

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

**DETECÇÃO DE *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* EM PLANTAS
DE BATATA ATRAVÉS DE PCR COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES A
PARTIR DE SEQUÊNCIAS DOS GENES *pnl* E *rdg***

**Aícha Daniela Ribas
Bióloga / UNISINOS**

**Dissertação apresentada com um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade**

**Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2007**

AGRADECIMENTOS

À Nossa Senhora, minha protetora, pela força interior que me rege, pela perseverança e força de vontade que emana em mim.

Ao professor Valmir Duarte, pela confiança, compreensão, incentivo e exemplo de vida.

Às doutoras Andréia Mara Rotta de Oliveira e Melissa Medeiros Markoski, importantes colaboradoras para o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas Janine Palma, Rita de Cássia Madail Santin, Marcus André Almança, Felipe André Sganzerla. Graichen, Juliana Dalmagro Pandolfo, Paula Guerra Schenato, Joseane Biso de Carvalho, Adriana de Andrade Figueiró, e demais colegas, pelo apoio e boa convivência nestes dois anos.

Ao meu marido Ronaldo, exemplo de amor incondicional, e minha filha Kami, razão do meu viver.

Aos meus pais, irmão e familiares, em especial a minha irmã Desire e sogra Vanda, pela colaboração nas horas em que mais necessitei.

A todos que de alguma forma colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido.

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*^{1/}

Autor: Aícha Daniela Ribas
Orientador: Valmir Duarte

RESUMO

A canela-preta, causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr), está entre as principais doenças bacterianas da batata. Estudos epidemiológicos desta doença dependem de métodos eficientes de detecção. Como a principal característica das pectobactérias é a produção de enzimas pectolíticas em grande quantidade, os genes *pnl* e *rdg*, relacionados à pectina liase foram selecionados para a projeção de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para Pcbr. Os alinhamentos das seqüências de nucleotídeos dos genes *pnl* e *rdg* mostraram a existência de seqüências conservadas entre as estirpes de Pcbr, a partir das quais foram projetados os *primers* PcbrPnlF/ PcbrPnlR e PcbrRdgF/PcbrRdgR, que geraram produtos de 130 e 180 pb, respectivamente. Para a avaliação dos *primers* e métodos de extração de DNA Total, 10 hastes de plantas de batata com sintomas de canela-preta, foram coletadas de cada uma de quatro lavouras (Ágata: 3, Asterix: 1) no município de São Francisco de Paula, RS. Pcbr foi detectada através de PCR com PcbrRdgF/PcbrRdgR e DNA extraído por fervura e FTACard em 25 e 55% das amostras, e com PcbrPnlF/ PcbrPnlR em 12 e 45%, respectivamente. Estes resultados indicaram que os *primers* PcbrRdgF/PcbrRdgR foram mais eficientes, tanto na extração com FTACard (22%) quanto por fervura (108%). A detecção por PCR com ambos pares de *primers* foi maior quando o DNA foi extraído pelo método FTACard.

^{1/} Dissertação de Mestrado em Fitotecnia Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (65p.) Março, 2007.

DETECTION OF *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* IN POTATO PLANTS THROUGH PCR WITH PRIMERS BASED ON *pnl* AND *rdg* GENE SEQUENCES.¹

Author: Aícha Daniela Ribas

Adviser: Valmir Duarte

ABSTRACT

Blackleg, caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr), is among the major bacterial diseases of potato. Epidemiological studies of this disease depend on efficient methods of detection. As the main trait of pectobacteria is the production of large amounts of pectolytic enzymes, genes *pnl* and *rdg*, related to pectin liase, were chosen to project *primers* specific to Pcbr. The nucleotide sequence alignments of the genes *pnl* and *rdg* showed the existence of conserved sequences among Pcbr strains. Primers PcbrPnlF/PcbrPnlR (130 bp product) and PcbrRdgF/PcbrRdgR (180 bp product) were designed based on them. To evaluate them and the total DNA extraction methods, 10 stems of potato plants, with blackleg, were harvested from each of four fields (Ágata: 3; Asterix: 1) in the São Francisco de Paula county, RS. Pcbr was detected through PCR with PcbrPnlF/PcbrPnlR and PcbrRdgF/PcbrRdgR primers and DNA extracted by boiling and FTACard in 25 and 55%, and in 12 and 45% of stems, respectively. These results indicated the PcbrRdgF/PcbrRdgR primers were more efficient with DNA extracted by both boiling (108%) and FTACard (22%). Pcbr detection using both primer sets was higher with DNA extracted by FTACard method.

¹ Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (65p.) March, 2007.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Cultivo da batata.....	3
2.1.1. Aspectos gerais.....	3
2.1.2. Batata-semente.....	5
2.1.3. Canela-preta	7
2.2. Principais características das <i>Pectobacterium</i> spp.....	8
2.3. Degradação das substâncias pécticas por enzimas extracelulares.....	9
2.4. Proposta de uma nova subespécie de <i>Pectobacterium carotovorum</i>	11
2.5. Caracterização de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>	13
2.6. Estratégias utilizadas na projeção de <i>primers</i>	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Estirpes	20
3.2. Extração de DNA.....	21
3.2.1. Lise alcalina	21
3.2.2. FTACard (Whatman).....	21
3.2.3. Fervura.....	22
3.3. Genes associados a características fenotípicas para projeção de <i>primers</i>	22
3.4. Reação de polimerização em cadeia (PCR) e <i>nested-PCR</i>	23
3.5. Eletroforese	23
3.6. Purificação dos produtos de amplificação	24
3.7. Sequenciamento dos fragmentos amplificados	25
3.8. Análises <i>in silico</i> (computacional) para seleção e projeção de <i>primers</i>	25
3.9. Projeção de <i>primers</i> para <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> ...	26
3.10. PCR com <i>primers</i> para <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>	26
3.11. Coleta de amostras de hastes de plantas de batata.....	27

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Amplificação das seqüências alvo-específicas.....	28
4.2. Análise <i>in silico</i>	30
4.2.1. Edição, alinhamento e análise das seqüências.....	30
4.2.2. Análise protéica das seqüências nucleotídicas	30
4.2.3. <i>Primers</i> para <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>	35
4.3. Detecção de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>	40
5. CONCLUSÕES.....	47

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Lista de estirpes de pectobactérias, hospedeiros, local e fornecedor. Porto Alegre, RS. 2007.....
2. Descrição dos genes *rdg* e *pnl* e respectivos *primers*, selecionados para projeção de *primers* específicos para Pcbr. Porto Alegre, RS. 2007.....
3. Concentrações e condições utilizadas na PCR para cada par de *primers*. Porto Alegre, RS. 2007.....
4. Concentrações e condições da PCR para cada par de *primers* específicos para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Porto Alegre, RS. 2007.....
5. Incidência de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) em tecidos internos sintomáticos de canela-preta de plantas de batata através de PCR com os *primers* PcbrPnl e PcbrRdg utilizando DNA extraído por fervura¹ e FTACard². Porto Alegre, RS. 2007.....

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Amplificação de fragmentos de DNA com o *primers* PnlF/PnlR para o gene *pnl*. M, marcador 100pb Ladder; 1, água; 2, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 1442; 3, *P. atrosepticum* (Eca 31); 4, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) 8; 5, Pcbr 212; 6, Pcbr 371; 7, Pcbr MB9; 8, Pcbr MB11; 9, Pcbr MB12.....
2. Amplificação de fragmentos de DNA com os *primers* RdgF/RdgR para o gene regulador de pectina liase. M, marcador 1Kb plus; 1, água; 2, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 1442; 3, *P. atrosepticum* (Eca 31); 4, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) 8; 5, Pcbr 212; 6, Pcbr 371; 7, Pcbr MB9; 8, Pcbr MB11; 9, Pcbr MB12.....
3. Alinhamento múltiplo das seqüências parciais correspondentes ao gene *pnl*, obtidas com os *primers* PnlF/PnlR de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* 8, 212, 371, MB11, e as seqüências de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. atrosepticum* selecionadas do GenBank com as mutações silenciosas evidenciadas pelos retângulos.....
4. Alinhamento múltiplo das seqüências parciais correspondentes ao gene *rdg*, obtidas com os *primers* RdgF/RdgR de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* 212 e MB12, e as seqüências de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. atrosepticum* selecionadas do GenBank com as mutações silenciosas evidenciadas pelos retângulos.....
5. Alinhamento das seqüências parciais do gene *pnl* de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* 371, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e a posição dos *primers* evidenciadas pelos retângulos, PcbrPnlF e PcbrPnlR. Porto Alegre, RS. 2007.....

6. Alinhamento das seqüências parciais do gene *rdg* de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* MB12, *P. atrosepticum* e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e a posição dos *primers* evidenciada pelos retângulos, PcbrRdgF e PcbrRdgR. Porto Alegre, RS. 2007.....
7. Perfil eletroforético dos produtos da PCR utilizando os *primers* PcbrPnlF/PcbrPnlR do gene *pnl* (pectina liase). M, marcador; 1, água, 2, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) 8; 3, Pcbr 212; 4, Pcbr371; 5, PcbrMB9; 6, Pcbr MB11; 7, Pcbr MB12; 8, *P. atrosepticum* (Eca 31); 9, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc 1442); 10, Pcc Ag8.....
8. Perfil eletroforético dos produtos da PCR utilizando os *primers* PcbrRdgF/PcbrRdgF para o gene *rdg* (regulador de pectina liase). M, marcador 100 pb ladder; 1, água, 2, *P. atrosepticum* (Eca 31); 3, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) 8; 4, Pcbr 212; 5, Pcbr 371; 6, Pcbr MB9; 7, Pcbr MB11; 8, Pcbr MB12; 9, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc 1442); 10, Pcc Ag8.....
9. Perfil eletroforético dos produtos da PCR com os *primers* para Pcbr utilizando DNA extraído pelos métodos de fervura¹ e FTACard² de tecidos internos sintomáticos de canela-preta de plantas de batata. **PcbrPnl: A**, fervura; **B**, FTACard **PcbrRdg: C**, fervura; **D**, FTACard. Porto Alegre, RS. 2007.....
10. Perfil eletroforético dos produtos da PCR com os *primers* para *Pectobacterium atrosepticum* utilizando DNA extraído por FTACard de tecidos internos de hastes de plantas de batata com canela-preta. Porto Alegre, RS. 2007.....

1. INTRODUÇÃO

A canela-preta é uma doença cujo agente é transmitido por tubérculos de batata e em regiões temperadas é atribuída especificamente à *Pectobacterium atrosepticum* (Pa). Embora o tubérculo possa ser contaminado por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), este patógeno não é considerado agente de canela-preta, pois não induz ao aparecimento da pigmentação negra na haste a partir de infecções do tubérculo-semente. Levantamentos realizados em lavouras gaúchas de batata-semente mostraram a ausência de *P. atrosepticum*. Além disso, uma nova subespécie, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) foi identificada, associada à canela-preta.

A presença de pectobactérias na batata-semente, embora esta não seja a única fonte de inóculo, é muito importante, pois está diretamente relacionada à quantidade de doença que se desenvolverá no campo. A canela-preta numa lavoura também pode ocorrer pela bactéria se disseminar na zona radicular e contaminar os tubérculos em desenvolvimento, mesmo na ausência de sintomas da doença.

A indexação dos tubérculos para determinar a ausência do patógeno, bem como, estudos epidemiológicos desta doença, dependem de métodos eficientes de detecção. Através da análise do DNA e do desenvolvimento de oligonucleotídeos

iniciadores (*primers*), isto pode ser realizado sem haver a necessidade de isolar o patógeno. No entanto, o perfil das pectobactérias ocorrentes em batata no Brasil mostra diferenças quando comparados àquelas ocorrentes em outros países, tornando a utilização das ferramentas existentes de detecção inadequadas tanto para programas de certificação de batata-semente quanto para estudos epidemiológicos da canela-preta.

Considerando a necessidade de uma ferramenta precisa, *primers* específicos para detecção de Pcbr foram projetados utilizando o sítio de restrição da endonuclease *SexI*, da região IGS de Pcbr aparentemente ausente nas outras subespécies e espécies de pectobactérias. Mas quando estes *primers* foram utilizados na PCR com um número maior de estirpes, algumas estirpes de Pcc mostraram o mesmo padrão eletroforético. O mesmo ocorreu com os *primers* projetados para o gene *recA*, um marcador molecular utilizado na identificação de patógenos bacterianos, que não apresentou especificidade com Pcbr, apesar da PCR-RFLP com as endonucleases *HhaI* e *TaqI* evidenciar grupos distintos, principalmente para Pcbr.

Portanto, os objetivos desta pesquisa foram projetar *primers* específicos para Pcbr, a partir de seqüências dos genes *pnl* e *rdg*, e avaliar a eficiência destes, para detecção em plantas de batata utilizando dois métodos de extração de DNA em teste, FtaCard (Whatman) e fervura, que também serão avaliados quanto a eficiência.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultivo da batata

2.1.1. Aspectos gerais

A batata (*Solanum tuberosum* L.), pertencente à família das Solanáceas, é originária da América do Sul, especificamente do Peru e da Bolívia. É uma cultura considerada sensível quanto ao clima, exigindo dias quentes e principalmente noites frias. Foi introduzida no Brasil por colonizadores europeus, inicialmente na Região Sul, onde as condições climáticas eram mais favoráveis à produção (Pereira & Daniels, 2003).

Apesar do cultivo da batata estar relacionada geograficamente a regiões de clima ameno, verificou-se nos últimos anos uma mudança no mapa produtivo, pois tem ocorrido em regiões mais quentes, como as regiões do estado de Goiás, Bahia e em algumas zonas do Nordeste. Esta alteração foi possibilitada pela utilização de novas tecnologias, e implantação de novas variedades bem como a mudança fundiária e de gerenciamento das propriedades. No entanto, as condições climáticas também interferem no aumento dos custos de produção, pelo aumento da necessidade do uso de insumos (ABBA, 2007).

Neste sentido, pesquisa foi realizada para caracterizar as melhores regiões climáticas para o cultivo de batata no Brasil. Sendo destacadas as áreas mais altas do RS, SC, PR, parte de SP e MG como as mais propícias ao cultivo. Em determinadas áreas de outros estados, como Bahia e Goiás, a batata está sendo plantada, como citado anteriormente, mas requerem irrigação e maiores cuidados tecnológicos (Wrege et al., 2004).

Atualmente, o Brasil possui 141 mil hectares de área destinada à plantação de batata, compreendendo as regiões Nordeste (CE, PB, PE, SE, BA), Sul (PR, SC, RS), Centro Oeste (MT, GO, DF) e Sudeste (MG, ES, RJ, SP), com 3.118.420 milhões de toneladas e produtividade média em torno de 22 t/ha em duas ou três safras anuais. A região Sudeste possui a maior área cultivada, cerca de 68 mil hectares e uma produção de 1.709.252 milhões de toneladas. Entre os principais estados produtores do Brasil estão Minas Gerais (948,955 t), São Paulo (751.460 t), Paraná (575.691 t) e o Rio Grande do Sul (292.457 t) (IBGE, 2007).

O Rio Grande do Sul, um dos estados precursores da produção de batata no Brasil, apresenta hoje 25 mil hectares de área cultivada, e uma produção de 292 mil t. Esta produtividade, quando comparada com outros estados brasileiros como a Bahia, que apresenta 4.100 hectares plantados e uma produção de 132 mil t é considerada baixa (IBGE, 2007; ABBA, 2007).

A baixa produtividade deste Estado se deve, em grande parte, a carência de cultivares resistentes às doenças típicas da região (Benelli et al., 2004) e a baixa qualidade fitossanitária da batata-semente utilizada para o cultivo (El Tassa & Duarte, 2004).

2.1.2. Batata-semente

A batata é uma cultura que se propaga por tubérculos chamados batata-semente, embora existam as sementes para plantio (Colmer & Keen, 1986). A Europa foi e continua sendo um grande fornecedor de material básico para multiplicação. No entanto, o Brasil, desde a década de 80, vem trabalhando no sentido de possibilitar um sistema de certificação de batata-semente, onde o produtor é o principal interessado em produzir o seu material de plantio (ABBA, 2007).

Atualmente, o Brasil é amparado por legislação específica, que procura propiciar, ao segmento produtor, meios e adequações para que se possa cada vez menos necessitar de importações de batata-semente e produzir em território nacional materiais para plantio com excelente qualidade fitossanitária e genética (ABBA, 2007). Neste sentido, a produção e comercialização de batata-semente passam por normas, padrões e procedimentos específicos para esta cultura. As batatas-semente são produzidas e classificadas nas categorias: genética, básica, certificada de primeira e segunda geração e S1 e S2. A categoria de semente básica é a autorizada para multiplicação por quatro gerações. A categoria básica G0 representa os minitubérculos, G1, G2 e G3 da primeira colheita a terceira, e ainda as certificadas de terceira e quarta geração, representando a quarta e quinta colheita a campo (Normas de produção de batata-semente, ABBA, 2007).

O processo de produção de material propagativo pré-básico de batata que envolvem sistemas hidropônicos, tem trazido um aumento substancial na taxa de multiplicação de minitubérculos, reduzindo os custos de produção e reduzindo

os riscos de contaminação por patógenos de solo (Pereira & Daniels, 2003). Contudo, esta forma de propagação favorece a ocorrência e a contaminação dos minitubérculos por patógenos se estes estiverem presentes no material de origem, possibilitando a associação assintomática deste patógeno com a planta, tornando a batata-semente a principal via de disseminação para as áreas produtoras (Colmer & Keen, 1986).

Os tubérculos de batata-semente são considerados uma das mais importantes fontes de inóculo. O plantio de batata-semente favorece a disseminação de vários patógenos, entre eles as pectobactérias, ocasionando a rápida maceração dos tubérculos (podridão-mole) ou dos tecidos da haste (canela-preta) comprometendo a formação, o número, a qualidade dos tubérculos e o volume de raízes (Colmer & Keen, 1986; Pirhonen et al., 1991). As pectobactérias podem sobreviver por longos períodos em estado latente, podendo estar presentes nas lenticelas, em ferimentos suberizados ou nos tecidos vasculares (estolão) da batata-semente (Pérombelon & Kelman, 1980).

Estudo realizado para avaliação da reação de cultivares de batata à podridão-mole causada por bactérias do gênero *Pectobacterium* verificou que a variedade Asterix mostrou-se menos suscetível à podridão-mole, diferindo significativamente das demais (Benelli et al., 2004).

Os danos causados nos tubérculos e nas plantas por *Pectobacterium* spp. são especialmente importantes na produção de batatas no Brasil, prejudicando sensivelmente a comercialização (Goyer et al., 1998). Em alguns casos, o processo infeccioso pode começar antes da colheita, provocando perdas em campo estimadas entre 10-40%. Porém, quando o dano se verifica durante o

armazenamento do tubérculo-semente pode chegar a 100%, o que a torna uma das principais culturas no uso de insumos protetores, para assegurar a qualidade e produtividade (Lopes & Takatsu, 1997).

A grande problemática da canela-preta está relacionada à colheita e a distribuição para plantio de batatas-semente, que aparentemente parecem estar livres do patógeno, mas ao encontrarem condições favoráveis passam do estado latente para o desenvolvimento e multiplicação, causando doença. Além disso, a podridão do tubérculo dissemina a bactéria no ambiente e contamina o solo, comprometendo a produção (Pérombelon & Kelman, 1980).

2.1.3. Canela-preta

A canela-preta causada por *Pectobacterium* spp. inicia-se a partir da batata-semente contaminada, onde podem permanecer em estado latente até encontrarem condições adequadas para o desenvolvimento, como a disponibilidade de água livre. Nestas condições, as bactérias se multiplicam, sobem pelo sistema vascular, e causam extensa maceração no local onde o tecido é infectado (Pérombelon & Kelman, 1987). A habilidade de maceração está relacionada à capacidade de produção de enzimas pectolíticas, como citado anteriormente (Colmer & Keen, 1986; Pirhonen et al., 1991; Jafra et al., 1999).

Os sintomas da doença são reconhecidos pelo enegrecimento dos tecidos do colo das plantas. Em casos graves, a batata-semente inteira e os brotos apodrecem antes da emergência, resultando numa população desuniforme de plantas na lavoura. Em pós-emergência, a base da haste das plantas doentes apresenta uma podridão marrom-clara à negra que se estende haste acima entre

2 a 50 cm. As folhas de plantas infectadas tendem a enrolar-se para cima, tornam-se amareladas e murcham. As plantas parecem rígidas e, se a doença ocorrer no início da estação de plantio, ficam enfezadas (Gudmestad & Secor, 1993).

Vários fatores podem influenciar no surgimento dos sintomas, tais como a temperatura, umidade, oxigênio, resistência e virulência. Postula-se ainda que a ocorrência da canela-preta esteja relacionada com o nível de contaminação por *Pectobacterium* spp. (Pérombelon, 1992).

Em países de clima temperado, onde a doença tem grande ocorrência, *P. atrosepticum* (Pa) é considerada a única capaz de induzir os sintomas típicos da canela-preta a partir de batatas-semente contaminadas. *Dickeya chrysanthemi* (Dc) está distribuída em zonas temperadas, tropicais e subtropicais e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), está distribuída em zonas tropicais e subtropicais. Contudo, estas duas bactérias podem estar presentes no tecido infectado, dependendo principalmente da temperatura (De Boer, 2002).

2.2. Principais características das *Pectobacterium* spp.

As *Pectobacterium* fazem parte da família Enterobacteriaceae, formando um heterólogo grupo de bactérias fitopatogênicas Gram-negativas. Existem quatro grupos de *Pectobacterium* economicamente importantes causadores de doenças em batatas são eles: Pcc e Pa (Gardan et al., 2003), Dc (Pérombelon & Kelman, 1987; Pérombelon, 2002; Toth et al., 2003; Samson et al., 2005) e mais recentemente, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) (Duarte et al., 2004). São descritas como bastonetes retos, medindo de 0,5-1,0 X 1,3-3,0 µm, móveis por meio de flagelos peritricos, Gram negativas, não formadoras de

esporos, anaeróbicas facultativas, oxidase negativa e catalase positiva (Krieg & Holt, 1984; Duarte, 1999).

A principal característica das pectobactérias é a produção de enzimas extracelulares em grande quantidade. Isto ocasiona a rápida maceração e o colapso dos tecidos pela degradação das substâncias pécticas ocasionando maceração dos tubérculos (podridão-mole), dos tecidos da haste (talo oco) ou dos tecidos do colo da haste (canela-preta) (Colmer & Keen, 1986; Pirhonen et al., 1991).

2.3. Degradação das substâncias pécticas por enzimas extracelulares

As substâncias pécticas, polissacarídeos ácidos de elevado peso molecular, constituídas por unidades de ácido D-galacturônico, ocorrem em praticamente todas as plantas superiores, nas quais se encontram, principalmente, sob a forma de protopectina na lamela média da parede primária e na membrana celular (Pimenta, 2000). Várias funções são atribuídas às pectinas, tais como determinação da porosidade da parede celular e controle do trânsito de macromoléculas, adesão celular, hidratação através da formação de géis, plasticidade e flexibilidade da parede durante o crescimento e participação em mecanismos de defesa da planta ao ataque de patógenos (Mccann et al., 1994; Côté & Hahn, 1994; Silva & Braga, 2004).

As enzimas pectolíticas produzidas naturalmente por bactérias constituem um grupo complexo com capacidade de hidrolizar as substâncias pécticas. São classificadas em: Pectato liases (Pel), pectina liases (Pnl),

poligalacturonases (Peh) e pectina metil-esterases. As celulases (Cel) e as proteases (Prt) auxiliam na atividade pectolítica (Colmer & Keen, 1986; Hugouviex-Cotte-Pattat et al., 1996; Eriksson et al., 1998; Pérombelon, 2002; De Boer, 2003). A penetração dos tecidos vegetais por pectobactérias, e sua subsequente colonização, freqüentemente envolvem a degradação de polissacarídeos da parede celular através da liberação de várias hidrolases, sendo as pectinases as primeiras polissacaridases a serem produzidas nos tecidos infectados (Fraissinet-Tachet & Fevre, 1996).

As pectina liases (Pnl), também chamadas de metil-transeliminases rompem ligações glicosídicas, resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 (Kayshap et al., 2001). A produção desta enzima ocorre em pectobactérias em resposta a agentes que quebram ou inibem a síntese do DNA, como a luz UV, a mitomicina C, o ácido nalidíxico, e o meio bleomicina (Chatterjee et al., 1991), diferente do que ocorre em Peh e Pel, as quais são ativadas por componentes das plantas ou pelos genes reguladores *aepA*, *aepB* e *aepH* (Nguyen et al., 2002). A produção de Pnl é acompanhada pela lise celular e pela produção de carotovomicina (Ctv), sendo controlados por mecanismos que requerem RecA e dois reguladores de proteínas, RdgA e RdgB (McELOY et al., 1992; Liu et al., 1997). A produção de enzimas também é termodependente, requerendo uma temperatura ótima para a produção de Pnl à 30 °C e para produção de Ctv e lise celular à 23 °C (Nguyen et al., 2002).

2.4. Proposta de uma nova subespécie de *Pectobacterium carotovorum*

Estudos sobre a sintomatologia da canela-preta relacionados à diversidade, ecologia e caracterização molecular de *Pectobacterium* spp., revelaram uma grande variabilidade na estrutura intra e interespecífica de suas populações (Powelson, 1980; Powelson & Apple, 1984; Oliveira et al., 2003). Além disso, a existência de variação fenotípica dentro de uma espécie, faz com que isolados se diferenciem por poucas características da descrição padrão de uma espécie, mesmo sendo membro desta (Jabuonski et al., 1986). Por este motivo, métodos bioquímicos, fenotípicos e sorológicos existentes não são suficientes para a identificação precisa de espécies e subespécies causadoras de canela-preta, principalmente aquelas que apresentam características intermediárias (Pérombelon, 2002).

Pesquisa realizada no Rio Grande do Sul, a fim de identificar as espécies e subespécies de pectobactérias associadas a plantas com sintomas de canela-preta, resultou na obtenção de 408 isolados (Oliveira et al., 2003). Dentre estes, 55, 42 e 1% foram identificados com base em características bioquímicas como Pa, Pcc e Dc. respectivamente, e 2% apresentaram perfis atípicos que não corresponderam ao padrão bioquímico e fisiológico de nenhuma espécie ou subespécie (Oliveira et al., 2003). Neste mesmo estudo, estas estirpes foram testadas com o auxílio de *primers* específicos para Pa (De Boer et al., 1995; Frechon et al., 1998) utilizando o DNA da estirpe-controle de Pa e estirpes coletadas a campo como molde. O DNA da estirpe controle gerou produtos de amplificação, no entanto, o DNA das estirpes

identificadas como Pa, coletadas em lavouras do Rio Grande do Sul, não foi amplificado (Oliveira et al., 2003).

Em estudo posterior, análises de estirpes de Pa, coletadas em diferentes regiões do Brasil, demonstraram que estas estirpes apresentam diferenças bioquímicas, fisiológicas e genéticas, em relação a estirpes típicas da bactéria, que ocorrem em países como o Canadá e outros situados no continente Europeu (Duarte et al., 2004). Além disso, os *primers*, sondas de DNA e antissoros, disponíveis no mercado, desenvolvidos a partir do genoma de estirpes que ocorrem em países de clima temperado, não detectaram as estirpes brasileiras, impossibilitando o uso dessas ferramentas em programas de certificação de batata-semente.

Neste sentido, haviam controvérsias sobre o agente causal da canela-preta no Brasil. *Pectobacterium atrosepticum* é citada como a responsável pelos sintomas típicos da canela-preta em regiões de clima frio, Pcc e Dc também podem estar presentes em plantas sintomáticas (Pérombelon & Kelman, 1987). Entretanto, estudos no Brasil indicaram a ausência da Pa e a presença de uma nova subespécie como agente causal desta doença (Duarte, 1999; Duarte et al., 2004; El Tassa & Duarte, 2004).

A bactéria que causa canela-preta no Brasil difere das demais pectobactérias. Para determinar com exatidão a identidade destas estirpes atípicas, identificadas anteriormente como Pa, foi realizado extenso estudo, obtendo como resultados diferenças nos perfis genéticos, bioquímicos, fisiológicos e sorológicos. Pelo conjunto de dados, foi sugerida uma nova subespécie *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Duarte et al., 2004). Em continuidade,

levantamento realizado em tubérculos-semente produzidos no RS mostrou uma alta incidência de Pcbr e a ausência de Pa, até então considerada o agente causal da canela-preta no Brasil (El Tassa & Duarte, 2004).

2.5. Caracterização de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

As espécies de *Pectobacterium* possuem uma vasta distribuição geográfica, estando diretamente relacionadas à ampla gama de hospedeiros e a fatores ambientais. Em função dos seus mecanismos de sobrevivência e de patogenicidade, estes fatores desencadeiam a grande diversidade das espécies e subespécies deste gênero (Pérombelon & Kelman, 1987). A existência de diferenças fenotípicas e genéticas importantes entre essas populações, tornou imprescindível a caracterização dos isolados ocorrentes no Brasil (Oliveira, 2001; Oliveira et al., 2003).

Neste sentido, foi realizada a caracterização fenotípica que diferenciou Pcbr das demais subespécies de Pc e Dc. As estirpes de Pcbr foram identificadas pela formação de ácidos a partir de α -metil-glicosídeo, D-galacturônico, D-sacarídeo, L-glutâmico, ácido succinâmico e por substâncias redutoras de sacarose, como também, por não utilizarem psicose, Tween-40 e Tween-80.

A comparação em percentual da utilização de fontes de carbono entre Pcc e Pcbr revelou as seguintes diferenças, (20/69) ácido D,L-lático, (60/0) glucose 1-phosphate, (0/94) ácido D,L-lático, (0/81) α -metil D-glucosídeo, (0/94) palatinose, (100/6) psicose, (100/38) inosina, (100/38) timidina e (60/0) Tween-80. Pcb oxida 22 fontes de carbono não metabolizadas por Pcbr, e Pco apesar de semelhante, difere

pela utilização de D-arabitol, 3-metilglucose e timidina-5'-monophosphate. O dendograma baseado na análise numérica usando o coeficiente da distância euclidiana e UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Average) de 96 fontes de carbono testadas revelou que as estirpes Pcbr constituem um grupo interno, heterogêneo, separado de Pcb e de Dc, mas próximo a Pcc (Duarte et al., 2004). *Pectobacterium atrosepticum* foi caracterizada pela produção de ácido e substâncias redutoras a partir de α -metil-glucosídeo e sacarose, todas as estirpes testadas utilizaram D-galactônico ácido lactone, ácido D-glucônico, uridina e timidina, enquanto somente 12-38% das estirpes de Pcbr os utilizaram.

Em continuidade, o anticorpo monoclonal 4F6 específico para lipopolissacarídeos do serogrupo I, principal tipo sorológico de Pa, foi testado por ELISA, e não apresentou afinidade com as estirpes brasileiras. Da mesma forma a análise de ácidos graxos agrupou separadamente Pa de Pcbr (Duarte et al., 2004).

Outra característica de extrema importância na identificação e diferenciação desta subespécie foi o crescimento a 37 °C (Oliveira et al., 2003; Duarte et al., 2004), pois Pa não cresce a esta temperatura, tendendo a causar canela-preta em temperaturas inferiores a 25 °C (Pérombelon & Kelman, 1980). Em levantamentos anteriores, estirpes que apresentavam características semelhantes a Pa, mas crescimento a 37 °C eram classificadas como formas intermediárias, atípicas ou não identificadas (Jabuonski et al., 1986). Provavelmente pela falta de ferramentas de detecção e escassez de informações relacionadas ao clima tropical (Duarte & El Tassa, 2003; Duarte et al., 2004).

A virulência e a patogenicidade de Pcbr e Pa foram comparadas através da inoculação de hastes de plantas de batata. Os sintomas de canela-preta

apareceram após três e sete dias, respectivamente. Em continuidade, testou-se a capacidade de maceração em batata e pimentão. As estirpes brasileiras induziram maior área de maceração em menor tempo, indicando que estas são mais virulentas que as estirpes de Pa (Duarte et al., 2004).

Visto o grau de virulência apresentado por estirpes de Pcbr, em circunstâncias apropriadas, foi sugerido que estas possuem capacidade de disseminação para outras regiões, podendo não se limitar geograficamente (Duarte et al., 2004). A análise fitossanitária de tubérculos importados do Chile e da Argentina apontou a ausência de Pa e a presença de Pcbr, confirmando que a predominância desta subespécie pode não estar restrita apenas ao Brasil, mas distribuída pela América do Sul (Rommel et al., 2002). Além disso, pesquisas em andamento indicam que Pcbr pode estar presente nos Estados Unidos e na Europa causando sintomas de canela-preta (Comunicação pessoal Solke, 2006).

A caracterização molecular de estirpes de Pcbr foi realizada a partir das técnicas de ERIC-, BOX- e REP-PCR, indicando a formação de um grupo homogêneo e distinto das demais subespécies de pectobactérias, sendo o último marcador o mais adequado para mostrar esta característica (El Tassa & Duarte, 2003). Estudos posteriores, envolvendo a análise da PCR-RFLP com as endonucleases de restrição *TasI* e *HhaI*, mostraram sete e 12 padrões diferentes de clivagem do DNA. A combinação dos resultados permitiu a separação das estirpes de *Pectobacterium* em 13 grupos distintos, bem como a discriminação de Pcbr (El Tassa & Duarte, 2006). Recentemente, a homologia de DNA com a mesma subespécie e as demais espécies e subespécies indicou 95-100% de similaridade entre Pcbr, 80% com Pcc, 72% com Pco, 45% com Pa, 35% com Pcb, e 18% com

Pcw e Dc e menos de 5% para *P. carnegiana*, *P. cacticida*, e *P. cycprapedii* (dados não publicados). As informações geradas indicam que as estirpes brasileiras formam uma nova subespécie com um alto grau de virulência e com capacidade de disseminação para outras áreas geográficas.

2.6. Estratégias utilizadas na projeção de *primers*

A biologia molecular tem causado uma mudança significativa nas formas e técnicas utilizadas na caracterização e identificação de fitopatógenos. Ferramentas moleculares para detecção, baseadas em PCR, utilizam *primers* específicos que flanqueiam a região a ser amplificada, sendo responsáveis pela sensibilidade da reação (Moura et al., 2005).

Inúmeros *primers* têm sido desenvolvidos a partir de regiões genômicas, sendo amplamente utilizados em fitopatologia, visando estudos de caracterização, diversidade genética e detecção de patógenos. Para tanto, busca-se estratégias envolvendo seqüências específicas de DNA mitocondrial, plasmidial, RNA ribossomal (rDNA) e genes associados a características fenotípicas (Lows et al., 1999).

A análise da região 16S rDNA de *Pectobacterium* spp. mostrou que estas possuem seqüências bastantes similares. No entanto, a comparação destas seqüências permitiu observar pequenas alterações de regiões do gene supostamente alteradas durante a evolução, potencialmente úteis para projeção de *primers* (Lows et al., 1999). A comparação de seqüências do gene 16S rDNA entre *Pectobacterium* spp. tem resultado na projeção de inúmeros *primers* (Know et al., 1997). Os *primers* universais SR3F e SR1cR foram projetados a partir de uma

região conservada do gene 16S rDNA entre Enterobacteriaceae para detecção de *Pectobacterium* spp. gerando um produto de 119 pb (Toth et al., 1999).

Entretanto, alguns iniciadores não possuem especificidade suficiente gerando produtos inespecíficos, amplificando fragmentos de DNA de outros gêneros de enterobactérias ou falhando na amplificação do DNA de estirpes de *Pectobacterium* spp. O oligonucleotídeo iniciador BR1f foi projetado com base na região IGS com base na enzima de restrição SexA1 de Pcbr, e utilizado juntamente com o oligonucleotídeo L1r para detecção de estirpes desta subespécie através de PCR (Duarte et al., 2004). Porém, quando estes *primers* foram testados com um número maior de estirpes não apresentaram especificidade, produzindo o mesmo perfil eletroforético para algumas estirpes de Pcc. A falta de especificidade pode ser explicada pela presença de um sítio de restrição da enzima SexA1 na mesma posição que Pcbr em outras estirpes (Duarte et al., 2004; El Tassa & Duarte, 2006)

O gene *recA*, que codifica a enzima recombinase A, uma proteína multifuncional envolvida na recombinação homóloga, reparo do DNA e na resposta SOS (Eisen, 1995), foi utilizado para projeção dos *primers* (*recAF/recAR*) para detecção de Pcbr. No entanto, estes não apresentaram especificidade, quando foram utilizadas, na PCR, temperaturas de anelamento que variaram entre 47-60 °C, obtendo produtos de amplificação tanto para estirpes de Pcbr como para Pcc. Em temperaturas superiores a 60 °C estas estirpes também não apresentaram produto de amplificação. A falta de especificidade desses *primers* foi explicada pelo uso da endonuclease de restrição HhaI, pois o oligonucleotídeo iniciador *recAF* foi projetado a partir de uma região que continha um sítio de restrição em outras *pectobactérias* (El Tassa & Duarte, 2006).

As pectobactérias produzem um arsenal de enzimas extracelulares importantes para virulência, como as pectinases (Colmer & Keen, 1986; Hugouviex-Cotte-Pattat et al., 1996; Eriksson et al., 1998; Pérombelon, 2002). Este complexo de enzimas apresenta diferenças entre as *Pectobacterium* spp. variando na produção, regulação e secreção, em tipo e número, (Ried & Collmer, 1986; Ward & De Boer, 1994). Neste sentido, genes relacionados a patogenicidade e virulência foram analisados em busca de seqüências gênicas específicas para projeção de *primers* em nível de gênero, espécie e subespécie de pectobactérias. A detecção de estirpes de *Pectobacterium carotovorum* foi realizada utilizando os *primers* específicos (Y1/Y2) projetados de uma região específica do gene pectato liase (*peB*), das estirpes testadas todas as *P. carotovorum* amplificaram produtos de 434 pb com exceção da subespécie *betavascolorum* (Darrasse et al., 1994; Helias et al., 1998). Para detecção de Pa o par de *primers* ERWFOR/ATROREV foram projetados baseados nos genes *prt* que codifica a enzima extracelular metalo-protease auxiliando na atividade das pectinases (Smid et al., 1995).

Os genes que codificam reação de hipersensibilidade (*hrpN*) (Dellagi et al., 2000), pectato liase (*peB*) (Frechon et al., 1998) e (*peA-peD-peE*) (Nassar et al., 1996), pectina liase (*pnl*) e (*rdg*) (Dellagi et al., 2000), regulação e exoenzimas (*rsmA*) (Yap et al., 2004), sistema de secreção tipo II (*outH*) (Yap et al., 2004), regulação de protease e celulase (*rpf*), foram estrategicamente adotados para projeção de *primers* específicos para pectobactérias (Palma, 2006).

O uso das estratégias envolvendo DNA plasmidial, mitocondrial, RNA ribossomal (rDNA) e genes que codificam características fenotípicas para projeção de iniciadores poderão permitir especificidade e segurança na detecção de

fitopatógenos, obtendo-se melhor entendimento de um patossistema e, conseqüentemente, a obtenção de uma maior eficiência no controle de doenças economicamente importantes (Moura et al., 2005; Santana et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estirpes

As estirpes de pectobactérias utilizadas para projeção dos *primers* estão listadas na Tabela 1, e fazem parte do banco de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Fitobacteriologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Estas estirpes foram cultivadas em meio CPG (casamino ácido, 1; peptona, 10; glicose, 10; agar, 18 g/l) (De Boer & Kelman, 2001), incubadas a 28 °C por 24 h e armazenadas em água destilada esterilizada (ADE) a 4 °C e glicerol-água (15:85) a -20 °C.

TABELA 1. Lista de estirpes de pectobactérias, hospedeiros, local e fornecedor. Porto Alegre, RS. 2007.

Espécies/Subespécie/Estirpes	Hospedeiro	Origem	Fonte
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> Eca 31	Batata	Canadá	S.H. De Boer ¹
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> 8, 212T, 371, MB9, MB11, MB12	Batata Batata	Rio Grande do Sul, BR Rio Grande do Sul, BR	Duarte, V. ³ El Tassa, S.O.M. ³
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 1442, PMAB 19, MPB8, AG8, ABOB65, 06, 05, 46, 50, 41, AG29, 48, 47, P41	<i>Dianthus caryophyllus</i> L. Batata Pimenta Abóbora Batata Mandioquinha Mandioquinha	São Paulo, BR Rio Grande do Sul, BR Bahia, BR Distrito Federal, BR Distrito Federal, BR Distrito Federal, BR São Paulo, BR	Henz, G. P. ² El Tassa, S.O.M. ³ Henz, G. P. ² Henz, G. P. ² Henz, G. P. ² Henz, G. P. ² Henz, G. P. ²

¹Canadian Food Inspection Agency, Canadá;

²Embrapa Hortaliças, Brasília, DF;

³UFRGS, Porto Alegre, RS.

3.2. Extração de DNA

3.2.1. Lise alcalina

Para extração de DNA utilizou-se protocolo adaptado de De Boer & Ward (1995). Células de culturas bacterianas cultivadas em meio CPG durante 24-48 h, foram suspensas em 250 µl de tampão de extração de DNA (100mM tris-HCl pH 8,0; 25mM EDTA; 1% SDS e 5 µg de proteinase K), e incubadas por 3 h a 56 °C. As amostras foram acrescidas de 250 µl de acetato de amônio 7,5M e centrifugadas a 14.000 g em temperatura de 4 °C. O sobrenadante contendo o DNA foi coletado, precipitado com 1 volume de isopropanol e lavado com etanol 70%, seco e ressuspendido em 50 µl de água (MiliQ) e 5µl de RNase e armazenado a -20 °C. A concentração de DNA foi estimada por visualização em eletroforese em gel de agarose.

3.2.2. FTACard (Whatman)

Conforme as recomendações do fabricante, fragmentos de 1 cm² de cartões FTACard (Flinders Technology Associates, Classic Card) foram pressionados diretamente sobre os tecidos internos sintomáticos de canela-preta de plantas de batata. Após 3h, tempo necessário para aduir às amostras nas fibras de papel. Discos de 1,2 mm de diâmetro foram retirados e transferidos para microtubos de PCR (0,2 ml) utilizando um cortador (*Harris*). Os discos foram tratados em 200 µl do reagente de lavagem (*FTA purification reagent*) por 15 min. Após a inserção o conteúdo foi removido e desprezado, e o processo repetido. Posteriormente os discos recebem mais dois tratamentos de 200 µl do tampão TE⁻¹ (10mM tris-HCl,

0,1mM, EDTA, pH8,0) por 5 min. Após os tratamentos o tampão foi desprezado e os discos permaneceram em temperatura ambiente durante 1 h.

3.2.3. Fervura

Amostras constituídas de tecido interno de hastes semi-maceradas foram transferidas para microtubos de 1,5 ml contendo 800 µl de água destilada esterilizada foram submetidas à fervura em banho-maria durante 5 min. Após a fervura os tubos foram mantidos no gelo para o uso imediato de 1 µl por reação na PCR (Mohran et al., 1998).

3.3. Genes associados a características fenotípicas para projeção de *primers*

Características fenotípicas relacionadas as pectobactérias e a outras bactérias da família Enterobacteriaceae foram analisadas na busca de genes para projeção de *primers*. Com base em trabalho realizado por Palma (2006), os genes *pnl* e *rdg* relacionados à produção de enzimas pectolíticas foram selecionados para este trabalho e submetidos a PCR (Tabela 2), para verificação de perfil eletroforético.

TABELA 2. Descrição dos genes *rdg* e *pnl* e respectivos *primers*, selecionados para projeção de *primers* específicos para Pccr. Porto Alegre, RS. 2007.

Espécie fonte	Gene	Característica	Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	Fragmento (pb)	Acesso ao GenBank
Pcc	(<i>rdg</i>)	Regulador de Pectina lyase	RdgF 5'-GATTGGCGTATCTCAGGCCG-3' RdgR 5'-CGACCAGAAGCTCGGGACC-3'	1160	L32173
Pcc	(<i>pnl</i>)	Pectina lyase	PnlF 5'-CGGGAGGTAAAGTCGTTACGG-3' PnlR 5'-TCCCTTTATTTCCGCGCCGG-3'	680	M59909

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* = Pcc

3.4. Reação de polimerização em cadeia (PCR) e *nested-PCR*

Para a PCR foram utilizadas as estirpes de referência (Tabela1.). As reações foram ajustadas de acordo com os *primers* Rdg e Pnl, utilizando diferentes temperaturas de anelamento (47- 68 °C), número de ciclos (25- 30) bem como concentrações de reagentes (Tabela 3). As reações contaram com volume final de 10µl, composto pelos *primers*, tampão de reação (10 mM Tris pH 8,3; 50 mM KCl); MgCl₂; dNTP (Invitrogen); *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e aproximadamente 100 ng de DNA (Duarte et al., 2004) no termociclador MJ Research PTC-100.

Após PCR optou-se pelo *nested-PCR*, uma ferramenta na qual se empregou uma segunda etapa de amplificação com o mesmo par de *primers* utilizados na primeira amplificação, concentrando a amostra e aumentando a sensibilidade e especificidade do método. Para realização do *nested-PCR* foi utilizando o mesmo protocolo da PCR, reutilizando os *primers* Rdg e Pnl, e como molde 1 uL dos produtos de amplificação dos *primers* Rdg e Pnl da PCR anterior, em reações com o volume final de 50 uL.

3.5. Eletroforese

Os géis de agarose (Invitrogen) foram preparados nas concentrações de 0,8 a 1,5 %. O produto das amplificações com os *primers* em teste com as estirpes-referência foram separados por eletroforese em voltagens de 50 V a 70 V por 45 min por 2 h 30 min. Para visualização dos produtos de amplificação, o gel foi marcado com brometo de etídeo e exposto a luz ultravioleta e documentado (Sony Cyber-shot).

TABELA 3. Concentrações e condições utilizadas na PCR para cada par de *primers*. Porto Alegre, RS. 2007.

<i>Primers</i>	<i>Primers</i> (μM)	Tampão (X)	dNTP (mM)	MgCl ₂ (mM)	<i>Taq</i> DNA polimerase (U)	Condições das reações	Referência
PnlF/PnlR	PnlF: 0,8 PnlR: 0,8	1,0	0,1	2,0	1,0	94°C/2';(94°C/45", 65 °C /45", 72 °C/90') 30X; 72 °C/10'	(Dellagi et al., 2000)
RdgF/RdgR	RdgF: 0,8 RdgR: 0,8	1,0	0,1	2,0	1,0	94 °C /2'; (94 °C/45", 64 °C /45", 72 °C/90') 30X; 72 °C/10'	(Dellagi et al., 2000)
ECA1F/ECA1R	ECA1F: 1,0 ECA1R: 1,0	1,0	2,0	2,0	1,0	94 °C/5'; (94 °C/30", 65 °C/45", 72 °C/45") 25X; 72 °C/5'	(De Boer & Ward, 1995)

3.6. Purificação dos produtos de amplificação

Após o *nested*-PCR, os produtos amplificados foram purificados em coluna do tipo troca-iônica MO BIO Lab ULTRACLEAN™ Gel Spin™ DNA Purification Kit, (MO BIO laboratories, Inc.). Seguindo as recomendações do fabricante do Kit, as bandas de agarose foram retiradas e inseridas no interior de *filterbasket* em tubos de 1,5 ml. Foram adicionados 3 vol do reagente *GelBind* por tubo, que foram incubados (65 °C por 2 min) e centrifugados (10000 rpm por 10 s). O material centrifugado foi descartado e o *filterbasket* contendo o DNA foi inserido novamente em um tubo com 3 vol do *GelWash buffer*, repetindo-se os passos anteriores. A última etapa de tratamento é feita adicionando-se 50 μ do *Elution Buffer* sobre o *filterbasket*, e subsequente centrifugação a 10000 rpm por 30 s. O filtro é descartado, permanecendo no tubo coletor somente o DNA purificado. As amostras de DNA purificadas foram analisadas em gel de agarose para quantificação.

3.7. Sequenciamento dos fragmentos amplificados

Os fragmentos gerados pela amplificação das estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* com os *primers* do gene *pnl* e *rdg* após purificação foram enviados para sequenciamento em duplicata. O sequenciamento foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol dos *primers* de Rdg e Pnl e 2 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems).

3.8. Análises *in silico* (computacional) para seleção e projeção de *primers*

As seqüências de nucleotídeos obtidas individualmente por sequenciamento foram submetidas ao GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> - plataforma Blast) para análise de similaridade das seqüências. As seqüências de nucleotídeos de Pcbr, juntamente com seqüências relativas aos mesmos genes de Pcc e Pa, disponíveis no GenBank foram editadas manualmente de forma que fosse gerada uma seqüência única para cada estirpe e submetidas ao servidor Expasy (<http://www.expasy.org>), plataforma Multalin/INRA, para alinhamento múltiplo. Para verificar a funcionalidade das proteínas geradas *in silico* utilizou-se o servidor Expasy (<http://www.expasy.org>), plataforma Translate, que traduz a seqüência de DNA em proteína e informa as regiões codificadoras e para análise dos domínios protéicos,

as seqüências hipotéticas de aminoácidos, geradas no Translate, foram submetidas ao servidor Expasy (<http://www.expasy.org>), plataforma Prosite.

3.9. Projeção de *primers* específicos para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

Seqüências de 20 nt, dispostas em regiões que apresentaram heterologia entre seqüências alinhadas foram escolhidas e submetidas ao programa Oligo Analyzer. Para a projeção foram consideradas temperaturas de anelamento entre 45-52 °C, conteúdo de G-C superior a 40% e predominância de pareamento G-C nas extremidades 3'.

3.10. PCR com *primers* para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

As reações foram ajustadas de acordo com os *primers* selecionados, utilizando diferentes temperaturas de anelamento (50, 55 e 60 °C), número de ciclos e concentrações de reagentes (Tabela 3). As reações contaram com volume final de 10µl, composto por *primers*, tampão de reação (10 mM Tris pH 8,3; 50 mM KCl); MgCl₂; dNTP (Invitrogen); *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e aproximadamente 100 ng de DNA-molde no termociclador MJ Research PTC-100. A especificidade dos *primers* projetados foi testada com as estirpes de referência, listadas na Tabela 1. Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1,5 %, marcados com brometo de etídio e documentado (Sony Cyber-shot).

3.11. Coleta de amostras de hastes de plantas de batata

Para avaliação dos *primers* projetados, método de extração e detecção de Pcb, foram coletadas 10 hastes de plantas de batata apresentando sintomas de canela-preta, presentes em cada uma de quatro lavouras no município de São Francisco de Paula, RS em janeiro de 2007. As plantas coletadas foram devidamente registradas conforme variedade, data de plantio e área plantada (ha) (Tabela 5).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amplificação das seqüências alvo-específicas

A PCR a partir dos *primers* PnIF/PnIR gerou produtos de amplificação de 680 pb quando foi utilizado o DNA das oito estirpes testadas (Figura 1). Da mesma forma, os *primers* RdgF/RdgR geraram produtos de amplificação de 1160 pb a partir do DNA das oito estirpes testadas (Figura 2). Estes resultados vão de encontro com os obtidos por Dellagi et al., (2000).

O perfil de amplificação, obtido pelos dois pares de *primers* nesta pesquisa, confirmaram os dados obtidos em estudo relacionado à seleção de *primers* para composição de arranjo de sondas. O perfil de amplificação destacou os *primers* RdgF/RdgR e PnIF/PnIR para serem utilizadas como possíveis sondas na detecção de espécies e subespécies de pectobactérias (Palma, 2006).

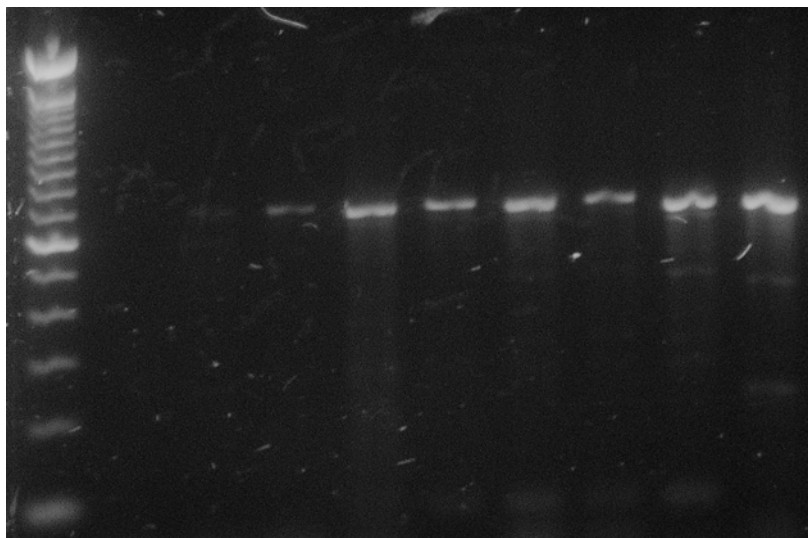


FIGURA 1. Amplificação de fragmentos de DNA com os *primers* PnlF/PnlR para o gene *pnl*, Pectina liase. M, marcador 100pb Ladder; 1, água; 2, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 1442; 3, *P. atrosepticum* (*Eca* 31); 4, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) 8; 5, Pcbr 212; 6, Pcbr 371; 7, Pcbr MB9; 8, Pcbr MB11; 9, Pcbr MB12.

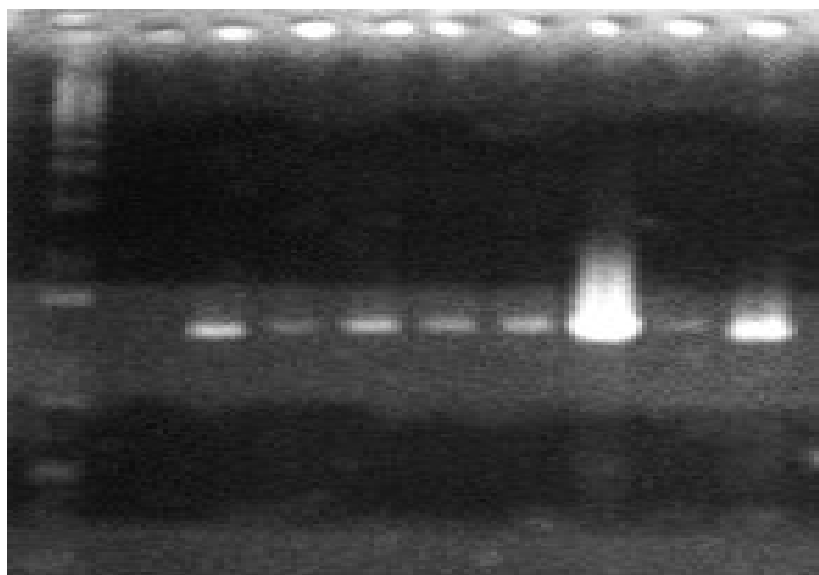


FIGURA 2. Amplificação de fragmentos de DNA com os *primers* RdgF/RdgR para o gene regulador de pectina liase. M, marcador 1Kb plus; 1, água; 2, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 1442; 3, *P. atrosepticum* (*Eca* 31); 4, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) 8; 5, Pcbr 212; 6, Pcbr 371; 7, Pcbr MB9; 8, Pcbr MB11; 9, Pcbr MB12.

4.2. Análise *in silico*

4.2.1. Edição, alinhamento e análise das seqüências

Os resultados do sequenciamento, após edição e alinhamento múltiplo, permitiram a verificação de similaridades e diferenças entre as regiões seqüenciadas dos genes *rdg* e *pnl* dentre as estirpes brasileiras e com as de Pcc e Pa (Figuras 3 e 4). Os alinhamentos relativos ao gene *pnl* e ao gene *rdg* mostraram que as estirpes de Pcbr possuem, além de seqüências de nucleotídeos conservadas, diferenças nucleotídicas conservadas com relação às estirpes de Pa e Pcc. Nas figuras 3 e 4 estão selecionadas as regiões que indicam estas características.

As similaridades constatadas entre as estirpes de Pcbr, bem como, as diferenças, quando comparadas com as estirpes de Pcc e Pa, foram verificadas tanto, nas seqüências referentes ao gene *rdg* quanto, nas seqüências do gene *pnl*. Estas semelhanças e diferenças correspondem a mutações.

4.2.2. Análise protéica das seqüências nucleotídicas

As seqüências das estirpes de Pcbr, portadoras de mutação submetidas ao Expasy, plataforma Translate, tiveram suas seqüências traduzidas em seis possíveis fases de leitura e se verificou a veracidade da funcionalidade das proteínas geradas *in silico*, sinalizando a existência de dois tipos de mutação, uma, considerada silenciosa, que não altera a função proteica. E a outra mutação causada por inserções ou deleções de nucleotídeos distribuídos aleatoriamente, que alteraram a fase de leitura causando a inserção de códons, de terminação que gera uma proteína não funcional. Através do programa Expasy, plataforma Prosite, a

presença de domínios pectolíticos e de glicosilação (necessário para proteínas que são exportadas para a membrana), foi confirmada.

Uma hipótese a ser considerada para ocorrência de mutações pontuais geradoras de proteína não-funcional foi o extensivo tempo em que as estirpes de Pcbr foram manipuladas em laboratório. Neste sentido, pesquisas relatam a ocorrência de mutações e variabilidade em estirpes preservadas *in vitro* refletindo na patogenicidade, virulência ou características básicas da cultura original (Leben, 1981; Gerardt, 1981). Portanto, considerando que a taxa de mutações espontâneas entre bactérias é sempre elevada (Stanier et al, 1986), o uso de qualquer método que permita a multiplicação do isolamento, invariavelmente, envolve o risco da ocorrência de mutações e o aumento da probabilidade de alterações na sua estabilidade genética. Porém, a confirmação da produção de uma enzima não-funcional depende do isolamento e seqüenciamento de novas estirpes, para alinhamento destas, com as seqüências das estirpes do banco do laboratório, bem como, o uso de ferramentas para verificação da expressão destes genes por RT-PCR. Contudo, não se pode deixar de considerar que estas mutações também possam ocorrer em novos isolados de Pcbr.

Por outro lado, as mutações consideradas silenciosas, foram confirmadas e detectadas em novas estirpes por PCR com o auxílio dos *primers* PcbrRdg e PcbrPnl, projetados a partir das regiões que apresentaram apenas estas mutações. A ocorrência de mutações silenciosas que não geram alteração na funcionalidade da proteína, tem sido relatada em trabalhos de taxonomia e análise filogenética envolvendo o seqüenciamento de genes específicos (De Vos et al., 1998). Constatou-se nesta pesquisa, que a presença destas mutações não ocorre somente

nas estirpes do banco do laboratório, mas também nas estirpes isoladas de plantas sintomáticas de canela-preta, indicando a conservação desta mutação em todas as estirpes de *Pcbr*, podendo ser considerada uma assinatura indicadora da própria subespécie.

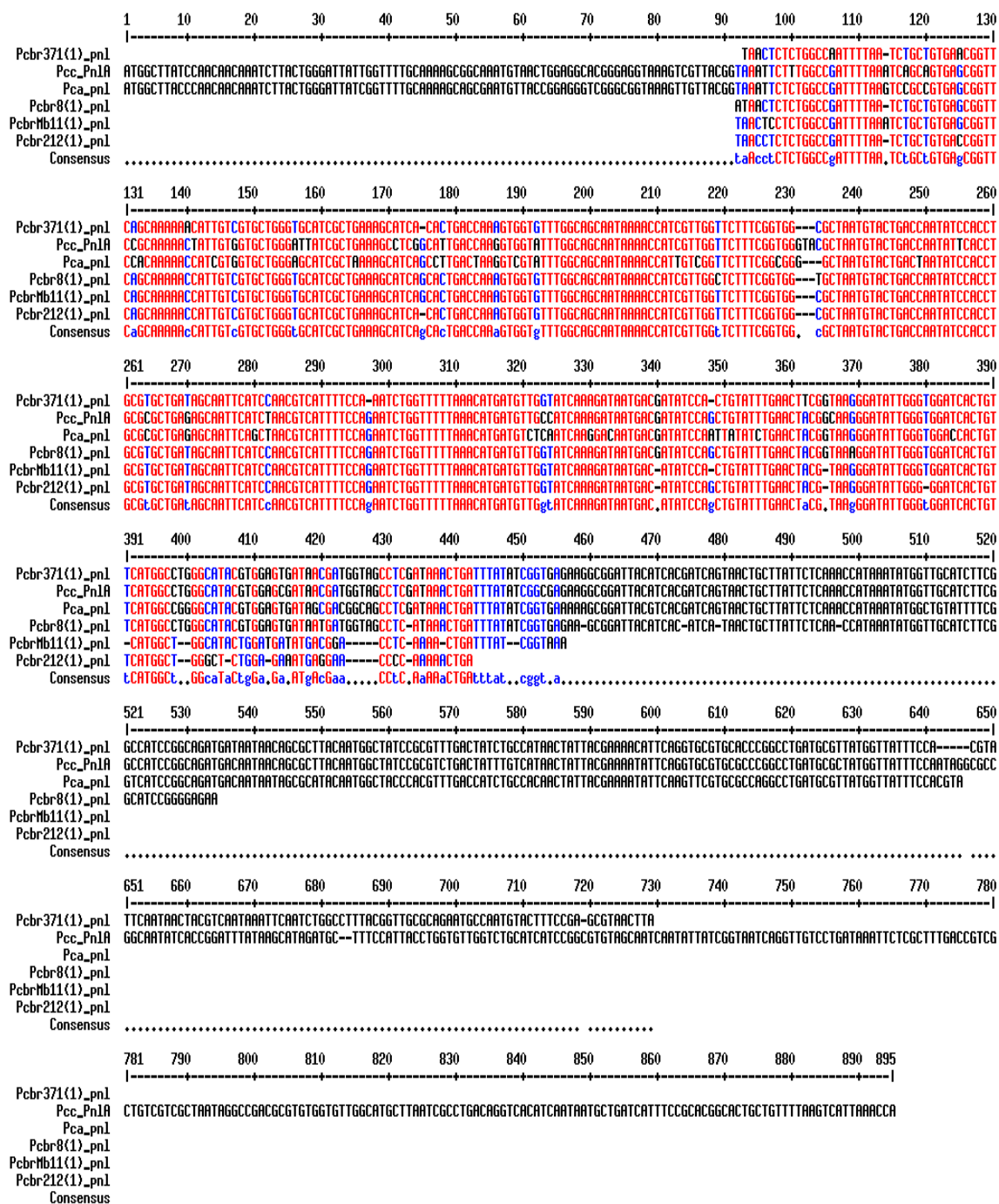


FIGURA 3. Alinhamento múltiplo das seqüências parciais correspondentes ao gene *pnI*, obtidas com os primers PnIF/PnIR de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* 8, 212, 371, MB11, e as seqüências de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. atrosepticum* selecionadas do GenBank, com as mutações silenciosas evidenciadas pelos retângulos.

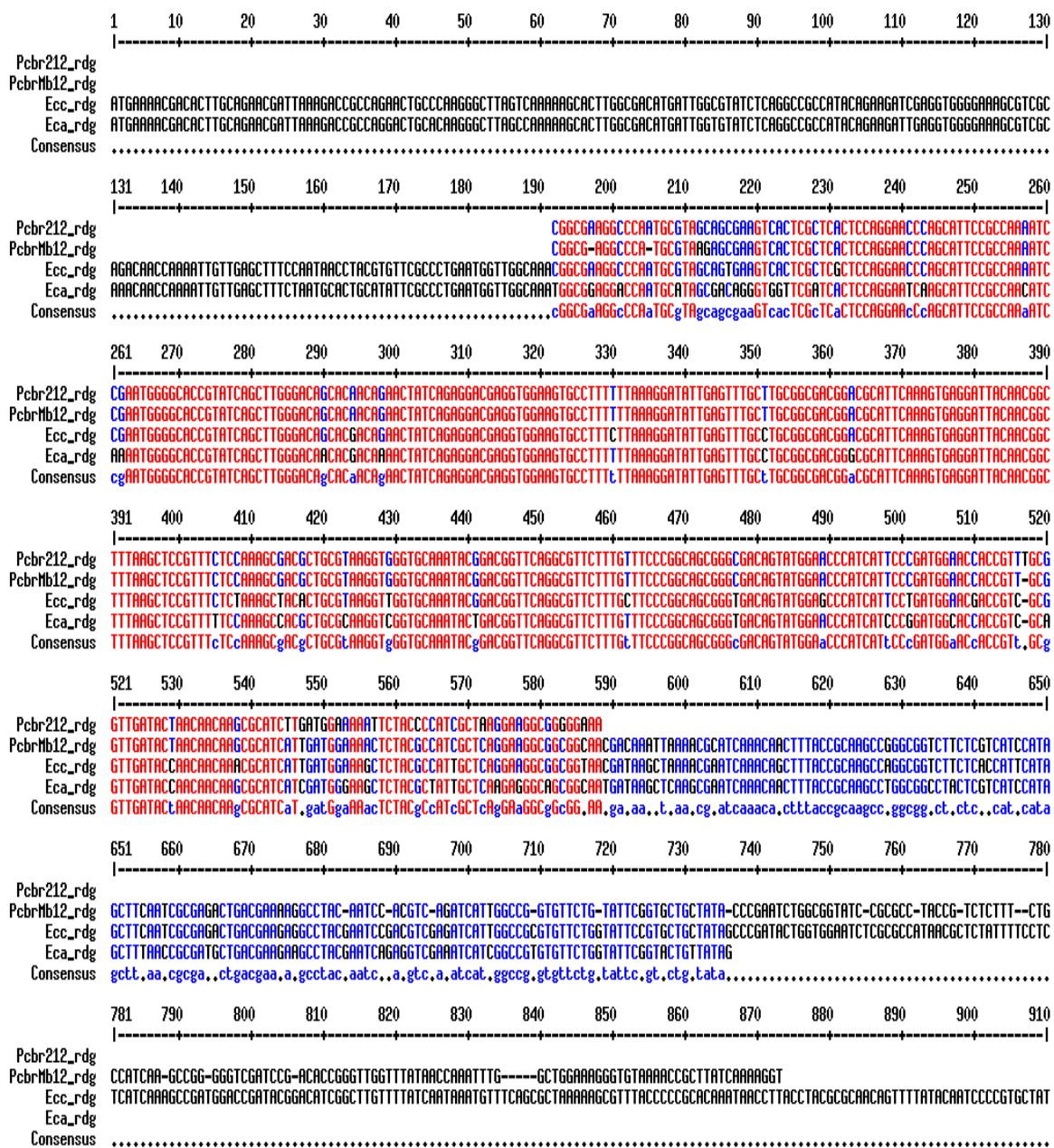


FIGURA 4. Alinhamento múltiplo das seqüências parciais correspondentes ao gene *rdg*, obtidas com os primers RdgF/RdgR de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* 212, MB12, e as seqüências de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. atrosepticum* selecionadas do GenBank, com as mutações silenciosas evidenciadas pelos retângulos.

4.2.3. Primers para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

Os dados do alinhamento revelaram diferenças claras entre as linhagens seqüenciadas (Figuras 3 e 4), confirmando a hipótese que os genes *pnl* e *rdg* podem ser utilizados para a projeção de *primers* para Pcbr.

O *primer forward* específico para o gene *pnl* foi denominado PcbrPnlF (5' ACT GAC CAA AGT GGT G 3') com temperatura de anelamento de 43 °C. O *reverse* foi denominado PcbrPnlR (5' TCG TCA TTA TCT TTG ATA CCA 3') com temperatura de anelamento de 47 °C (Figura 5). O *primer forward* específico para a Pcbr MB12 do gene *rdg* foi denominado PcbrRdgF (5' GCG AAG TCA CTC GCT CAC TCC 3'), com temperatura de anelamento de 58 °C (Figura 5). O *reverse* foi denominado PcbrRdgR (5' CACCTTACGCAGCGTCGCTTTG 3') com temperatura de anelamento de 59 °C (Figura 6).

Após testes com diferentes temperatura de anelamento, os pares para PcbrPnlF/ PcbrPnlR e PcbrRdgF/ PcbrRdgR foram escolhidas as temperaturas de 50-55 °C e 55-60 °C respectivamente para anelamento. De maneira a variar as temperaturas de anelamento durante a PCR, foi escolhida a opção "Touchdown", onde os primeiros ciclos são executados com a temperatura mais alta e os últimos com a mais baixa. Foram programados 20 ciclos para cada temperatura. As concentrações dos reagentes também variaram conforme o par de *primer* testado (Tabela 4).

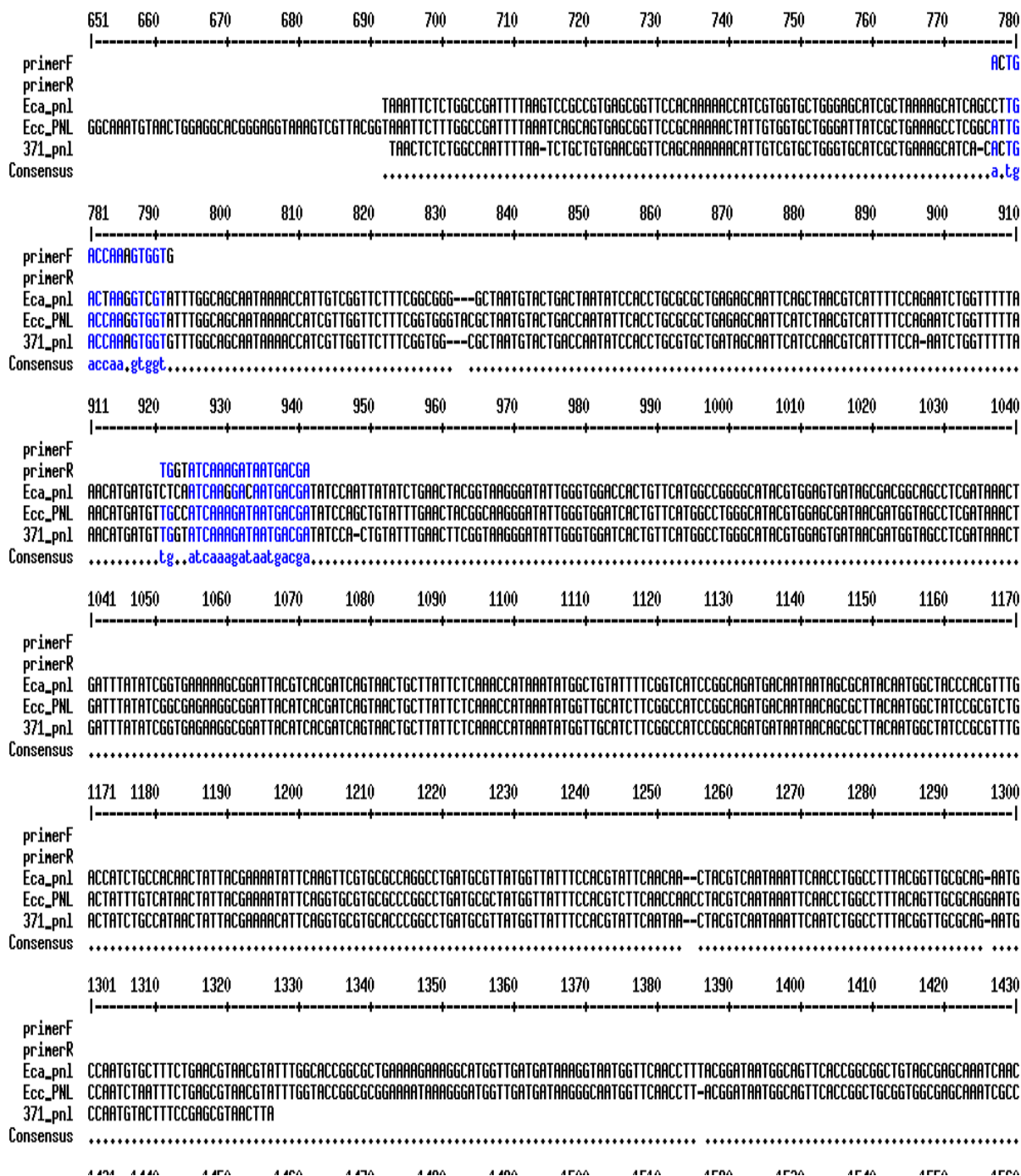


FIGURA 5. Alinhamento das seqüências parciais do gene *pnl* de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* 371, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e a posição dos primers evidenciada pelos retângulos, PcbpPnlF e PcbpPnlR. Porto Alegre, RS. 2007.

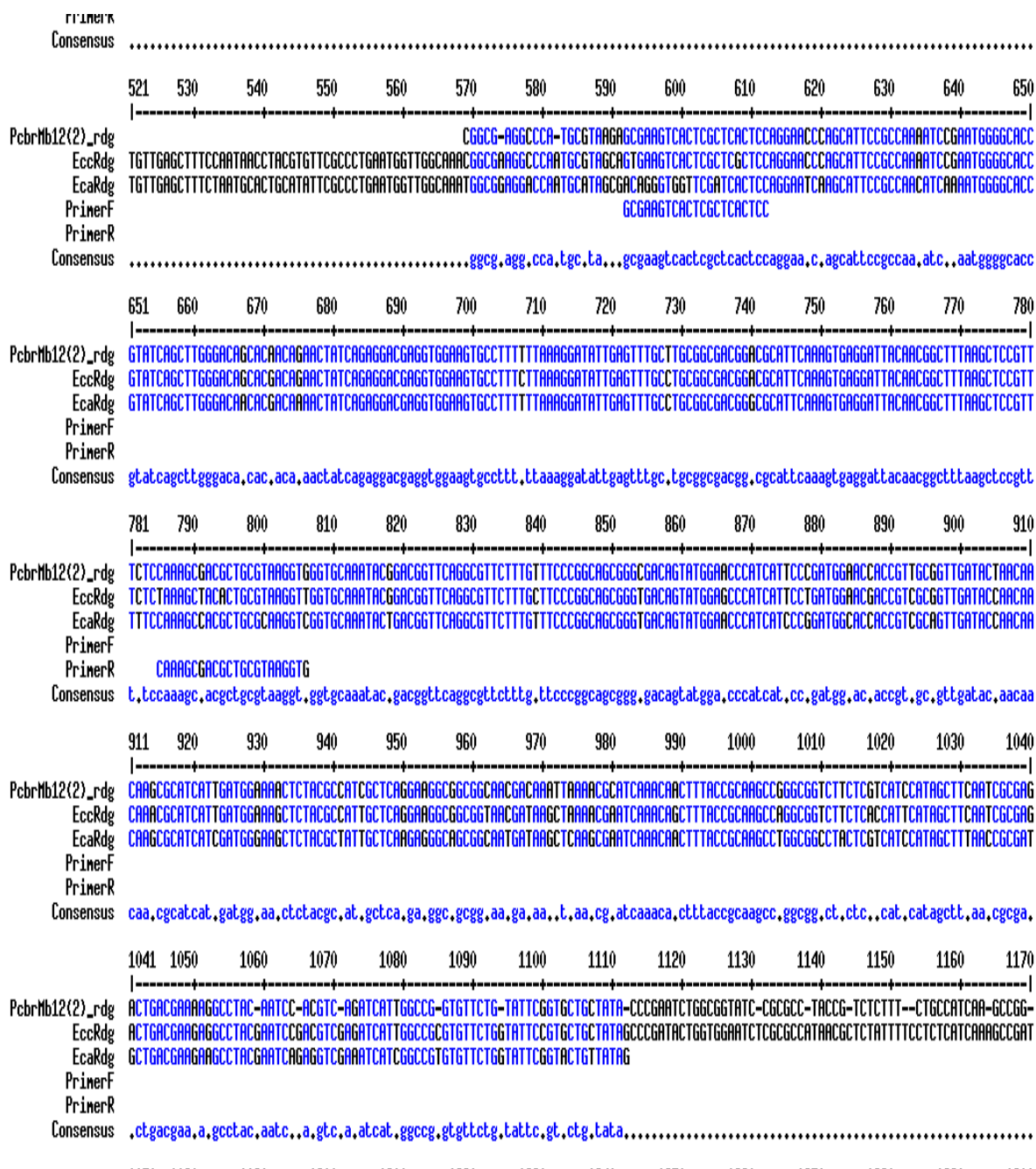


FIGURA 6. Alinhamento das seqüências parciais do gene *rdg* de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* MB12, *P. atrosepticum* e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, e a posição dos primers evidenciadas pelos retângulos, PcbRdgIF e PcbRdgIR. Porto Alegre, RS. 2007.

TABELA 4. Concentrações e condições da PCR para cada par de *primers* específicos para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Porto Alegre, RS. 2007.

<i>Primers</i>	<i>Primers</i> (μ M)	Tampão (X)	dNTP (mM)	MgCl ₂ (mM)	Taq DNA polimerase (U)	Condições das reações
PcbrPnlF PcbrPnlR	PcbrPnlF :1,0 PcbrPnlR :1,0	1,0	0,2	2,0	1,0	94 °C/ 2'; (94 °C/ 30", 55 °C/ 30", 72 °C/ 30") 20X; (94 °C/ 30", 50 °C/ 30", 72 °C/ 30") 72 °C/ 10'
PcbrRdgF PcbrRdgR	PcbrRdgF: 1,0 PcbrRdgR: 1,0	1,0	0,2	2,0	1,0	94 °C/ 2'; (94 °C/ 30", 60 °C/ 30", 72 °C/ 30") 20X; (94 °C/ 30", 55 °C/ 30", 72 °C/ 30") 72 °C/ 10'

A PCR, com os *primers* do gene *pnl*, produziu um fragmento de 130 pb, conforme o esperado para as estirpes de Pcbr 8, Pcbr 212, Pcbr 371, Pcbr MB9, Pcbr Mb11, Pcbr MB12. Com as estirpes de Pcc e Pa não se obteve fragmento de amplificação (Figura 7). A amplificação, com o par de *primers* do gene *rdg* resultou no fragmento de 180 pb para todas as estirpes de Pcbr testadas, com exceção das estirpes de Pcc e Pa (Eca 31) (Figura 8). A ausência de produto de amplificação das estirpes de Pcc e Pa (Eca 31) confirma a especificidade destes dois pares de *primers*.

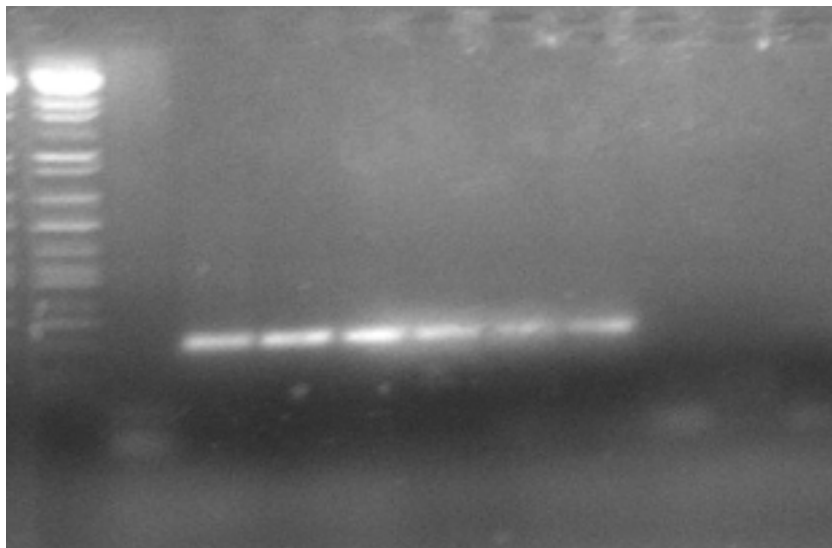


FIGURA 7. Perfil eletroforético dos produtos a PCR utilizando os *primers* PcbrPnlF/PcbrPnlR do gene *pnl*. M, marcador 1K; 1, água; 2, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) 8; 3, Pcbr 212; 4, Pcbr 371; 5, Pcbr MB9; 6, Pcbr MB11; 7, Pcbr MB12; 8, *P. atrosepticum* (Eca 31); 9, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) 1442; 10, Pcc Ag8.

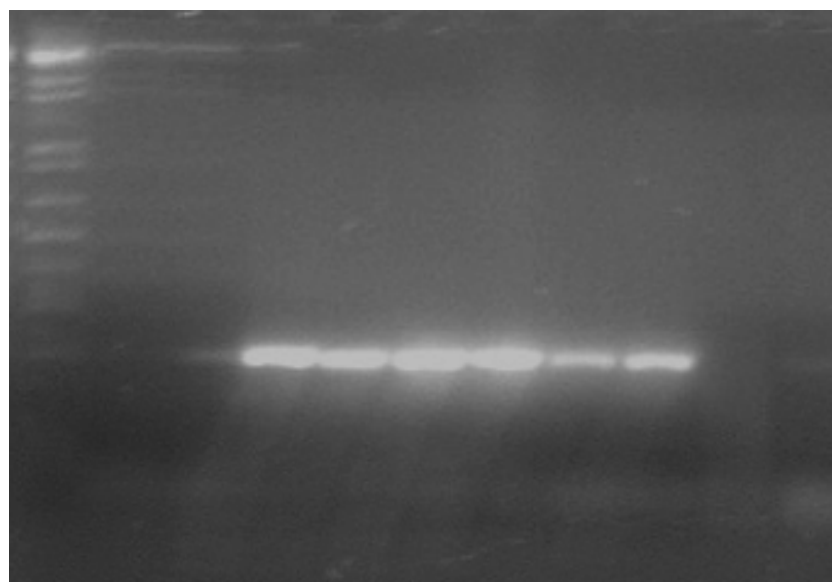


FIGURA 8. Perfil eletroforético dos produtos da PCR utilizando os *primers* específicos PcbrRdgF/PcbrRdgF para o gene *rdg*. M, marcador 100 pb ladder; 1, água; 2, *Pectobacterium atrosepticum* (Eca 31); 3, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) 8; 4, Pcbr 212; 5, Pcbr 371; 6, Pcbr MB9; 7, Pcbr MB11; 8, Pcbr MB12; 9, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) 1442; 10, Pcc Ag8.

4.3. Detecção de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

Pectobacterium carotovorum subsp. *brasiliensis* foi detectada em hastes de plantas de batata através de PCR com os *primers* PcbrRdgF/PcbrRdgR e PcbrPnIF/PcbrPnIR que geraram os produtos esperados de 180 e 130pb respectivamente (Figura 9 A e B, C e D). Algumas áreas apresentaram até 70% das amostras testadas com esta bactéria. Porém, esperava-se detectar Pcbr em 100% das amostras coletadas.

A ausência de Pcbr em 30% das amostras pode ser explicada pelo adiantado estado de necrose destas amostras, que apesar de apresentarem os sintomas de canela-preta não possuíam tecido semi-macerado, ideal para extração do DNA. Perante estas condições, Pcbr pode não ter sido detectada, ou não estar presente. Além disso, outros fitopatógenos podem provocar sintomas similares a canela-preta em plantas de batata, e se presentes nestas plantas, não foram detectados pelos pares de *primers* específicos para Pcbr. A possibilidade de Pa, Pcc e Dc, estarem causando canela-preta também foi considerada.

Para detecção de Pa, as 40 amostras coletadas também foram submetidas à PCR, com os *primers* ECA1/ECA2, específicos para Pa, mas nenhuma amostra apresentou produto de amplificação, indicando a ausência desta subespécie nas plantas sintomáticas de canela-preta no Rio Grande do Sul (Figura 10) e confirmando as observações de Oliveira (2001); Oliveira et al., (2003) e El Tassa & Duarte (2004). A identificação e detecção de Pcc é dificultada pela grande variabilidade demonstrada dentro desta subespécie (Hinton et al., 1989; ValKama & Karjalainen, 1994; El Tassa & Duarte, 2003; Yap et al., 2004; El Tassa & Duarte,

2006). Porém, pesquisas relacionadas à epidemiologia da canela-preta devem ser direcionadas também a Pcc e Dc.

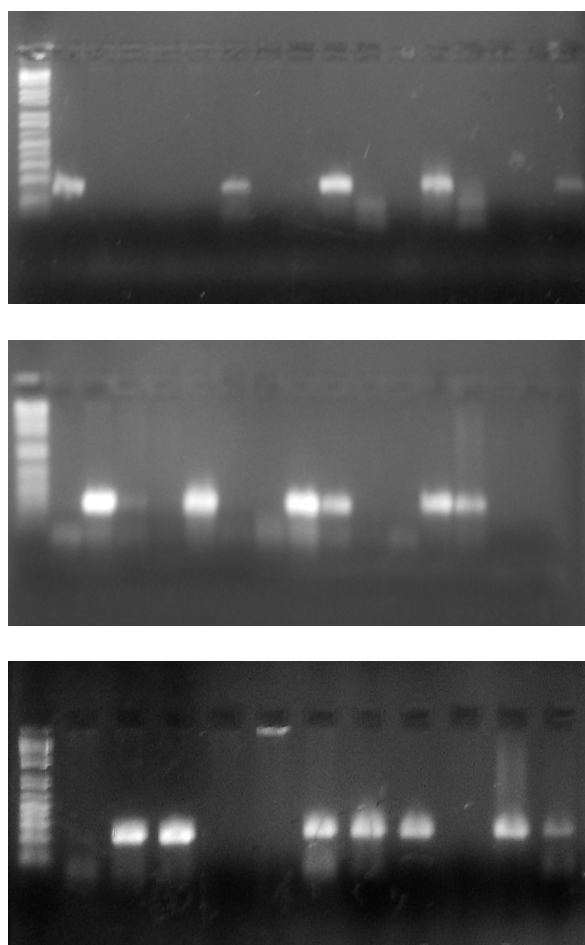


FIGURA 9. Perfil eletroforético dos produtos da PCR com os *primers* específicos para PcbR utilizando DNA extraído pelos métodos de fervura e FTACard de tecidos internos sintomáticos de canela-preta de plantas de batata. **PcbRPnl:** **A**, fervura; **B**, FTACard **PcbRRdg:** **C**, fervura; **D**, FTACard. Porto Alegre, RS. 2007.

FIGURA 10. Perfil eletroforético dos produtos da PCR com os *primers* específicos para *Pectobacterium atrosepticum* utilizando DNA extraído por FTACard de tecidos internos de hastes de plantas de batata com canela-preta. Porto Alegre, RS. 2007.

Os resultados referentes às ampliações com os dois pares de *primers* indicaram que PcbrRdgF/PcbrRdgR foi mais eficiente que PcbrPnIF/PcbrPnIR nas duas formas de extração de DNA, 22% com FTACard e 108% por fervura.

A detecção de Pcbr por PCR, utilizando DNA extraído por FTACard com os *primers* PcbrRdgF/PcbrRdgR e PcbrPnIF/PcbrPnIR resultaram em 55 e 45% respectivamente, do total de amostras coletadas do campo (Tabela 5). Este método, quando comparado com a fervura mostrou os melhores resultados, apesar de estar em padronização para a reutilização dos cartões submetidos à PCR. Além da extração, o FTACard pode ser utilizado em trabalhos a campo para coleta de DNA *in situ*. Esta técnica de amostragem de material para detecção de Pcbr poderá minimizar o tempo de coleta, aumentar o número de amostras e precisão na

identificação. O FtaCard também pode ser utilizado como arquivo, a matriz do cartão conserva o DNA de forma estável à temperatura ambiente (Rajendram et al., 2006). Os cartões recebem tratamento com uma mistura de reagentes contendo tampões e proteínas desnaturantes que rompem a membrana celular, estabilizando e protegendo o DNA da ação de nucleases, de oxidação, UV, e degradação por fungos e bactérias (Smith & Burgoyne, 2004). Este método está sendo aplicado para os mais diversos fins, obtendo bons resultados na extração de DNA em análise de sangue (Kubo & Fujita, 2006), análises forenses e insetos (Harvey, 2004), *Rickettsia* (Blair et al., 2004), plantas (Drescher, 2001), parasitas (Becker et al., 2004), na coleta de DNA de corais localizados em regiões remotas (Crable, 2003), além de vírus (Li et al., 2004) e outras bactérias (Lampel et al., 2004).

Os resultados da PCR, com o DNA extraído por fervura com os *primers* PcbrRdg e PcbrPnl, indicaram 12 e 25% de detecção de Pcbr do total de amostras analisadas (Tabela 5). Este método de extração apresentou problemas na amplificação de produtos de DNA, provavelmente pela presença de inibidores de reação ou manutenção de nucleases termo-estáveis (Nogueira et al., 2004). A preservação do material fervido a -4 °C para posterior utilização, não é indicada, pois acarreta em degradação do DNA. Outros trabalhos indicam a problemática da preservação do DNA extraído por fervura (GiBson & McKee, 1993; Fresch et al., 2005). Porém, este método possui variações e está sendo utilizado, gerando bons resultados na extração de DNA de culturas bacterianas puras, possuindo vantagens consideráveis, quando comparado com outros métodos, por ser rápido e barato (De Toni et al., 2004; Barea & Pardini, 2004).

TABELA 5. Incidência de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) em tecidos internos sintomáticos de canela-preta de plantas de batata através de PCR com os *primers* PcbrPnl e PcbrRdg utilizando DNA extraído por fervura¹ e FTACard². Porto Alegre, RS. 2007.

Data de plantio	Área (ha) ³	Variedade	Presença de Pcbr / Número de amostras			
			Pcbr-Rdg		Pcbr-Pnl	
			FTACard ²	Fervura ¹	FTACard ²	Fervura ¹
08.11.2006	1,0	Ágata	4/10	0/10	3/10	0/10
10.11.2006	1,5	Asterix	6/10	0/10	4/10	0/10
14.11.2006	7,0	Ágata	7/10	6/10	7/10	2/10
12.12.2006	30,0	Ágata	5/10	4/10	4/10	3/10
Proporção			22/40	10/40	18/40	5/40
% Pcbr			55	25	45	12

¹ Tecido semi-macerado em 800 µl de água destilada fervida por 5 min.

² Flinders Technology Associates, Classic Card, Whatman (cartão de papel desenvolvido para coleta, extração e preservação de DNA total).

³ São Francisco de Paula, RS, Agricultor Tarcísio Schuck.

A incidência de canela-preta em plantas de batata está diretamente relacionada à batata-semente. Diante desta problemática, os níveis de tolerância no Brasil aplicados às inspeções da batata-semente certificada estão sendo discutidos (ABBA, 2007). Estes níveis limitam-se a 1%, enquanto que nos Países Baixos, considerados grandes produtores, o nível de tolerância é de 0,03% (NIVAK, Holanda). A existência de uma diferença significativa (Holanda 3/3.000 e Brasil, 1/100 batatas) entre os níveis revela a necessidade de um maior rigor nas inspeções brasileiras, visto que, a utilização de tubérculos contaminados pelos agricultores para plantio compromete a produção de forma prematura, antes de se verificar os prejuízos.

Os programas de certificação, baseados principalmente em observações visuais de campo, podem apresentar limitações, principalmente se o patógeno sobreviver na planta sem que esta apresente sintomas (ABBA, 2007). Estas inspeções não detectam a doença sob certas condições ambientais ou quando as plantas estão infectadas com baixa densidade de inóculo. Além disso, quando as vistorias são realizadas a campo, 40 dias após a emergência das plantas, e antes do início da senescência, o patógeno já encontra-se estabelecido. Portanto, ocorre à necessidade de indexação dos tubérculos semente, a fim de se determinar a ausência do patógeno antes do plantio (El Tassa & Duarte, 2004).

No entanto, o perfil das *pectobactérias* ocorrentes em batata no Rio Grande do Sul, mostra diferenças bioquímicas, fisiológicas e genéticas em relação as ocorrentes em outros países, tornando a utilização da PCR, sondas de DNA, antissoros mono e policlonais e outros testes de identificação inadequados para estudos epidemiológicos da doença nas condições brasileiras (Duarte et al., 2004). Além disso, a realização dos testes em conjunto torna qualquer levantamento epidemiológico laborioso, refletindo no número amostras analisadas e, conseqüentemente, diminuindo a consistência das informações (Duarte et al., 2004; El Tassa & Duarte, 2004).

Com a tecnologia do DNA, através de *primers* específicos, a detecção do patógeno pode ser realizada sem haver a necessidade de isolamento do patógeno (Ward & De Boer, 1994). A perspectiva da utilização de *biochips* tem aumentado em todas as áreas da medicina, dando indícios de que esta tecnologia poderá ser usada também na agricultura, particularmente nos testes de detecção de fitopatógenos em órgãos de propagação (Martin et al., 2000; Lévesque, 2001).

A projeção de *primers* específicos é de extrema importância para detecção de fitopatógenos. *P. atrosepticum* teve seu genoma completo seqüenciado (Bell et al., 2004) e elevada a nível de espécie (Gardan et al., 2003) e em recente trabalho, semelhante a esta pesquisa, os *primers* PEAf e PEAR, da família gênica *Rhs* (cujos produtos atuam na síntese da membrana celular externa), foram projetados para detecção de Pa em plantas com sintomas de canela-preta (Park et al., 2006).

Diante as condições existentes, novas pesquisas deveriam ser conduzidas com os *primers* PcbrRdgF/PcbrRdgR e método de extração com FTACards, para confirmação do seu potencial na detecção de Pcbr em hastes de plantas e principalmente em batatas-semente.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, nas condições em que fora realizado chegou-se às seguintes conclusões:

- 1) Os *primers* PcbrPnlF/PcbrR e PcbrRdgF/PcbrRdgR permitem a detecção seletiva de estirpes de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) através de PCR;
- 2) A eficiência da PCR na detecção de estirpes de Pcbr é maior com os *primers* PcbrRdgF/PcbrRdgR do que com os *primers* PcbrPnlF/PcbrR, independente da forma de extração de DNA;
- 3) A eficiência da PCR na detecção de estirpes de Pcbr é maior quando o DNA é extraído através do uso do FTACard;
- 4) As seqüências dos genes *pnl* e *rdg*, relativos à pectina liase, das estirpes de Pcbr, apresentam nucleotídeos conservados correspondentes a mutações silenciosas somente encontradas nesta subespécie;
- 5) Apesar do sucesso na detecção de Pcbr, através da PCR com os *primers* projetados nos tecidos de plantas com canela-preta, novos levantamentos são necessários para aumentar a eficiência do processo e permitir sua utilização na obtenção de dados epidemiológicos mais consistentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA. Associação Brasileira da Batata. [Informações]. Disponível em: www.abbabatatabrasileira.com.br/historia.htm. Acesso em: 15. dez. 2007.

BAREA, J.A.; PARDINI, M.I.M.C. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassa para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.26, n.4, p.274-281, 2004.

BECKER, S.; FRANCO, J.R.; SIMARRO, P.P.; STICH, A.; ABEL, P.M.; STEVERDING, D. Real-time PCR for detecting *Trypanosoma brucei* in human blood samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.50, p.193-199, 2004.

BELL, K.S.; SEBAIHIA, M.; PRITCHARD, L.; HOLDEN, M.T.; HYMAN, L.J.; HOLEVA, M.C.; THOMSON, N.R.; BENTLEY, S.D.; CHURCHER, L.J.; MUNGALL, K.; ATKIN, R.; BASON, N.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CLARK, K.; DOGGETT, J.; FRASER, A.; HANCE, Z.; HAUSER, H.; JAGELS, K.; MOULE, S.; NORBERTCZAK, H.; ORMOND, D.; PRICE, C.; QUAIL, M.A.; SANDERS, M.; WALKER, D.; WHITEHEAD, S.; SALMOND, G.P.; BIRCH, P.R.; PARKHILL, J.; TOTH, I.K. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.101, n.30, p.11105-11110, 2004.

BENELLI, A.I.H.; DENARDIN, D.N.; FORCELINI, C.A.; DUARTE, V. Reação de cultivares de batata à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.155-159, 2004.

BLAIR, P.J.; SHOELER, G.B.; MORAN, C.; ANAYA, E.; CACEDA, R.; CESPEDES, M.; CRUZ, C.; FELICES, V.; GUEVARA, C.; HUAMAN, A.; LUCKETT, R.; MENDOSA, L.; RICHARDS, A.L.; RIOS, Z.; SUMMER, J.W.; VILASSECA, P.; OLSON, J.G. Evidence of Rickettsia and Leptospira infections in Andean Northern Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.70, p.357-363, 2004.

CHATTERJEE, A.; MCELOY, J.L.; CHAMBOST, J.P.; BLASCO, F.; CHATTERJEE, A.K. Nucleotide sequence and molecular characterization of *pnIA*, the structural gene for damage-inducible pectin lyase of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.173, n.5, p.1765-1769, 1991.

COLMER, A.; KEEN, N.T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p.383-409, 1986.

CÔTÉ, F.; HAHN, M.G. Oligosaccharins: Structures and signal transduction. **Plant Molecular Biology**, Netherland, v.26, p.1379-1411, 1994.

CRABLE, M.J. A novel method for the transport and analysis of genetical material from polyps and *zooxanthellae* of scleractinian corals. **Journal Biochemistry Biophys Methods**, Netherland, v.57, p.171-176, 2003.

DARRASSE, 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.5, p.1437-1443, 1994.

DE BOER, S.H. Relative incidence of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in stolon and peridermal tissue of potato tubers in Canada. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, p.960-964, 2002.

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

DE BOER, S.H.; KELMAN, A. *Erwinia* soft rot group. In: SHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. (Ed.). **Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: APS Press, 2001. p.65-72.

DE BOER, S.H.; WARD, L.J. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, n.8, p.854-858, 1995.

DE BOER, S.H.; WARD, L.J.; LI, X.; CHITTARANJAN, S. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.23, n.13, p.2567-2568, 1995.

DE TONI, F.; SOUZA, E.M.; KLASSEN, G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, C.R.; PICHETTI, G.; FARAH, S.M.M.; FADES-PICHETTI, C.M.T. Detection of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* Shiga toxicogênica (STEC) by amplification of *stx* genes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v.36, n.2, p.73-77, 2004.

DE VOS, D.; BOUTON, C.; SARNIGUET, A.; DE VOS, P.; VAUTERIN, M.; CORNELIS, P. Sequence diversity of *oprI* gene, coding for major outer membrane lipoprotein I, among rRNA group I *Pseudomonas*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, n.24, p.6551-6556, 1998.

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

DRESCHER, G. PCR-genotyping of barley seedings using DNA samples from tissue prints. **Plant Breeding**, Cambridge, v.121, p.228-231, 2001.

DUARTE, V. Taxonomia do gênero *Erwinia*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.7, p.197-212, 1999.

DUARTE, V.; DE BOER, S.H.; WARD, L.J.; DE OLIVEIRA, A.M. 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.

DUARTE, V.; EL TASSA, S.O.M. Taxonomia do gênero *Pectobacterium*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.11, p.1-41, 2003.

EISEN, J.A. Systematic studies of bacteria: comparison of trees of *recA* and 16S rRNAs from the same species. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.41, p.1105-1123, 1995.

EL TASSA, S.O.M.; DUARTE, V. Caracterização molecular de pectobactérias por ERIC-PCR, BOX-PCR e RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.S239, 2003.

EL TASSA, S.O.M.; DUARTE, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, 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.1, p.23-28, 2006.

ERIKSSON, A.R.; ANDERSSON, R.A.; PIRHONEN, M.; PALVA, E.T. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, Saint Paul, v.11, n.8, p.743-752, 1998.

FRAISSINET-TACHET, L.; FEVRE, M. Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Current Microbiology**, New York, v.33, p.49-53, 1996.

FRECHON, D.; EXBRAYAT, P.; HELIAS, V.; HYMAN, L.; JOUAN, B.; LLP, P.; LOPEZ, N.; PAYET, N.; PEROMBÉLON, M.C.M.; TOTH, I.K.; VAN DERWOLF, J.M.; 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, p.163-173, 1998.

FRESCH, C.R.; CARVALHO, L.F.O.S.; OLIVEIRA, C.J.B. Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of

Salmonella typhimurium in swin feces by polimerase chain reaction (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.363-367, 2005.

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**, Beaucouze, v.53, n.Pt 2, p.381-391, 2003.

GERHARDT, P. **Manual of methods for general microbiology**. Washington: ASM, 1981. 524p.

GIBSON, J.R.; MCKEE, R.A. PCR products generated from unpurified salmonella DNA are degraded by thermostable nuclease activity. **Letters in Applied Microbiology**, Cardiff, v.16, p.59-61, 1993.

GOYER, C.; VACHON, J.; BEAULIEU, C. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutans altered in thaxonomin A production. **Phytopathology**, Saint Paul, v.88, p.422-455, 1998.

GUDMESTAD, N.C.; SECOR, G.A. Management of soft-rot and ring rot. In: Rowe, R.C. **Potato health management**, Saint Paul: APS Press, 1993. p.135-139.

HARVEY, M.L. An alternative for the extraction and storage of DNA from insects in forensic entomology. **Journal of Forensic Science**, West Conshohochen, v.5, n.3, p.884-890, 2004.

HELIAS, V.; ROUX, A.C.; BERTHEAU, Y.; ANDRIVON, D.; GAUTHIER, J.-P.; JOUAN, B. Characterization of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil, and water extracts with PCR-based methods. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v.104, p.685-699, 1998.

HINTON, J.C.D.; SIDEBOTHAM, J.M.; GILL, D.R.; SALMOND, G.P.C. Extracellular and periplasmic isoenzymes of pectate lyase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* belong to different gene families. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.3, p.1785-1795, 1989.

HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N.; CONDEMINE, G.; NASSER, W.; REVERCHON, S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.50, p.213-257, 1996.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **[Informações]**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15. dez. 2007.

JABUONSKI, 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.11, p.185-195, 1986.

JAFRA, S.; FIGURA, I.; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N.; LOJKOWSKA, E. Expression of *Erwinia chrysanthemi* pectinase genes *pell*, *pellL*, and *pelZ* during infection of potato tubers. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v.12, n.10, p.845-851, 1999.

KAYSHAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. **Bioresource Technology**, Oxford, v.77, n.3, p.215-227, 2001.

KNOW, S.W.; KANG, H.W.; RYU, J.C.; JO, J.K. Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.1061-1064, 1997.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 660p.

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

LAMPEL, K.A.; DYER, D.; KORNEGAY, L.; ORLANDI, P.A. Detection of *Bacillus* spores using PCR and FTA Filters. **Journal Food Protection**, Iowa v.67, n.5, p.1036-1038, 2004.

LEBEN, C. How plant-pathogenic bacteria survive? **Plant Disease**, Saint Paul, n.658, p.633-637, 1981.

LÉVESKE, C.A. Molecular methods for detection of plant-pathogens - What is the future? Can. **Plant Pathology**, Oxford, v.24, p.333-336, 2001.

LI, C.C.; BECK, I.A.; SEIDEL, K.D.; FRENKEL, L.M. Persistence of human immunodeficiency virus type 1 subtype B DNA in dried blood on FTA filter paper. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, p.3847-3849, 2004.

LIU, Y.; CUI, Y.; MUKHERJEE, A.; CHATTERJEE, A. Activation of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase structural gene *pnIA*: a role for RdgB. **Microbiology**, New York, v.143, p.705-712, 1997.

LOPES, C.A.; TAKATSU, A. Controle da murcha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.16-1997.

LOWS, F.J.; RANDEMAKER, J.L.W.; BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection and disease

diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.17, p.81-125, 1999.

MARTIN, C.; ROBERT, D.; VAN DER WEIDE, M.; ROSSAU, R.; JANNES, G.; SMITH, T.; MAHER, M. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, p.3735-3742, 2000.

MCCANN, M.C.; SHI, J.; ROBERTS, K.; CARPITA, N.C. Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. **The Plant Journal**, York, v.5, p.773-785, 1994.

MCELOY, J.L.; MURATA, H.; CHATTERJEE, A. Genetic evidence for an activator required for induction of pectin lyase in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by DNA-damaging agents. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, n.16, p.5471-5474, 1992.

MOHRAN, Z.S.; ARTHUR, R.J.; OYOFO, B.A.; PERUSKI, M.O.; ISMAIL, T.F.; MURPHY, J.R. Differentiation of *Campylobacter* isolates on the basis of sensitivity to boiling in water as Measured by PCR-detectable DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.1, p.363-365, 1998.

MOURA, A.B.; CHITARRA, L.G.; SOUZA, R.M. Métodos de detecção de bactérias em sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.13, p.297-319, 2005.

NASSAR, A.; DARRASSE, A.; LEMATTRE, 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.7, p.2228-2235, 1996.

NGUYEN, H.A.; KANEKO, J.; KAMIO, Y. Temperature-dependent production of carotovoricin Er and pectin lyase in phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Er. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Sendai, v.66, n.2, p.444-447, 2002.

NOGUEIRA, C.A.M.; MOMESSO, C.A.S.; MACHADO, R.S.D.; ALMEIDA, M.T.G.; ROSSIT, A.R.B. Desempenho de Kits comerciais e protocolos laboratoriais para extração de DNA genômico bacteriano. **Revisão Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v.6, n.2, p.35-38, 2004.

OLIVEIRA, A.M.R. **Incidência e variabilidade genética de erwinias pectolíticas associadas à canela preta em lavouras de batata do Estado do Rio Grande do Sul**. 2001. 80 f. Tese (Doutorado em Fitossanidade) - 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.; MORAES, M.G. Incidence of pectolitic erwinias associated with blackleg of potato in Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.1, p.49-53, 2003.

PALMA, J. **Seleção de oligonucleotídeos iniciadores visando compor um arranjo de sondas de DNA que identifiquem estirpes de pectobactérias**. 2006. 51 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PARK, D.S.; SHIM, J.K.; KIM, J.S.; KIM, B.Y.; KANG, M.J.; SEOL, Y.J.; HAHN, J.H.; SHRESTHA, R.; LIM, C.K.; GO, S.J.; KIM, H.G. PCR-based sensitive and specific detection of *Pectobacterium atrosepticum* using primers based on *Rhs* family gene sequences. **Plant Pathology**, Oxford, v.55, n.5, p.625-629, 2006.

PEREIRA, S.A.; DANIELS, J. **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa informações tecnológicas, 2003. 567p.

PÉROMBELON, M.C.M. Potato blackleg: Epidemiology host-pathogen interaction and control. **Plant Pathology**, Oxford, v.92, p.135-146, 1992.

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

PÉROMBELON, M.C.M.; KELMAN, A. Ecology of the soft-rot erwinias. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.18, p.361-387, 1980.

PÉROMBELON, M.C.M.; KELMAN, A. Blackleg and other potato diseases caused by soft-rot *Erwinias*: Proposal for revision of terminology. **Plant Disease**, Saint Paul, v.71, p.283-285, 1987.

PIMENTA, C.J. Pectinas e enzimas pectinolíticas no café (*Coffea arabica*) em diferentes estádios de maturação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.1079-1083, 2000.

PIRHONEN, M.; SAARILAHTI, H.T.; KARLSSON, M.B.; PALVA, E.T. Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposon mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v.4, p.276-283, 1991.

POWELSON, M.L. Seasonal incidence and cause of blackleg and stem of potatoes in Oregon. **American Potato Journal**, Orono, v.57, p.301-306, 1980.

POWELSON, M.L.; APPLE, J. Soil and seed tubers as sources of inoculum of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* for stem soft rot of potatoes. **Phytopathology**, Saint Paul, v.74, p.429-432, 1984.

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 Microbiological Methods**, Columbia, v.67, p.582-592, 2006.

RIED, J.L.; COLLMER, A. Comparison of pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n.2, p.305-310, 1986.

ROMMEL, C.C.; EL TASSA, S.O.M.; DUARTE, V. Identificação e incidência de erwínias pectolíticas em tubérculos de batata importados da Argentina e do Chile. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 35., 2002, Recife. **Resumos...** Fortaleza: SBF, 2002. p.S59.

SAMSON, R.; LEGENDRE, J.B.; CHRISTEN, R.; SAUX, M.F.L.; ACHOUAK, W.; GARDAN, L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Bulkholderr 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 dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.55, p.1415-1427, 2005.

SANTANA, F.M.; BIANCHI, V.J.; ROMBALDI, C.V.; GOMES, C.B.; ROSSETO, E.A. Marcadores moleculares na interação, diagnose e caracterização de fungos fitopatogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.14, p.383-403, 2006.

SILVA, C.A.; BRAGA, M.R. Liberação e atividade de moléculas indutoras de fitotoalexinas em rubiáceas tropicais: influência da metilesterificação de pectinas 1. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.27, n.2, p.379-393, 2004.

SMID, E.J.; JANSEN, A.H.J.; GLORIS, L.G.M. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. **Plant Pathology**, Oxford, v.44, p.1058-1069, 1995.

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

STANIER, R.Y; INGRAHAM, J.L; WHELLIS, M.L; PAINTER, P.R. **The Microbial World**, New Jersey, 1986. 689p.

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

TOTH, I.K.; HYMAN, L.J.; WOOD, J.R. An one step PCR-based method for the detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.87, p.158-166, 1999.

VALKAMA, M.; KARJALAINEN, R. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by RAPD-PCR. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, p.301-309, 1994.

WARD, L.J.; DE BOER, S.H. Specific detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* with a digoxigenin-labeled DNA probe. **Phytopathology**, Saint Paul, v.84, n.2, p.180-186, 1994.

WREGE, M.S.; HERTER, F.G.; PEREIRA, A.D.S.; CARAMORI, P.H.; GONÇALVES, S.L.; BRAGA, H.J.; PANDOLFO, C.; MATZENAUER, R.; CAMARGO, M.B.P.; BRUNINI, O.; STEINMETZ, S.; REISSER JUNIOR, C.; FERREIRA, J.S.d.A.; SANSN, L.M.A. **Caracterização climática das regiões produtoras de batata no Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.35. (Boletim Técnico,133).

YAP, M.N.; BARAK, J.D.; CHARKOWSKI, A.O. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.5, p.3013-3023, 2004.

