monalisa	-	-	-	-	-	+

continuação APÊNDICE 1. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya* sp. (Dick), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *P. brasiliensis* (Pbr), *P. carotovorum* (Pcc), *P. betavascularum* (Pbet) e *Ralstonia solanacearum* (Rsol). Porto Alegre, RS, 2009.

180	MG-91	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	-	-	+	-	-	+
181	MG-92	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	-	-	+	-	-	+
182	MG-93	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	-	-	+	-	-	+
183	MG-94	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	-	-	-	+
184	MG-95	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	-	-	+	-	-	+
185	MG-96	Pouso Alegre	MG	Brasil	Monalisa	+	-	+	-	-	+
186	MG-97	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	+	-	-	+
187	MG-98	Pouso Alegre	MG	Brasil	Markies	+	-	-	-	-	-
188	MG-99	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	-	-	+	-	-	-
189	MG-100	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	-	-	-	-	-	-
190	MG-101	Pouso Alegre	MG	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	+
191	MG-102	Pouso Alegre	MG	Brasil	Cupido	+	-	-	-	-	+
192	MG-103	Pouso Alegre	MG	Brasil	Caesar	+	-	-	-	-	+
193	MG-104	Pouso Alegre	MG	Brasil	Asterix	-	-	+	-	-	+
194	RS1	S. Francisco de Paula	RS	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-
195	RS2	S. Francisco de Paula	RS	Brasil	Asterix	-	-	-	-	-	-
196	RS3	S. Francisco de Paula	RS	Brasil	Vivaldi	-	-	-	-	-	-
197	RS4	S. Francisco de Paula	RS	Brasil	Vivaldi	-	-	-	-	-	-
198	SC1	Criciúma	SC	Brasil	Ágata	-	-	-	+	-	+
199	SC2	Criciúma	SC	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	+
200	SC3	Criciúma	SC	Brasil	Ágata	+	-	-	+	-	+
201	SC4	Criciúma	SC	Brasil	Ágata	-	-	+	-	-	+
202	SC5	Criciúma	SC	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	+
203	SC6	Criciúma	SC	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	+
204	SC7	Criciúma	SC	Brasil	Ágata	-	-	-	+	-	+
205	SC8	Criciúma	SC	Brasil	Ágata	-	-	-	-	-	+
206	SC9	Criciúma	SC	Brasil	Ágata	+	-	-	-	-	-