

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

**SELEÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES VISANDO COMPOR UM
ARRANJO DE SONDAS DE DNA QUE IDENTIFIQUE ESTIRPES DE
PECTOBACTÉRIAS**

Janine Palma
Engenheira Agrônoma/UFSM

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

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2006

HOMOLOGAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Ao professor Valmir Duarte, pela orientação e exemplo profissional.

Aos demais professores pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas Aícha Daniela Ribas e Felipe André S. Graichen, pela amizade, incentivo e apoio nas horas mais difíceis.

Aos demais colegas do Departamento de Fitossanidade pela boa convivência e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

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

Aos meus pais Silvio Palma e Ivoni Ida A. Palma, e irmãos Evandro e Josiane, pela compreensão de minha ausência, e ao incentivo e auxílio, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Robert Alan Burrow pelo companheirismo, apoio e ajuda durante o decorrer desta jornada.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de estudo numa universidade pública.

Ao CNPq, por disponibilizar uma bolsa de estudo.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

SELEÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES VISANDO COMPOR UM ARRANJO DE SONDAS DE DNA QUE IDENTIFIQUE ESTIRPES DE PECTOBACTÉRIAS ¹

Autor: Janine Palma
Orientador: Valmir Duarte

RESUMO

A diferenciação entre espécies e subespécies de pectobactérias e outras bactérias fitopatogênicas é feita, basicamente, por testes bioquímicos e fisiológicos. Através de arranjos, macro e micro, de sondas de DNA, uma matriz, semelhante á gerada pelos resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos, poderia ser construída e utilizada na identificação das estirpes. Para isto, há a necessidade da seleção de sondas de características a nível de gênero, espécie e subespécie. Como as sondas são obtidas por PCR, o objetivo desta pesquisa foi selecionar oligonucleotídeos iniciadores baseados em características fenotípicas e genotípicas. A maioria dos oligonucleotídeos iniciadores selecionados gerou produto, diferindo o padrão de amplificação entre os oligonucleotídeos iniciadores e entre as espécies ou subespécies de pectobactérias. Alguns não produziram fragmentos e outros geraram muitos produtos inespecíficos. Os oligonucleotídeos iniciadores 149LF/L1r amplificaram o DNA de todas as *Pectobacterium* spp., enquanto Y1/Y2 amplificaram o DNA apenas da espécie *P. carotovorum*. ADE1/ADE2 gerou produto apenas com a espécie *P. chrysanthemi*. Y45/Y46 e ECA1F/ECA1R são específicos para a subespécie *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*. Outros oligonucleotídeos iniciadores amplificam o DNA de alguns indivíduos dentro da espécie ou subespécie, como RdgF/RdgR e PnIF/PnIR com *P. carotovorum*, Br1F/L1R e HrpNF/HrpNR com *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e CytR-RdF/CytR-BR com *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*. A análise do coeficiente de similaridade da matriz gerada mostrou uma alta similaridade entre as estirpes de cada subespécie, com exceção de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* que mostrou uma alta variabilidade. Estes resultados indicam que esta estratégia gera uma matriz que pode ser utilizada no cálculo do coeficiente de similaridade e auxiliar na identificação de estirpes de pectobactérias.

¹. Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (50 p.). Março, 2006.

SELECTION OF PRIMERS FOR BUILDING AN ARRAY OF DNA PROBES FOR IDENTIFICATION OF PECTOBACTERIA STRAINS²

Author: Janine Palma
Adviser: Valmir Duarte

ABSTRACT

The differences among species and subspecies of pectobacteria and other phytopathogenic bacteria are identified mainly by biochemical and physiological methods. Through arrays (macro and micro) of DNA probes, a matrix, similar to one generated by the results of biochemical and physiological tests, could be built and used to identify strains. To accomplish this, it is necessary to choose probes associated to characteristics at genus, species and subspecies levels. As probes are obtained by PCR, the objective of this research was to select primers based on phenotypic and genotypic traits. Most selected primers amplified the bacterial DNA, giving a distinct pattern to species and subspecies. However, some primers produced no bands or non-specific ones. Primers 149LF/L1r amplified DNA from all *Pectobacterium* spp., while ADE1/ADE2 generated band only with the DNA of *P. chrysanthemi*. Y45/Y46 and ECA1F/ECA1R are specific to *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*. Other primers amplified DNA of some strains inside of a specific species or subspecies: RdgF/RdgR and PnIF/PnIR to *P. carotovorum*, Br1F/L1R and HrpNF/HrpNR to *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, and CytR-RdF/CytR-BR to *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*. The analysis of the similarity coefficient of the matrix revealed a high level of similarity among the strains of each subspecies, with the except to *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. These results indicate that this strategy can be used to create a matrix for the calculation of a similarity coefficient which could be used to identify all major strains of pectobacteria.

² Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (50 p.). March, 2006.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. Os patógenos <i>Pectobacterium chrysanthemi</i> e <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp.....	3
1.2. A genética das características fenotípicas.....	4
1.2.1. Fatores bioquímicos e fisiológicos.....	5
1.2.2. Fatores de patogenicidade e virulência.....	8
1.3. Detecção e identificação de <i>Pectobacterium</i> spp.....	11
1.3.1. Isolamento, testes bioquímicos, fisiológicos e sorológicos.....	11
1.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	13
1.4. A nanotecnologia e os arranjos de DNA.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Estirpes.....	17
2.2. Testes bioquímicos e fisiológicos.....	17
2.3. Extração de DNA bacteriano.....	17
2.4. Seleção de oligonucleotídeos iniciadores.....	19
2.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	19
2.6. Análise dos dados.....	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4. CONCLUSÕES.....	40
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Estirpes de pectobactérias, seus hospedeiros e origem.....	18
2. Oligonucleotídeos iniciadores selecionados para PCR.....	20
3. Concentrações e condições da PCR para cada par de oligonucleotídeos iniciadores.....	22
4. Características bioquímicas e fisiológicas das estirpes de pectobactérias oriundas de diversos hospedeiros.....	24
5. Perfil de amplificação da PCR, das estirpes de <i>Pectobacterium chrysanthemi</i> e de <i>P. carotovorum</i> subsp., utilizando diferentes oligonucleotídeos iniciadores.....	33

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Amplificações de fragmentos de DNA de <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> usando os oligonucleotídeos iniciadores HrpNF/HrpNR, CytR-RdF/CytR-BR, OutH-Fwd/OutH-Ver e RsmA-F1/RsmA-R1.....	36
2. Dendograma gerado pelo método UPGMA usando o coeficiente de similaridade DICE a partir da análise do perfil de amplificação de 29 pectobactérias.....	40

INTRODUÇÃO

As pectobactérias são bactérias fitopatogênicas cuja principal característica é a produção em grande quantidade de enzimas pectolíticas. Estas bactérias causam doenças em diversas culturas, como batata, cenoura, pimentão, pimenta, tomate, abóbora, mandioquinha, brócolis, repolho, entre outros, causando perdas em batata tanto no desenvolvimento da cultura como durante o armazenamento dos tubérculos. Predominam em batata, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. chrysanthemi* e, mais recentemente *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

A diferenciação das espécies e subespécies de bactérias pectolíticas é baseada, principalmente, em testes bioquímicos e fisiológicos, através dos quais a ocorrência de estirpes atípicas com características intermediárias dificulta a identificação correta destes patógenos. Por outro lado, a detecção através da PCR é possível para algumas das subespécies, mas restringe-se a apenas uma característica específica.

Selecionando oligonucleotídeos iniciadores que amplifiquem regiões específicas associadas a características bioquímicas, fisiológicas, de patogenicidade e virulência, a identificação das pectobactérias pode ser feita através de um padrão de amplificação para cada característica, gerando um perfil

para cada espécie e subespécie, a partir do qual uma matriz de sondas de DNA pode ser gerada.

A tecnologia dos arranjos de DNA (macro ou micro) permite a detecção de vários alvos em um mesmo teste, onde a construção de uma matriz de sondas para cada espécie e subespécie de pectobactérias possibilita a identificação através de um perfil de hibridização com as diferentes características.

Este trabalho teve como objetivo selecionar oligonucleotídeos iniciadores baseados em características fenotípicas e genotípicas, que possam gerar sondas de DNA, visando a identificação de pectobactérias através de um perfil para cada estirpe em arranjos de DNA.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Os patógenos *Pectobacterium chrysanthemi* e *Pectobacterium carotovorum* subsp.

As pectobactérias pertencem ao Domínio Eubactéria, Reino Proteobacteria, Subdivisão Gamma, Família Enterobacteriaceae, Gênero *Pectobacterium* (Young et al., 1992).

Após análise e comparação da seqüência 16S do rDNA das espécies do gênero *Erwinia*, a divisão em três grupos filogenéticos foi proposta, resultando em três gêneros: *Erwinia*, *Pectobacterium* e *Brenneria* (Hauben et al., 1998). Outro estudo com hibridização DNA:DNA forneceu mais argumentos para a mudança a favor da nova nomenclatura, onde *Erwinia* é restrito a *E. amylovora* e às espécies patogênicas causadoras de doenças envolvendo necrose, e *Pectobacterium* para espécies causadoras de doenças envolvendo podridão mole (Gardan et al., 2003).

Espécies *Pectobacterium chrysanthemi* (Bulkholder et al.) Brenner et al. emend. Hauben et al. e *P. carotovorum* (Jones) Waldee emend Skerman et al. causam podridão mole em diversos hospedeiros (Pérombelon & Kelman, 1980; Jabuonski et al., 1986; Young et al., 1992; De Boer & Kelman, 2001), tais como, batata, cenoura, pimentão, pimenta, tomate, abóbora, mandioquinha, brócolis, repolho, entre outros.

O grupo *carotovorum* contém várias subespécies, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (van Hall) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum* (Thomson et al.) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Gallois et al.) Hauben et al. e *P. carotovorum* subsp. *wasabie* (Goto & Matsumoto) Hauben et al. (Hauben et al., 1998). E mais recentemente foi proposta a subespécie *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* Duarte et al. (Duarte et al., 2004).

Pectobacterium carotovorum subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. chrysanthemi* estão associadas a podridão mole em batata (Pérombelon & Kelman, 1980; Oliveira et al., 2003b; Souza Dias & Iamauti, 2005). Sendo que as únicas *pectobactérias* consideradas capazes de causar sintomas típicos de canela preta, nos tecidos da haste, em plantas de batata são *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pérombelon & Kelman, 1987; Hélias et al., 2000; De Boer, 2002) e *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Duarte et al., 2004).

As bactérias pertencentes ao gênero *Pectobacterium* são bastonetes retos, medindo de 0,5-1,0 x 1,0-3,0 μ , móveis por meio de flagelos peritricos, não formadoras de esporos, Gram negativas, anaeróbicas facultativas, oxidase negativas e catalase positivas, caracterizadas por produzir grande quantidade de enzimas pectolíticas (De Boer & Kelman, 2001).

1.2. A genética das características fenotípicas

A emergência do seqüenciamento causou um significativo impacto em muitos campos da biologia. Muitos genomas completos de bactérias patogênicas da família *Enterobacteriaceae* já foram revelados, incluindo a bactéria modelo

Escherichia coli (Blattner et al., 1997; Perna et al., 2001). Entretanto, entre as enterobacteriáceas fitopatogênicas, apenas *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* teve seu genoma completo seqüenciado (Bell et al., 2004) onde foram descritos uma série de genes envolvidos em diversos fenótipos. Porém, o seqüenciamento estratégico de regiões do DNA tem desvendado genes relacionados com o metabolismo, patogenicidade e virulência de diversas bactérias (NCBI, 2006).

1.2.1 Fatores bioquímicos e fisiológicos

As pectobactérias podem utilizar diversas fontes de açúcares no seu metabolismo, como sacarose, glicose (α -metil glicosídeo), sorbitol, melbiose, rafinose, arabitol, lactose, maltose, entre outros (De Boer & Kelman, 2001). As enzimas envolvidas no metabolismo de açúcares são codificadas por genes agrupados em operons. Em *Escherichia coli* o operon *lac* (lactose) contem o gene *lacZ*, codifica para β -galactosidase, gene *lacY*, codifica para permease dos β -galactosídeos e gene *lacA*, codifica para transacetilase dos β -galactosídeos (Lewin, 2000). O operon *mel* (melbiose) contem os genes *A* e *B* os quais codificam, respectivamente, α -galactosidase e melbiose permease (Schmitt, 1968). O operon *raf* codifica três genes envolvidos no metabolismo da rafinose: α -galactosidase, rafinose permease e invertase (Schmid & Schmitt, 1976).

Certos açúcares estão envolvidos num sofisticado sistema de transporte e fosforilação através da membrana celular, o fosfoenolpiruvato: sistema fosfotransferase de açúcares (PTS). Este sistema também está envolvido na regulação de vários caminhos metabólicos e no transporte e fosforilação de proteínas (Saier, Jr. & Reizer, 1994). O PTS é composto por um complexo de

proteínas: Enzima I (EI) e fosfoproteína com histidina (HPr), que são proteínas comuns, e Enzimas II (EII) específicas para os açúcares, composta por três domínios (IIA, IIB e IIC). As várias enzimas EII podem ser divididas em cinco classes: Classe glicose (glicose, trealose, maltose, *N*-acetilglucosamina, sacarose e β -glicosídeos), classe manitol (manitol e frutose), classe lactose (lactose e celobiose), classe manose (manose, L-sorbose) e PTS não classificado (glucitol/sorbitol) (Postma et al., 1993).

Os genes para as proteínas HPr (*ptsH*) e EI (*ptsl*) estão agrupados no operon *pts*. Em contraste, os genes para os específicos substratos EII, com poucas exceções, estão agrupados em operons junto com genes estruturais que codificam para as correspondentes enzimas metabólicas. Genes EII, envolvidos na ativação e expressão de classes PTS, foram identificados em diversas bactérias, como os genes *umgC*, *ptsG*, *crr* (glicose) em *Escherichia coli*; regulon *sac* (sacarose) em *Bacillus subtilis*; operon *mtlADR* (manitol) em *E. coli*; genes *lacE* e *lacF* (lactose) em diversas bactérias; e genes *gutA* e *gutB* (glucitol/sorbitol) em *E. coli* (Postma et al., 1993). Foi identificado em *P. chrysanthemi* o sistema *celb* específico para os β -glicosídeos celobiose, arbutina e salicina, e *arb* específico para esculina, arbutina e salicina (el Hassouni et al., 1990). Na busca de genes que são expressados durante a infecção por *P. chrysanthemi* foram identificados três genes do PTS: *ptsl* e dois genes para glicose (Okinaka et al., 2002).

As bactérias são capazes de detectar mudanças químicas (atrativos ou repelentes) em seu ambiente através de específicos quimiorreceptores, que respondem regulando o movimento flagelar. Existem moléculas quimiorreceptoras diretas (ex. asparato, serina), e moléculas quimiorreceptores com proteínas

ligantes (ex. proteína ligante maltose, galactose e ribose) (Kondoh et al., 1979). O sinal recebido é traduzido por proteínas quimiotáticas receptoras de metil (methyl accepting chemotaxis - MCP), integrantes da membrana celular, que são essenciais para a resposta e adaptação bacteriana (movimento flagelar) aos estímulos ambientais. As MCPs sofrem metilação reversível durante a adaptação da bactéria para atrativos e repelentes ambientais (Kehry & Dahlquist, 1982). Os genes *tsr* e *tar* produzem as MCPs (MCPI e MCP II), o gene *cheR* (metiltransferase) está associado com a metilação das MCPs, o gene *cheB* (metilesterase) com a demetilação, *cheA*, *cheY* e *cheZ* estão relacionados com o sinal para o flagelo. (Slocum & Parkinson, 1983).

O seqüenciamento do genoma de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* revelou uma série de genes envolvidos no metabolismo bacteriano, 36 MCPs, 80 propostos sistemas ABC de transporte e 336 propostos reguladores, sugerindo que é capaz de responder a várias fontes de nutrientes se adaptando a diversos ambientes. *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* parece ter seqüências similares ao gene *nif* para fixação de nitrogênio e aos genes *occQMPJ* para catabolização de opinas, mostrando potencial para sobreviver no solo e na rizosfera. Também carrega genes similares a produção do antibiótico fenazina (*ehp*) por *Pantoea agglomerans*, o qual pode dar vantagens competitivas no solo ou hospedeiro (Bell et al., 2004).

Pectobacterium chrysanthemi tem como característica ser sensível ao antibiótico eritromicina, diferentemente das demais pectobactérias (De Boer & Kelman, 2001). A resistência bacteriana para alguns antibióticos (eritromicina, lincosamina e streptogamina tipo B) é obtida pela alteração da região 23S rRNA por uma adenina metilada pelo produto dos genes *erm* (metilação do ribossomo

pela eritromicina) (Weisblum, 1995). Treze genes *erm* que codificam metilases rRNA foram identificados a partir de patógenos humanos e bactérias do solo. As classes *ermA*, *ermB* e *ermC* são encontradas em bactérias patogênicas (Arthur et al., 1990). Também há outros determinantes de resistência a eritromicina (macrolídeo), como enzimas (*ereA* e *ereB*) em *E. coli*; fosfotransferases (*mphA*) em entobacteriáceas; emissores de macrolídeos em *Staphylococcus* (*mrsA* e *mrsB*), *Neisseria gonorrhoeae* (*mtr*) e *Streptococcus* (*mefA* e *mefE*) (Sutcliffe et al., 1996).

1.2.2. Fatores de patogenicidade e virulência

As pectobactérias têm a característica de produzir enzimas extracelulares, como as pectinases (pectato liases (Pel), pectina liases (Pnl), poligalacturonases (Peh) e pectina metil-esterases (Pme), que degradam o pectato presente na lamela média, que cimenta as células do tecido das plantas, e as celulases (Cel) e proteases (Prt), que auxiliam a atividade das pectinases (Collmer & Keen, 1986; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1996; Pérombelon, 2002; De Boer, 2003; Toth et al., 2003).

Pectobacterium carotovorum e *P. chrysanthemi* induzem sintomas similares, mas a produção de enzimas pectolíticas e seus sistemas de regulação e secreção são bastante distintos. As pectinases se apresentam de várias formas (isoenzimas), codificadas por genes independentes, variando tipo e número entre espécies e subespécies, assim como varia a atividade enzimática, onde Pels secundárias (ou menores) têm atividade reduzida em relação as maiores. *P. chrysanthemi* contém, geralmente, cinco Pels maiores em duas famílias (Pel A, D, E e Pel B, C) e quatro menores (Pel I, L, Z e X), para *P. carotovorum* subsp.

carotovorum há quatro Pels maiores (Pel A, B, C e D) e outros Pels menores, e três Pels maiores em *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pel A, B e C) (Pérombelon, 2002; Toth et al., 2003). Embora a produção das pectinases seja importante para a virulência e patogenicidade, nem todas as isoenzimas são requeridas em todas as situações. As Pels secundárias são produzidas somente quando a bactéria entra em contato com as células das plantas (Kelemu & Collmer, 1993). Em *P. chrysanthemi*, Pel E mostrou ser mais importante na patogenicidade que Pel B e C, demonstrando diferenças entre famílias maiores (Payne et al., 1987). Outro estudo mostra diferenças na virulência entre Pels menores (PelL, PelZ) de *P. chrysanthemi*, onde PelL e PelZ apresentaram maior importância que PelZ (Jafra et al., 1999).

Fatores do ambiente como temperatura, concentração de oxigênio (Pérombelon & Kelman, 1980) e pH (Pérombelon, 2002) afetam a produção das enzimas extracelulares. A temperatura ótima para produção da Pel para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* é 12 °C, enquanto que para *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* está entre 15 e 17 °C, e a temperatura ótima para a produção da Prt para estas duas subespécies está entre 17 e 28 °C (Smadja et al., 2004b). Outro estudo mostrou que os genes das isoenzimas PelA e PelD foram melhor expressados sob condições de pH ácido (5,5 ou 6,0), e PelE em pH básico (8,0) (Nachin & Barras, 2000).

Há vários genes envolvidos na regulação da produção das enzimas pectolíticas (Duarte & El Tassa, 2003; De Boer, 2003). Genes de regulação global tais como *hexA* e *hexY* provavelmente reprimam uma cascata de reguladores secundários pois mutações nestes genes levam a uma produção excessiva de exoenzimas e também hiper mobilidade e produção de harpin, a proteína

envolvida em incitar a resposta de hipersensibilidade (Harris et al., 1998; Shih et al., 1999). O produto do gene *kdgR* regula negativamente a produção de exoenzimas (Liu et al., 1999). Os genes *rsmA* e *rsmB* também regulam negativamente a produção das enzimas pectolíticas, e a produção de ambos é regulada por um terceiro gene, o *rsmC*, formando um sistema de regulação global (Liu et al., 1998). Outros sistemas regulam os fatores de virulência positivamente, como *gacA/gacS* (Cui et al., 2001) e *expS/expA* (Eriksson et al., 1998). O gene *rpfA* codifica uma proteína que está envolvida na produção da protease e celulase (Frederick et al., 1997). E a produção da pectina liase é regulada por um circuito regulatório envolvendo os genes *recA*, *rdgA* e *rdgB* (Liu et al., 1994; Liu et al., 1996; Liu et al., 1997).

A patogenicidade bacteriana requer mecanismos para transportar para fora da célula moléculas envolvidas na patogênese. Em pectobactérias, proteases são secretadas diretamente dentro da célula vegetal via sistema tipo I. Pectinases e celulases são secretadas via sistema tipo II, um processo de dois passos que inclui um estágio periplásmico intermediário (Sandkvist, 2001), e são codificados por 15 genes do grupo *out* (*out* BCDEFGHIJKLMNOP) (Thomas et al., 1997), onde *outN* está ausente em *P. chrysanthemi* (Sandkvist, 2001).

A importância de um terceiro sistema de secreção (tipo III) para a patogenicidade é indicada pela presença do conjunto de genes *hrp* (reação de hipersensibilidade e patogenicidade) em *P. chrysanthemi* e *P. carotovorum* (Rantakari et al., 2001; Bell et al., 2002; Yang et al., 2002; Lehtimäki et al., 2003). Duas classes de proteínas (24 genes) são secretadas por este sistema: harpins e proteínas de avirulência, sendo que, a secreção de proteínas para a célula

hospedeira requer a presença de um pilus formado pela proteína HrpA (He, 1998).

A produção das enzimas pectolíticas em pectobactérias é dependente do número de indivíduos bacterianos (sensor de quorum), controlada pela molécula sinal *N*-acil homoserina lactona (AHL) (Whitehead et al., 2001; Smadja et al., 2004a). Esta descoberta tem dado uma nova visão de como a bactéria responde e interage com seu ambiente.

1.3. Detecção e identificação de *Pectobacterium* spp.

Meios de cultura seletivos, testes bioquímicos, sorológicos e técnicas baseadas na PCR têm sido desenvolvidos para isolamento, detecção, identificação e caracterização de pectobactérias (Duarte & El Tassa, 2003).

1.3.1. Isolamento, testes bioquímicos, fisiológicos e sorológicos

Cristal violeta pectato (CVP) é o mais importante meio de cultura seletivo usado para o isolamento, detecção e contagem de *Pectobacterium* sp. em plantas e do ambiente (Cuppels & Kelman, 1986). A seletividade é baseada na habilidade do patógeno em hidrolisar o polipectato e formar cavidades típicas na superfície do meio de cultura (Hyman et al., 2001) . O fruto de pimentão verde pode ser usado como meio parcialmente seletivo no isolamento de pectobactérias de vários hospedeiros (Takatsu et al., 1981), visto que, a seletividade do pimentão para pectobactérias é bastante elevada, permitindo o isolamento mesmo que o material original esteja em adiantado estado de decomposição.

Testes bioquímicos e fisiológicos são bastante utilizados na identificação de espécies e subespécies de pectobactérias, onde a identificação é

baseada num padrão de reação bacteriana para testes diferenciais. Entre os principais testes bioquímicos e fisiológicos utilizados na identificação de pectobactérias estão o crescimento a 37 °C, presença de fosfatase, produção de substâncias redutoras de sacarose, sensibilidade à eritromicina, produção de indol, utilização de α -metil glicosídeo, produção de ácidos a partir de sorbitol, melibiose, citrato, rafinose, arabitol, lactose e maltose (Hyman et al., 1998; De Boer & Kelman, 2001). No entanto a ocorrência de formas intermediárias dificulta a interpretação dos resultados, impossibilitando muitas vezes a classificação correta destas bactérias (Stanghellini & Meneley, 1975; Jabuonski et al., 1986; Oliveira et al., 2003a).

Métodos sorológicos como o de aglutinação (Graham, 1963), imunofluorescência (De Boer et al., 1979; Van Vuurde et al., 1998), difusão dupla em agar (De Boer et al., 1979; Dickey et al., 1984) , ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (De Boer & McNaughton, 1987; Gorris et al., 1994) e separação imunomagnética em meio CVP (IMS-CVP) (Van Der Wolf & Pérombelon, 1998) foram utilizados com diferentes graus de sucesso na detecção de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. chrysanthemi*.

Pectobacterium carotovorum subsp. *atrosepticum* e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* apresentam uma estreita relação sorológica, sendo a especificidade conferida por componentes da parede celular, principalmente, lipopolissacarídeos (antígeno O). Anticorpos monoclonais foram desenvolvidos para detecção de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, como o 4F6 do Canadá (De Boer & McNaughton, 1987) e 4G4 da Espanha (Gorris et al., 1994), e para *P.*

chrysanthemii, denominados 6A6, com especificidade a fímbrias (Singh et al., 2000).

1.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR baseia-se na amplificação enzimática do DNA, direcionada por dois oligonucleotídeos iniciadores, baseados numa seqüência específica, que permite obter *in vitro* milhares de cópias de um determinado segmento de DNA (Mullis & Fallona, 1987).

Na obtenção de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação de regiões específicas deve-se levar em conta dois fatores: especificidade e eficiência de amplificação. Especificidade de um oligonucleotídeo iniciador é a freqüência que ocorre um evento de anelamento específico a uma seqüência-alvo, e eficiência é o quanto um par de oligonucleotídeos iniciadores pode duplicar um produto a cada ciclo da PCR (Dieffenbach et al., 1995).

A sensibilidade é outro fator importante, principalmente na detecção de microrganismos a partir de material vegetal (Pérombelon et al., 1998; Lievens & Thomma, 2005). Como para as pectobactérias, que podem permanecer nos tubérculos de batata (lenticelas, estolão e tecidos suberizados), em baixo nível, de forma latente, sem causar sintomas (Hélias et al., 2000; De Boer, 2002).

No geral, há duas maneiras de selecionar seqüências alvos específicas: A primeira buscando genes específicos no DNA, ou variações em genes conservados como rDNA, a segunda fazer uma varredura ao acaso em partes do genoma em busca de seqüências distintas usando marcadores moleculares (Lievens & Thomma, 2005). Diante da necessidade de comparar filos, ordens, famílias ou gêneros, geralmente, analisa-se genes conservados,

mas genes menos conservados podem ser usados quando investigadas espécies dentro de gêneros ou níveis taxonômicos abaixo de espécie (Lévesque, 2001).

As seqüências-alvo que têm sido utilizadas para a identificação de pectobactérias através da PCR são: genes codificadores de pectato liase para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Fréchon et al., 1998), *P. chrysanthemi* (Nassar et al., 1996) e *P. carotovorum* (Darrasse et al., 1994), metaloprotease para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* e *P. chrysanthemi* (Smid et al., 1995), seqüências aleatórias do DNA obtidas a partir de RFLP para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (De Boer & Ward, 1995), seqüências obtidas do produto de seqüências repetitivas (URP-PCR) para *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Kang et al., 2003) ou região 16S do rDNA para *P. carotovorum* (Toth et al., 1999).

Marcadores moleculares, como RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), também vêm sendo usados para identificação de espécies e subespécies de pectobactérias (Parent et al., 1996; Toth et al., 2001; Waleron et al., 2002; El Tassa Colodel, 2004).

1.4. A nanotecnologia e os arranjos de DNA

A nanotecnologia está ampliando os limites do diagnóstico molecular para a nanoescala. Nanotecnologia é o termo usado para a construção e utilização de estruturas funcionais que tenham ao menos uma característica com dimensões dentro da escala nano ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ou 1 bilionésimo de metro). A utilização da nanotecnologia nas ciências da vida é chamada nanobiotecnologia (Durán & Azevedo, 2005).

A maior aplicação da nanobiotecnologia no diagnóstico molecular está dentro da categoria dos biochips ou microarranjos de DNA (Jain, 2004). A nanobiotecnologia é baseada na construção dos biochips, onde diferentes tecnologias de manufatura podem ser utilizadas (Lipshutz et al., 1999; Thibault et al., 2005), sendo que as sondas de DNA são o elemento central na construção de um arranjo de DNA (Wosik, 2005).

Macroarranjos (macroarrays), microarranjos (microarrays) ou biochips são denominados de acordo com a quantidade de fragmentos de DNA (sondas) que são adicionados ao suporte sólido (reverse dot-blot), que pode ser membrana de nylon ou nitrocelulose para macroarranjos, ou lâmina de vidro para microarranjos ou biochips. Cada ponto no arranjo é composto de muitas sondas idênticas complementares a um gene de interesse. Durante a hibridização, um DNA alvo marcado encontra uma seqüência complementar, se anela e forma um DNA de dupla fita (Call, 2001).

A tecnologia dos arranjos de DNA possibilita a adição do aspecto multiplex (Lévesque, 2001; Lievens & Thomma, 2005), onde um grande número de oligonucleotídeos integrados a uma pequena área na superfície de um chip facilita e torna mais rápida a detecção simultânea de muitas seqüências de genes (Kurata & Suyama, 1999).

Os biochips vêm sendo usados para o monitoramento da expressão gênica, análise de seqüências de DNA, genotipagem, diagnóstico e identificação (Lockhart et al., 1996; Lipshutz et al., 1999; Call, 2001). Na fitopatologia foi aplicado para análise de respostas de defesa da planta (Kazan et al., 2001), estudos taxonômicos (Cho & Tiedje, 2001), expressão gênica (Okinaka et al.,

2002) e identificação de bactérias (Fessehaie et al., 2003), fungos (Lievens et al., 2003), oomicetos (Lévesque et al., 1998) e vírus (Boonham et al., 2003).

As sondas de DNA são desenhadas para uma perfeita complementaridade a uma seqüência-alvo (Wosik, 2005) e podem ser obtidas de diferentes maneiras. Nos microarranjos e biochips, as sondas escolhidas previamente podem ser sintetizadas *in situ* (Lipshutz et al., 1999), ou pela PCR (Kurata & Suyama, 1999; Cho & Tiedje, 2001; Boonham et al., 2003; Thibault et al., 2005), e nos macroarranjos geralmente são obtidas por PCR (Lévesque et al., 1998; Lievens et al., 2003; Lievens et al., 2005).

Os arranjos de DNA utilizam a taxonomia numérica para análise de resultados, entre outras técnicas, para definir níveis hierárquicos na análise através de coeficientes de similaridade (Dopazo, 2006). A taxonomia numérica analisa um número grande variantes, onde diferentes estirpes são reunidas em determinados níveis selecionados de semelhança global, baseando-se na freqüência (similaridade) com que tais estirpes compartilham determinadas características (fenotípicas ou genotípicas), fornecendo dados para elaboração de uma matriz de similaridade para a identificação de estirpes desconhecidas em relação a taxons definidas. A presença ou ausência da característica (1 ou 0/+ ou -) são a base para o cálculo do índice de similaridade através de um coeficiente para a construção da matriz de similaridade (Sneath, 1984).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

2.1. Estirpes

As estirpes utilizadas neste estudo, procedentes de vários hospedeiros, estão listadas na TABELA 1.

2.2. Testes bioquímicos e fisiológicos

As estirpes foram avaliadas com os seguintes testes: Gram, atividade pectolítica em batata, oxidase, catalase, oxidação/fermentação, crescimento a 37 °C, utilização de α -metil glicosídeo, sensibilidade à eritromicina, produção de substâncias redutoras de sacarose, produção de ácidos a partir de maltose D(+), lactose e sorbitol (Hyman et al., 1998; De Boer & Kelman, 2001).

2.3. Extração de DNA bacteriano

Culturas bacterianas, crescidas em placa, com 24-48 h, foram transferidas para 250 μ l de tampão de extração (100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM

EDTA; 1% SDS e 5 µg de proteinase K), com o auxílio de um palito de dente e incubadas por 3 h a 56 °C em banho-de-água. Posteriormente, 250 µl de acetato

TABELA 1. Estirpes de pectobactérias, seus hospedeiros e origem. Porto Alegre, RS. 2005.

Estirpes	Hospedeiro	Origem	Fonte
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>			
Pca 31	Batata	Canadá	De Boer, S. H. ¹
Pca 41	Mandioquinha	Distrito Federal, BR	Henz, G. P. ²
Pca 46			
Pca 47			
Pca 48			
Pca 50			
151			
Pca 5	Batata	Distrito federal, BR	Henz, G. P.
Pca 6			
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>			
Pcbr 212 ¹	Batata	Rio Grande do Sul, BR	Duarte, V. ³
Pcbr 8			
Pcbr 371			
Pcbr MB9	Batata	Rio Grande do Sul, BR	El Tassa, S. O. M. ³
Pcbr MB11			
Pcbr MB12			
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>			
IBSBF 1442	<i>Dianthus caryophyllus</i>		Instituto Biológico, SP
Pcc MPB8	Batata	Rio Grande do Sul, BR	El Tassa, S. O. M.
Pcc PMAB19			
Pcc BAB20			
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>			
CEN 06	Cenoura	Minas Gerais, BR	Henz, G. P.
CEN14			
CEN80			
C14	Mandioquinha	São Paulo, BR	Henz, G. P.
C16			
P16			
P41			
Abob65	Abóbora	Distrito Federal, BR	Henz, G. P.
AG8	Pimenta	Bahia, BR	Henz, G. P.
AG29			

¹CFIA, Canadá;

²Embrapa Hortaliças, Brasília, DF;

³UFRGS, Porto Alegre, RS.

de amônio 7,5 M foram adicionados, misturados e centrifugados (Micro Centrífuga Refreigerada – CIENTEC) a 14000 g por 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, igual volume de isopropanol foi adicionado e incubado durante a noite a -20 °C. Após, foi centrifugado a 14000 g por 25 min a 4 °C, e o precipitado lavado com etanol 70%, centrifugado a 14000 g

por 5 min a 4 °C, seco a temperatura ambiente, dissolvido em 25 µl de água ultra-pura e armazenado a -20 °C (De Boer & Ward, 1995). Para utilização na PCR, o DNA extraído foi diluído em água ultra-pura (1:25).

2.4. Seleção de oligonucleotídeos iniciadores

Oligonucleotídeos iniciadores (TABELA 2) foram escolhidos a partir de seqüências de genes associados a diferentes características fenotípicas e regiões genômicas de pectobactérias e de outras bactérias.

2.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA extraído das estirpes (TABELA 1) foi submetido à PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores listados na TABELA 2. As reações foram feitas em um volume final de 10 µl, contendo tampão de reação (10 mM Tris pH 8,3; 50 mM KCl), MgCl₂, dNTP (Invitrogen), *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e DNA da amostra, nos termocicladores MJ Research PTC-100 e Techne Progene.

As concentrações e condições de reação da PCR variaram para os oligonucleotídeos iniciadores (TABELA 3). Algumas das reações foram otimizadas, ajustando componentes da reação assim como a temperatura de anelamento. Cada reação foi conduzida, no mínimo, duas vezes com cada par de oligonucleotídeos iniciadores.

Os produtos das ampliações foram separados por eletroforese (5V/cm por 2 h) em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz ultra-violeta e fotografado (SONY Cyber-shot).

TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores selecionados para PCR. Porto Alegre, RS. 2005.

Gene/ região genômica	Oligonucleotídeos iniciadores	Fragmento (pb)	Proteína/região o genômica	Espécie fonte	GenBank e/ou referência
IGS	149LF: 5'- GAA GTC GTA ACA AGG TA--3' L1r: 5'-CA(A/G)GGCATCCACCGT-3'	Pc: 450 e 490 Pch: 356 e 491	Região intergênica rDNA	<i>Pectobacterium</i>	(Fessehaie et al., 2002)
IGS	Br1F: 5'-GCGTGCCGGGTTTATGACCT-3' L1R: 5'-CA(A/G)GGCATCCACCGT-3'	322	Região intergênica rDNA	Pcbr e Pcc ⁴	(Duarte et al., 2004)
<i>peB</i>	Y1: 5'-TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT-3' Y2: 5'-CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT-3'	434	Pectato liase	Pca	X16397 (Darrasse et al., 1994)
<i>peB</i>	Y45: 5'-TCACCGGACGCCGAAGTGTGGCGT-3' Y46: 5'-TCGCCAACGTTTCAGCAGAACAAGT-3'	438	Pectato liase	Pca	A62563 (Fréchon et al., 1998)
ECA ¹	ECA1F: 5'-CGGCATCATAAAAACACG-3' ECA1R: 5'-GCACACTTCATCCAGCGA-3'	690	-	Pca	(De Boer & Ward, 1995)
<i>peA-peID- peE</i>	ADE1: 5'-GATCAGAAAAGCCCGCAGCCAGAT-3' ADE2: 5'-CTGTGGCGATCAGGATGGTTTTGTC GTGC-3'	420	Pectato liase	Pch	(Nassar et al., 1996)
<i>Pnl</i>	PnIF: 5'-CGGGAGGTAAAGTCGTTACGG-3' PnIR: 5'-TCCCTTTATTTCCGCGCCGG-3'	680	Pectina liase	Pcc	M59909 (Dellagi et al., 2000)
<i>Rdg</i>	RdgF: 5'-GATTGGCGTATCTCAGGCCG-3' RdgR: 5'-CGACCAGAAGCTCGGGACC-3'	1160	Pectina liase	Pcc	L32173 (Dellagi et al., 2000)
<i>hrpN</i>	HrpNF: 5'-GAGTTGAACAACATCAGTACGC-3' HrpNR: 5'-ATCGTGCATCAATACCCAGC-3'	344	Hipersensibilida de	Pcc	L78834 (Dellagi et al., 2000)
<i>Erm</i>	E1+: 5'-GAGATIGGIIIIGGIAAGGGICA-3' E2+: 5'-AACTGGTTTTTIGTGAA-3'	530	Resistência à eritromicina	Enterobacteriace as e cocos gram- positivas	(Arthur et al., 1990)
<i>sdaD</i>	DNA17: 5'-TAATAGCCGATAGCTTAG-3' DNA18: 5'-TACCAATATACATTAGAC-3'	480	Dnase	<i>Streptococcus pyogenes</i>	(Podbielski et al., 1996)
<i>hecA</i>	HecA-1: 5'-CCAGCAATGGCCGCAGGCGTGC-3' HecA-2: 5'-CCAGATAGCCCGCCAGCGTACTGC-3'	530	Adesina	Pch	L39897 (Bell et al., 2002)
<i>pecS</i>	PecS-1: 5'-CATGAATACTCCATCCCCATCACAC- 3' PecS-2: 5'-CGATAATCGGTGTGATTGGCATG-3'	267	Pectinase Celulase	Pch	X74409 (Bell et al., 2002)
Xhem ²	Xhem-1: 5'-GGCAGTAACCCTGACTGTAGCTG-3' Xhem-2: 5'-CGCCAGCGTCAGTGCATC-3'	816	Hemaglutinina	Pcc	AE003928, AE004032, AE004082 (Bell et al., 2002)

Continuação **TABELA 2.** Oligonucleotídeos iniciadores selecionados para PCR. Porto Alegre, RS. 2005.

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores	Fragmento (pb)	Proteína	Espécie fonte	GenBank e/ou referência
<i>rsmA</i>	RsmA-F1: 5'-GGA TCC GGC AAG CAG GAT AG-3'	500	Regulação exoenzimas	Pcc	L40173 (Yap et al., 2004)
	RsmA-R1: 5'-TGC GTC CCG CGA ACA CGA G-3'				
<i>outH</i>	OutH-Fwd: 5'-GCT GCT GGA AAT CAT GCT GG-3'	500	Sistema secreção tipoll	Pcc	X70049 (Yap et al., 2004)
	OutH-Rev: 5'-GTC TCC GGC GAC GTG TGC AC-3'				
<i>rpf</i>	Rpf-F: 5'-GCC GGA CGA TAC TGC ATC GC-3'	620	Regulação Celulase, protease	Pcc	U62023 (Dellagi et al., 2000)
	Rpf-R: 5'-TGA TGT CAT CAT CCG TTT GCC C-3'				
<i>pehR-pehS</i>	Peh-F: 5'-GGT ACC AAC CAT TTC CAG CCT G-3'	2500	Regulador/sensor poligalacturonase	Pcc	AF022772 (Flego et al., 2000)
<i>cytR</i> ³	Peh-R: 5'-CTC GAG ATT GAG CTG ATA GAC-3'	1200	Regulador poligalacturonase e síntese flagelar	Pcc	AB092604 (Matsumoto et al., 2003)
	CytR-RdF: 5'-ATC TGC TTC GTA GGG TAC ATC TTT CGG GGT-3'				
	CytR-BR: 5'-CGG CAG GAT CCA TGG TTT TGA AGG AGC CGC-3'				

¹ECA: oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir de fragmento obtido por RFLP;

²Xhem: gene tipo ao gene para hemaglutina de *Xylella fastidiosa*;

³*cytR*: gene homólogo ao *cytR* de *Escherichia coli*;

⁴Pca, *Pectobacterium carotovorum* subsp. atrosepticum; Pcbr, *P. carotovorum* subsp. brasiliensis; Pcc, *P. carotovorum* subsp. carotovorum; Pch, *P. chrysanthemi*.

2.6. Análise dos dados

Os dados foram analisados pelo programa estatístico NTSYS versão 1.7 onde foi determinada a matriz de similaridade e construído o dendrograma. Pelo perfil de amplificação dos DNA das estirpes, com os oligonucleotídeos iniciadores, foi determinada a presença ou ausência da amplificação e codificada como 1 ou 0, respectivamente. A matriz de similaridade foi construída utilizando o coeficiente de DICE e os agrupamentos feitos de acordo com o método UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Average).

TABELA 3. Concentrações e condições da PCR para cada par de oligonucleotídeos iniciadores. Porto Alegre, RS. 2005.

Oligonucleotídeos iniciadores	Oligonucleotídeos iniciadores (μM)	Tampão (X)	dNTP (mM)	MgCl ₂ (mM)	Taq DNA polimerase (U)	Condições das reações	Referência
149LF/L1R	149LF: 1,0						
Br1F/L1R	L1R: 1,0 Br1: 1,0	1,0	0,1	2,5	0,5	94 °C/2'; (94 °C/45", 64 °C/45", 72 °C/90") 30X; 72 °C/10'	(Fessehaie et al., 2002)
Y1/Y2	L1R: 0,5 Y1: 1,0	1,0	0,1	2,0	0,5	94 °C/2'; (94 °C/45", 64 °C/45", 72 °C/90") 30X; 72 °C/10'	(Duarte et al., 2004)
Y45/Y46	Y1: 1,0 Y2: 1,0 Y45: 1,0 Y46: 1,0	1,0	0,1	2,5	0,2	94 °C/2'; (94 °C/ 60", 64 °C/60", 72 °C/30) 24X; 72 °C 10'	(Darrasse et al., 1994)
ECA1F/ECA1R	ECA1F: 1,0 ECA1R: 1,0	1,0	0,1	2,0	1,0	94 °C 5'; (94 °C/ 50", 65 °C/50", 72 °C/50") 35X; 72 °C/8'	(Fréchon et al., 1998)
ADE1/ADE2	ADE1: 1,0 ADE2: 1,0	1,0	0,1	2,5	0,5	94 °C/4'; (94 °C/60", 65 °C/60", 72 °C/60") 35X; 72 °C/5'	(Nassar et al., 1996)
PnIF/PnIR	PnIF: 0,8 PnIR: 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)
HrpNF/HrpNR	HrpNF: 0,8 HrpNR: 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)
E1+/E2+	E1+: 2,0 E2+ 2,0	1,0	0,2	2,5	1,0	93 °C/3'; (93 °C/60", 54 °C/60", 72 °C/60") 35X; 72 °C/5'	(Arthur et al., 1990)
DNA17/DNA18	DNA17: 0,8 /DNA18: 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'	(Podbielski et al., 1996)
HecA-1/HecA-2	HecA-1: 0,8 HecA-2: 0,8	1,0	0,1	2,0	1,0	94 °C/2'; (94 °C/30", 64 °C/30", 72 °C/60") 34X; 72 °C/10'	(Bell et al., 2002)
PecS-1/PecS-2	PecS-1: 0,8 PecS-2: 0,8	1,0	0,1	2,0	1,0	94 °C/2'; (94 °C/30", 64 °C/30", 72 °C/60") 34X; 72 °C/10'	(Bell et al., 2002)
Xhem-1/Xhem-2	Xhem-1: 0,8 Xhem-2: 0,8	1,0	0,1	2,0	1,0	94 °C/2'; (94 °C/30", 64 °C/30", 72 °C/60") 34X; 72 °C/10'	(Bell et al., 2002)
RsmA-F1/ RsmA-R1	RsmA-F1: 0,8 RsmA-R1: 0,8	1,0	0,1	2,0	0,5	94 °C/2'; (94 °C/45", 64 °C/45", 72 °C/90") 30X; 72 °C/10'	(Yap et al., 2004)
OutH-Fwd/ OutH-Rev	OutH-Fwd: 0,8 OutH-Rev: 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'	(Yap et al., 2004)
Rpf-F/Rpf-R	Rpf-F: 0,8 Rpf-R: 0,8	1,0	0,1	2,0	1,0	94 °C/2'; (94 °C/45", 66 °C/45", 72 °C/90") 30X; 72 °C/10'	(Dellagi et al., 2000)
Peh-F/Peh-R	Peh-F: 0,8 Peh-R: 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'	(Flego et al., 2000)
CytR-RdF/ CytR-BR	CytR-RdF: 0,8 CytR-BR: 0,8	1,0	0,1	2,0	1,0	94 °C/2'; (94 °C/45", 66 °C/45", 72 °C/90") 30X; 72 °C/10'	(Matsumoto et al., 2003)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estirpes utilizadas neste trabalho foram cedidas por pesquisadores (TABELA 1), sendo que algumas tiveram sua identificação mudada a partir da caracterização bioquímica e fisiológica (TABELA 4).

As vinte e nove estirpes de pectobactérias causaram podridão mole em batata, foram gram positivas, apresentaram resultado positivo para oxidação/fermentação e catalase, e negativo para oxidase, o que as caracteriza como pectobactérias (De Boer & Kelman, 2001). De acordo com os testes bioquímicos e fisiológicos diferenciais para cada subespécie (TABELA 4) seis estirpes foram determinadas como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, 14 como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, uma como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* e cinco como *P. chrysanthemi*.

As estirpes Pca05, Pca06, Pca41, Pca46, Pca47, Pca48 e Pca50 apresentavam-se como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (TABELA 1) e após a caracterização bioquímica e fisiológica observou-se que elas se caracterizavam como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, do mesmo modo as estirpes AG8, AG29, Abob65, e P41 passaram de *P. chrysanthemi* para *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (TABELA 4). Três estirpes apresentaram características intermediárias, não sendo possível a caracterização como espécie (CEN80) e subespécie (BAB20 e CEN06), sendo que CEN80 e CEN06 eram identificadas

como *P. chrysanthemi* e BAB20 como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. A ocorrência de formas intermediárias pelos testes bioquímicos e fisiológicos tem dificultado a correta classificação destas bactérias (Stanghellini & Meneley, 1975; Jabuonski et al., 1986; Oliveira et al., 2003a).

TABELA 4. Características bioquímicas e fisiológicas das estirpes de pectobactérias oriundas de diversos hospedeiros. Porto Alegre, RS. 2005.

Testes/ Isolados	37 °C	Eritromicina	α -metil glicosídeo	Redução de substâncias a partir de sacarose	Produção de ácido a partir de			Identifi cação ¹
					Lactose	Maltose	Sorbitol	
Batata								
Pcbr 212	+	-	+	+	+	+	-	Pcbr
Pcbr8	+	-	+	+	+	+	-	Pcbr
Pcbr371	+	-	+	+	+	+	-	Pcbr
MB9	+	-	+	+	+	+	-	Pcbr
MB11	+	-	+	+	+	+	-	Pcbr
MB12	+	-	+	+	+	+	-	Pcbr
PMAB19	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
MPB8	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
BAB20	+	-	+	-	+	-	-	Pc
Pca05	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
Pca06	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
Dianthus caryophyllus								
IBSBF1442	+	-	-	-	+	+	-	Pcc
Pimenta								
AG8	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
AG29	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
Cenoura								
CEN06	+	-	+	-	+	-	-	Pc
Abóbora								
Abob65	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
Mandioquinha								
Pca41	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
Pca46	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
Pca 47	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
Pca 48	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
Pca50	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
P41	+	-	-	-	+	-	-	Pcc
Batata								
Pca31	-	-	+	+	+	+	-	Pca
Cenoura								
CEN14	+	-	-	-	-	-	-	Pch
CEN80	+	-	-	+	-	-	-	P
Mandioquinha								
P16	+	-	-	-	-	-	-	Pch
C14	+	-	-	-	-	-	-	Pch
C16	+	-	-	-	-	-	-	Pch
151	+	-	-	-	-	-	-	Pch

¹ Pca, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*; Pcbr, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*; Pcc, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pch, *P. chrysanthemi*; Pc, *P. carotovorum*; P, *Pectobacterium*.

Diferentes genes que codificam características fenotípicas e genotípicas foram utilizados para a seleção de oligonucleotídeos iniciadores. Dentre as diversas características fenotípicas que poderiam ser exploradas foram selecionadas, principalmente, para este estudo aquelas relacionadas à patogenicidade e virulência (TABELA 1).

Os oligonucleotídeos iniciadores selecionados foram utilizados para a amplificação do DNA das pectobactérias (TABELA 2). Dos 19 pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a PCR, HecA-1/HecA-2, Xhem-1/Xhem-2, E1+/E2+, PecS-1/PecS-2 e DNA17/DNA18 não produziram produto algum ou tiveram muitos produtos inespecíficos. Os outros 14 pares de oligonucleotídeos iniciadores amplificaram o DNA das bactérias testadas, diferindo o padrão de amplificação entre os oligonucleotídeos iniciadores e entre as espécies ou subespécies de pectobactérias (TABELA 5).

Todas as estirpes de pectobactérias submetidas à PCR com 149LF/L1r tiveram seu DNA amplificado, gerando produtos correspondentes a estes oligonucleotídeos iniciadores (TABELA 5). As estirpes CEN14, CEN80, P16, C14, C16 e 151 formaram dois fragmentos de aproximadamente 350 pb e 500 pb que as diferenciaram das demais estirpes que formaram fragmentos de 450pb e 500 pb. A PCR com 149LF/L1r gera bandas que permitem a diferenciação entre as espécies *P. carotovorum* e *P. chrysanthemi*, a partir da amplificação da região 16S-23S rDNA gerando diferentes fragmentos (Fessehaie et al., 2002). O produto da reação com 149LF/L1r pode ser usado como uma sonda universal, que detecta em nível de gênero as pectobactérias.

As estirpes identificadas pelos testes bioquímicos como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, *P. carotovorum* subsp.

carotovorum e *P. carotovorum* (TABELA 4) tiveram seu DNA amplificado por Y1/Y2, obtendo um fragmento de aproximadamente 450 pb. As cinco estirpes identificadas como *P. chrysanthemi* e a identificada apenas como *Pectobacterium* sp. (CEN80) (TABELA 4) não tiveram seu DNA amplificado (TABELA 5). Y1/Y2 foram desenhados para amplificar uma região correspondente a três genes (*peI153*, *peIB* e *peY*) da família Y das pectato liases de *Yersinia pseudotuberculosis*, para detectar pectobactérias (Darrasse et al., 1994).

Seis estirpes de pectobactérias tiveram seu DNA amplificado com ADE1/ADE2 (TABELA 5), formando um produto de aproximadamente 420 pb, sendo que, o isolado CEN80 não havia sido identificado pelos testes bioquímicos como *P. chrysanthemi* (TABELA 4). ADE1/ADE2 foi desenvolvido para amplificar uma região conservada de um grupo de genes para pectato liase (*pe/ADE*) específicos de *P. chrysanthemi* (Nassar et al., 1996).

Os oligonucleotídeos iniciadores Y1/Y2 e ADE1/ADE2 tem potencial para serem usados como sondas que diferenciam em nível de espécie isolados de pectobactérias, separando *P. carotovorum* de *P. chrysanthemi*, respectivamente.

De todas as estirpes submetidas à PCR com os oligonucleotídeos iniciadores ECA1F/ECA1R e Y45/Y46 apenas a *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pca31) teve seu DNA amplificado (TABELA 5), formando fragmentos de aproximadamente 690 pb e 440 pb, respectivamente. ECA1F/ECA1R foram desenhados a partir de fragmentos obtidos por RFLP que diferenciam estirpes de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* das demais pectobactérias (De Boer & Ward, 1995). Assim como ECA1F/ECA1R, Y45/Y46 foram desenvolvidos para detectar estirpes de *P. carotovorum* subsp.

atrosepticum a partir da amplificação de gene para pectato liase (*peY*) (Fréchon et al., 1998). Estes oligonucleotídeos iniciadores diferenciam a subespécie *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* das demais, sendo que esta subespécie é considerada a responsável por causar sintomas típicos de canela-peta em batata na Europa e América do Norte (Pérombelon & Kelman, 1987; Hélias et al., 2000; De Boer, 2002). A subespécie *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Duarte et al., 2004) foi proposta a partir de estirpes identificadas no Brasil, pelos testes bioquímicos e fisiológicos, como uma *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* atípica, mas quando submetidas aos oligonucleotídeos iniciadores ECA1F/ECA1R e Y45/Y46, seu DNA não foi amplificado (Oliveira et al., 2003a). Assim, os produtos de ECA1F/ECA1R e Y45/Y46 são potenciais sondas de diferenciação de subespécies de importância para batata.

Treze estirpes de pectobactérias tiveram seu DNA amplificado com o uso de Br1F/L1R (TABELA 5), gerando um produto de aproximadamente 320 pb. Destas, seis foram identificadas pelos testes bioquímicos como *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e sete como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (TABELA 4). Os oligonucleotídeos iniciadores Br1F/L1R amplificam o DNA das estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e algumas *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, a partir da região intergênica do rDNA (Duarte et al., 2004). O produto de Br1F/L1R têm potencial para ser usado como sonda para a identificação da subespécie *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, pois estes oligonucleotídeos iniciadores amplificam as *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e algumas *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

A estirpe CEN80 não pode ser identificada em nível de espécie pelos testes bioquímicos e fisiológicos por apresentar características intermediárias a

qualquer espécie (TABELA 4), mas através da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores 149LF/L1r, Y1/Y2 e ADE1/ADE2, foi possível identificá-la como *P. chrysanthemi*. Também, as estirpes BAB20 e CEN06 não tiveram a subespécie determinada pelos testes bioquímicos e fisiológicos, mas através do perfil de amplificação com alguns oligonucleotídeos iniciadores sugere-se a identificação como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, pois não foram obtidos produtos com Y45/Y46 e ECA1F/ECA1R, para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, e com Br1F/L1R para *P. carotovorum* subsp. *bralisiensis*. Pelo perfil de ampliações gerado, com o uso de vários oligonucleotídeos iniciadores, foi possível a identificação de três isolados que pelos testes bioquímicos e fisiológicos apresentavam características intermediárias as espécies ou subespécies.

As estirpes Pcbr8, Pcbr371, MB9, MB11, MB12, PMAB19, BAB20, Pcc1442 e Pca50 tiveram seu DNA amplificado pelos oligonucleotídeos iniciadores HrpNF/HrpNR, produzindo um fragmento de aproximadamente 350 pb. De todas as *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* utilizadas neste estudo, apenas Pcbr212^T não teve seu DNA amplificado por HrpNF/HrpNR, e das 16 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, apenas quatro tiveram seu DNA amplificado por estes oligonucleotídeos iniciadores (TABELA 5). HrpNF/HrpNR foram desenvolvidos para amplificar uma seqüência do gene *hrpN*, derivado de uma *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Dellagi et al., 2000). O gene *hrpN* faz parte de um grupo de mais de 20 genes *hrp* (Reação de hipersensibilidade e patogenicidade) presentes em várias bactérias fitopatogênicas, incluindo as pectobactérias, sendo que várias proteínas secretadas pelo sistema de secreção Tipo III (sistema Hrp) são requeridas para plenitude da virulência e elicitação da

resposta de hipersensibilidade (He, 1998; Rantakari et al., 2001; Bell et al., 2002; Yang et al., 2002; Lehtimäki et al., 2003).

Todas as subespécies de *P. carotovorum* tiveram seu DNA amplificado com RdgF/RdgR, gerando um produto de aproximadamente 1200 pb. Das *P. chrysanthemi* apenas a estirpe P16 teve seu DNA amplificado com este par de oligonucleotídeos iniciadores (TABELA 5). Estes oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados a partir da seqüência do gene *rdg* que participa da regulação das pectina liases, derivado de uma *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Dellagi et al., 2000).

O DNA das estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* e de algumas *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foi amplificado pelo par de oligonucleotídeos iniciadores PnIF/PnIR, formando um fragmento de aproximadamente 650 pb. Nenhuma estirpe de *P. chrysanthemi* teve seu DNA amplificado por PnIF/PnIR (TABELA 5). PnIF/PnIR amplificam um fragmento do gene *pnl* (pectina liase) e foram desenvolvidos a partir da *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Dellagi et al., 2000).

A especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores RdgF/RdgR e PnIF/PnIR para a espécie *P. carotovora* provavelmente está relacionada com a estirpe a partir dos quais foram desenvolvidos (*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*), indicando que anelam em regiões conservadas de genes homólogos com cada subespécie (TABELA 5).

Apenas *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pca31) e a estirpe BAB20 tiveram seu DNA amplificado por CytR-RdF/CytR-BR, gerando um produto de aproximadamente 1600 pb (TABELA 5). Estes oligonucleotídeos iniciadores foram desenvolvidos para amplificar um fragmento de um gene homólogo ao gene *cytR*,

que está relacionado com a produção de poligalacturonase e mobilidade em *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Matsumoto et al., 2003).

Alguns oligonucleotídeos iniciadores amplificam mais o DNA de alguma espécie ou subespécie do que outras, podendo ser usados para gerar sondas, como RdgF/RdgR e PnlF/PnlR para *P. carotovorum*, HrpNF/HrpNR para *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e CytR-RdF/CytR-BR para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*.

Os oligonucleotídeos iniciadores RsmA-F1/RsmA-R1, OutH-Fwd/OutH-Ver, Rpf-F/Rpf-R e Peh-F/Peh-R não demonstraram nenhum padrão de amplificação em relação a espécies ou subespécies, amplificando as estirpes de forma aleatória (TABELA 5). RsmA-F1/RsmA-R1 foram desenvolvidos a partir do gene *rsmA*, um dos responsáveis pela regulação da produção das enzimas pectolíticas, e gerar um produto de 500 pb. OutH-Fwd/OutH-Ver amplificam um fragmento do gene *outh*, gerando um fragmento de aproximadamente 700 pb para a espécie *P. carotovorum* e um de 500 pb para *P. chrysanthemi*. Ambos oligonucleotídeos iniciadores foram gerados a partir de uma *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Yap et al., 2004). A proteína OutH é uma das 15 codificadas pelo grupo de genes *out*, responsáveis pelo sistema de secreção tipo II, via de saída das enzimas pectinase e celulase da célula bacteriana (Thomas et al., 1997; Sandkvist, 2001). Rpf-F/Rpf-R foram desenvolvidos a partir de uma *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* para amplificar uma seqüência do gene *rpf*, responsável pela regulação da produção da protease e celulase, e gera um produto de aproximadamente 650 pb, (Frederick et al., 1997; Dellagi et al., 2000). Peh-F/Peh-R foram desenvolvidos para amplificar dois genes (*pehR-pehS*) que

compõem um sistema regulatório da produção da poligalacturonase, gerando um fragmento de 2500 pb (Flego et al., 2000).

RsmA-F1/RsmA-R1 amplificaram todas as *P. carotovorum* derivadas de batata, todas as *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* derivadas de *Dianthus caryophyllus*, cenoura e abóbora, mas não amplificaram as *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* derivadas de pimenta e mandioquinha. Nenhuma estirpe de *P. chrysanthemi*, independente do hospedeiro, foi amplificada com o uso de RsmA-F1/RsmA-R1. Rpf-F/Rpf-R também apresentaram perfil de amplificação relacionado com os hospedeiros, onde a maioria dos DNA amplificados foi de estirpes isoladas de batata. Os outros oligonucleotídeos iniciadores não mostraram perfil de amplificação relacionado com os hospedeiros (TABELA 5). A visão emergente é das pectobactérias como um grupo de bactérias distintas, ecologicamente adaptadas, que interagem com o hospedeiro num nível de sofisticação como outras bactérias fitopatogênicas (De Boer, 2003).

Alguns oligonucleotídeos iniciadores (HecA-1/HecA-2; Xhem-1/Xhem-2; E1+/E2+) produziram muitos fragmentos inespecíficos quando submetidos à PCR com o DNA das espécies e subespécies de pectobactérias. HecA-1/HecA-2 foram desenvolvidos a partir da seqüência do gene *hecA*, relacionado com adesão e agregação, derivado da *P. chrysanthemi*, e Xhem-1/Xhem-2 foram desenvolvidos a partir da *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* para amplificar uma seqüência de um gene semelhante ao que codifica a proteína hemaglutina da *Xylella fastidiosa* (Bell et al., 2002). E1+/E2+ foram desenvolvidos para amplificar a região que contém os genes *ermA*, *ermBC*, *ermC* e *ermG*, que codificam para resistência ao antibiótico eritromicina, de enterobacteriáceas e cocos gram-positivas (Arthur et al., 1990).

Os oligonucleotídeos iniciadores PecS-1/PecS-2 e DNA17/DNA18 não amplificaram o DNA de nenhuma espécie ou subespécie das pectobactérias, nas condições em que foram utilizados. PecS-1/PecS-2 foram desenvolvidos a partir da *P. chrysanthemi* para amplificar uma seqüência do gene *pecS* que codifica para pectinase e celulase (Bell et al., 2002). DNA17/DNA18 amplificam um fragmento do gene *sdaD* que codifica para a enzima Dnase de *Streptococcus pyogenes* (Podbielski et al., 1996).

Os oligonucleotídeos iniciadores HecA-1/HecA-2, Xhem-1/Xhem-2, PecS-1/PecS-2 e E1+/E2+ não mostraram especificidade e eficiência com uma seqüência específica no DNA das pectobactérias testadas, apesar de terem sido desenhados a partir do DNA de pectobactérias, e E1+/E2+ para amplificar o DNA de enterobacteriáceas.

Algumas das características selecionadas são comuns para as espécies e subespécies estudadas, como as relacionadas com enzimas pectolíticas, reação de hipersensibilidade, sistema de secreção tipo II, entretanto alguns dos oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos a partir da *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* amplificaram de forma incostante o DNA das estirpes dentro das espécies ou subespécies de pectobactérias, ou não mostraram resultado algum, indicando que as estirpes apresentam perfis genéticos diferentes. Diversos estudos têm mostrado que as pectobactérias são geneticamente distintas, formando grupos heterogêneos, mesmo dentro das subespécies (Darrasse et al., 1994; Waleron et al., 2002; Yahiaoui-Zaidi et al., 2003). Além disto, para constatar que estes oligonucleotídeos amplificam apenas com o DNA das pectobactérias há a necessidade de testar estes com outras bactérias pectolíticas.

TABELA 5. Perfil de amplificação da PCR, das estirpes de *Pectobacterium chrysanthemi* e de *P. carotovorum* subsp., utilizando diferentes oligonucleotídeos iniciadores. Porto Alegre, RS. 2005.

Hospedeiro/ Estirpes ¹	Oligonucleotídeos iniciadores ²														Identificação bioquímica														
	149L ³	Y1Y2	Br1	Y45Y46	ECA	ADE	HrpN	Rdg	Pnl	RsmA	OutH	Rpf	PehR/S	CytR															
Batata																													
Pcbr212 ^T	+	(3)	+	(2)	+	(2) ⁴	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(3)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	Pcbr		
Pcbr8	+	(3)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	Pcbr
Pcbr371	+	(3)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	Pcbr
MB9	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcbr
MB11	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcbr
MB12	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcbr
PMAB19	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	Pcc
MPB8	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcc
BAB20	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	Pc
Pca05	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	Pcc
Pca06	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcc
<i>Dianthus caryophyllus</i>																													
Pcc1442	+	(3)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcc
Pimenta																													
AG8	+	(3)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcc
AG29	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcc
Cenoura																													
CEN06	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pc
Abóbora																													
Abob65	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	-	(2)	+	(2)	-	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcc
Mandioquinha																													
Pca41	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcc
Pca46	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcc
Pca47	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcc
Pca48	+	(3)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcc
Pca50	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcc
P41	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	+	(2)	+	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	-	(2)	Pcc

Continuação **TABELA 5.** Perfil de amplificação da PCR, das estirpes de *Pectobacterium chrysanthemi* e de *P. carotovorum* subssp., utilizando diferentes oligonucleotídeos iniciadores. Porto Alegre, RS. 2005.

Hospedeiro/ Estirpes ¹	Oligonucleotídeos iniciadores ²														Identificação bioquímica
	149L ³	Y1Y2	Br1	Y45Y46	ECA	ADE	HrpN	Rdg	Pnl	RsmA	OutH	Rpf	PehR/S	CytR	
Batata															
Pca31	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pca
Cenoura															
CEN14	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Pch
CEN80	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	P
Mandioquinha															
P16	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	Pch
C14	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Pch
C16	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Pch
151	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Pch

¹ Pca, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*; Pcb, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*; Pcc, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pch, *P. chrysanthemi*; Pc, *P. carotovorum*; P, *Pectobacterium*.

² 149L, região IGS do rDNA; Br1, região IGS do rDNA; Y1Y2, pectato liase; Y45Y46, pectato liase; ADE, pectato liase; ECA, fragmento obtido por RFLP; HrpN, reação de hipersensibilidade; Rdg, pectina liase; Pnl, pectina liase; RsmA, regulação das exoenzimas; OutH, sistema de secreção tipo II; Rpf, regulação da celulase e protease; PehR/S, regulador/sensor poligalacturonase; CytR, repressor poligalacturonase.

³ Difere Pc de Pch pelo tamanho dos fragmentos: Pc: 450 e 490; Pch: 356 e 491.

⁴ Número de vezes que foi realizada a PCR.

Num teste preliminar, outros nove isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (PcbrMB1, PcbrMB2, PcbrBAPB6, PcbrPPR3, PcbrPPR9, PcbrPPT12, PcbrCBR3, PcbrCBC1, PcbrCBC2), foram testados com os oligonucleotídeos iniciadores HrpNF/HrpNR, CytR-RdF/CytR-BR, OutH-Fwd/OutH-Ver e RsmA-F1/RsmA-R1. Estes isolados são provenientes de tubérculos de batata-semente, e já haviam sido identificados por testes bioquímicos e fisiológicos, e pela PCR com os oligonucleotídeos iniciadores 149LF/L1r da região IGS que separam *P. carotovorum* de *P. chrysanthemi*; Br1F/L1R. da região IGS, específicos para *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e algumas estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*; e ECA1F/ECA1R específicos para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (El Tassa & Duarte, 2004).

Os oligonucleotídeos iniciadores HrpNF/HrpNR amplificaram o DNA de quatro dos nove isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (FIGURA 1A), totalizando 60% dos isolados com DNA amplificado por este par de oligonucleotídeos iniciadores.

CytR-RdF/CytR-BR não amplificaram o DNA de nenhum dos isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, mas amplificaram a *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* Pca31, mostrando especificidade para esta estirpe (FIGURA 1B).

O par de oligonucleotídeos iniciadores OutH-Fwd/OutH-Ver amplificou o DNA de quatro isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (FIGURA 1C), totalizando 53% dos isolados com DNA amplificado.

RsmA-F1/RsmA-R1 amplificaram o DNA de todas os isolados e *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* testados (FIGURA 1D), mantendo a especificidade ao hospedeiro batata mostrada anteriormente (TABELA 5).

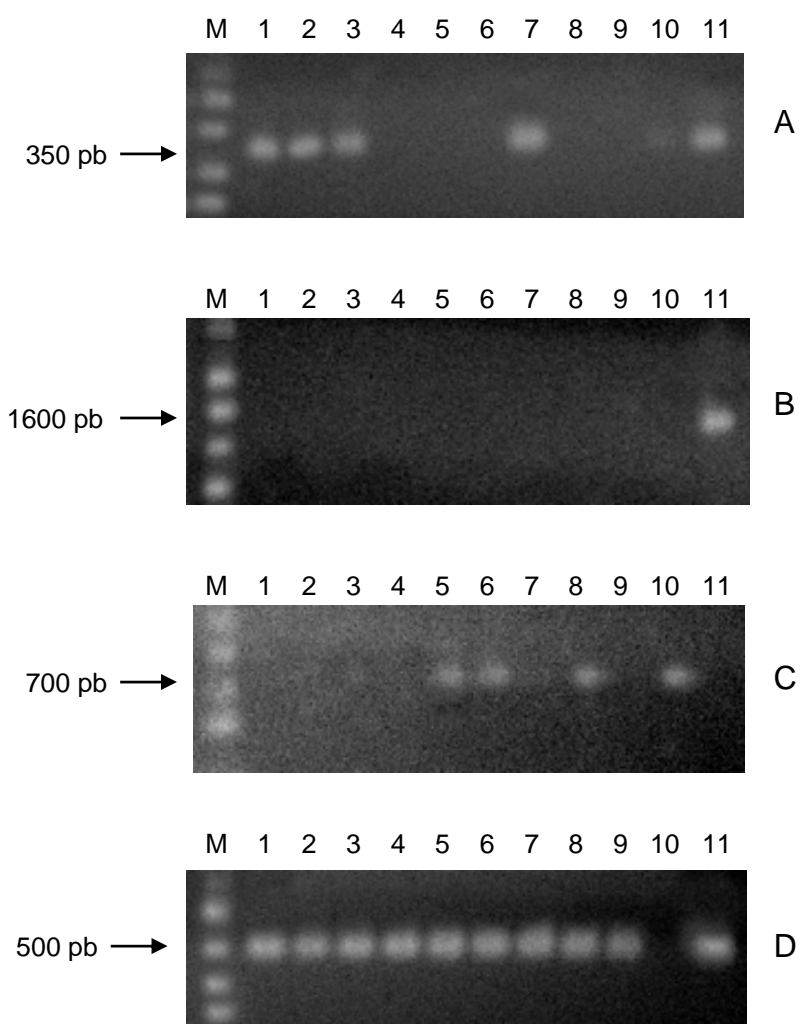


FIGURA 1. Amplificações de fragmentos de DNA de *Pectobacterium. carotovorum* subsp. *brasiliensis* usando: **A)** oligonucleotídeos iniciadores HrpNF/HrpNR, para o gene *hrpN* (reação de hipersensibilidade e patogenicidade). M, marcador 1 Kb plus; 1, MB1; 2, MB2; 3, BAPB6; 4, PPR3; 5, PPR9; 6, PPR12; 7, CBR3; 8, CBC1; 9, CBC2; 10, Pcbr212^T; 11, Pcbr8. **B)** oligonucleotídeos iniciadores CytR-RdF/CytR-BR, para gene homólogo ao gene *cytR* (produção de poligalacturonase e mobilidade). M, marcador 1 Kb plus; 1, MB1; 2, MB2; 3, BAPB6; 4, PPR3; 5, PPR9; 6, PPR12; 7, CBR3; 8, CBC1; 9, CBC2; 10, Pcbr212^T; 11, Pca31. **C)** oligonucleotídeos iniciadores OutH-Fwd/OutH-Ver, para o gene *outH* (sistema de secreção tipo II). M, marcador 1Kb plus; 1, MB1; 2, MB2; 3, BAPB6; 4, PPR3; 5, PPR9; 6, PPR12; 7, CBR3; 8, CBC1; 9, CBC2; 10, Pcbr212^T; 11, Pca31. **D)** oligonucleotídeos iniciadores RsmA-F1/RsmA-R1, para o gene *rsmA* (regulação da produção das enzimas pectolíticas). M, marcador 1Kb plus; 1, MB1; 2, MB2; 3, BAPB6; 4, PPR3; 5, PPR9; 6, PPR12; 7, CBR3; 8, CBC1; 9, CBC2; 10, AG8; 11, Pcbr212^T. Porto Alegre, 2006.

Uma matriz de sondas de DNA, que identifique por coeficiente de similaridade as diferentes pectobactérias, assim como ocorre com os testes bioquímicos e fisiológicos, pode ser formada com diversas características fenotípicas ou genotípicas. Através do padrão de amplificação de diferentes oligonucleotídeos iniciadores pode-se formar um perfil para cada espécie e subespécie para compor a matriz. Na construção de arranjos de sondas de DNA, ao invés de poucas características, milhares de características podem ser utilizadas. Testando um número maior de características e também de indivíduos de cada espécie e subespécie pode-se chegar a matriz de identificação das pectobactérias, onde o próximo passo seria testar estas como sondas de DNA para a construção de um arranjo de DNA.

A análise do dendograma indicou diferenças entre as subespécies de pectobactérias analisadas. Com exceção de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, as demais subespécies formaram grupos homogêneos com alta similaridade intraespecífica.

A formação de dois grupos distintos, com similaridade de 28%, foi evidenciada, sendo que um dos grupos pode ser dividido em subgrupos (FIGURA 2). O grupo I é dividido em quatro subgrupos, no IA estão as estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, com similaridade de 88 % e duas *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, no IB estão quatro estirpes de *P. carotovorum* subsp. *Carotovorum* e as duas estirpes que não tiveram a subespécie determinada (CEN06 e BAB20) pelos testes bioquímicos e fisiológicos, no IC estão as restantes *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e no ID está a *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (FIGURA 2).

O grupo II contém as cinco estirpes de *P. chrysanthemi* e a estirpe que não tinha a espécie determinada (CEN80) pelos testes bioquímicos e fisiológicos, com 78 % de similaridade entre as estirpes (FIGURA 2).

Neste estudo pode-se observar uma alta similaridade entre as estirpes de cada subespécie, com exceção de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* que mostrou uma alta variabilidade, não sendo possível evidenciar um grupo específico para esta subespécie, por formar dois grupos distintos e estar presente no grupo das *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Diversos trabalhos têm mostrado que *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* é um grupo heterogêneo, que pode ser dividido em mais de 50 sorogrupos, e possui uma alta diversidade genética (Hélias et al., 1998; Yahiaoui-Zaidi et al., 2003).

Este comportamento sugere a identificação de um grupo muito maior de espécies de *Pectobacterium*, fato que poderá ser mais fácil e rapidamente constatado se macro ou microarranjos de DNA, com centenas ou milhares de sondas, estiverem disponíveis como teste de rotina para a identificação deste grupo de bactérias fitopatogênicas.

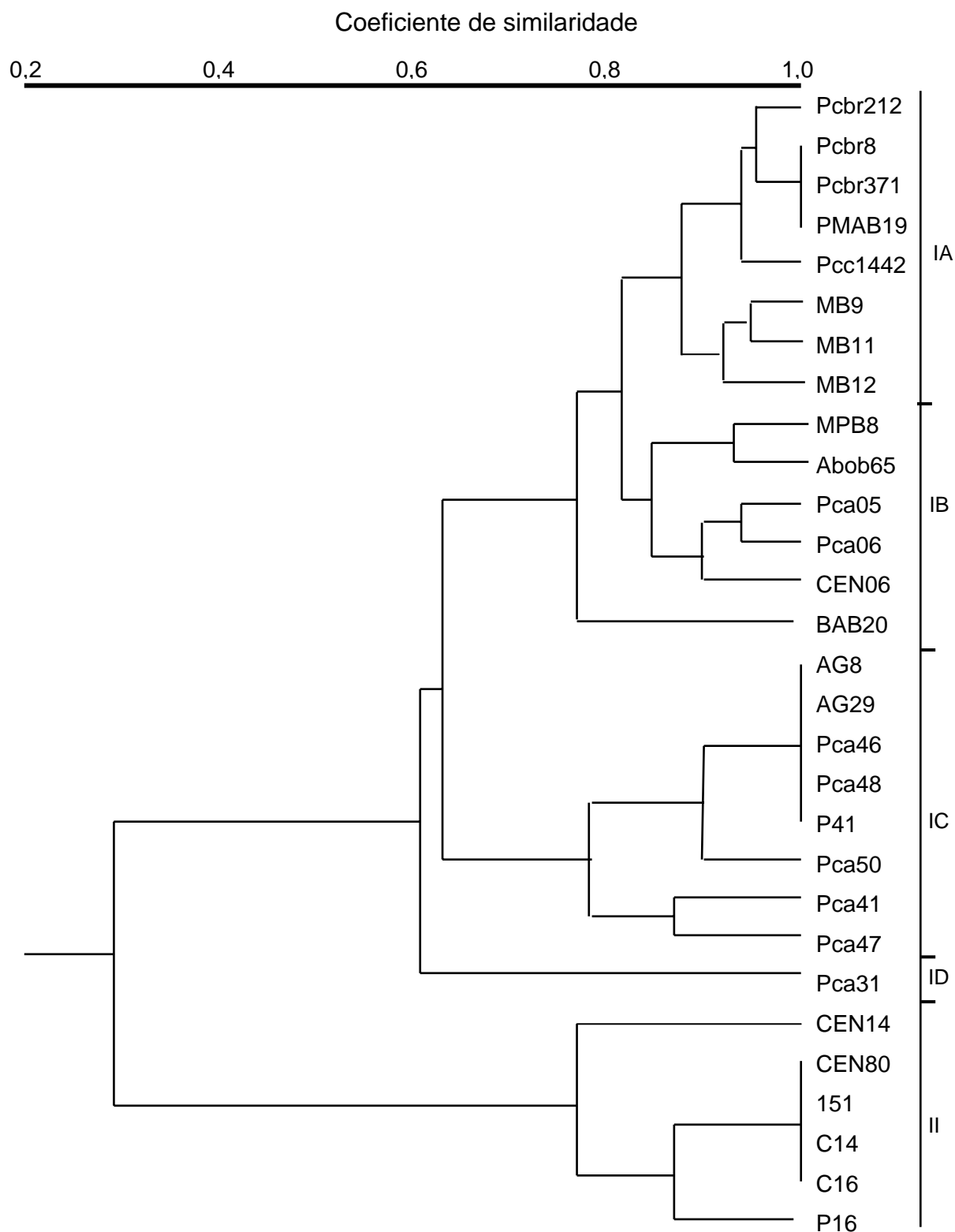


FIGURA 2. Dendrograma gerado pelo método UPGMA usando o coeficiente de similaridade DICE a partir da análise do perfil de amplificação de 29 pectobactérias. Porto Alegre, 2006.

5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos nas condições em que esta pesquisa foi conduzida, conclui-se o seguinte:

- 1) O perfil gerado pela amplificação com oligonucleotídeos iniciadores indica que é possível a identificação das pectobactérias através de uma matriz de características.
- 2) Através do perfil de amplificação dos DNA das estirpes com os oligonucleotídeos iniciadores é possível a identificação de isolados que apresentam características atípicas pelos testes bioquímicos e fisiológicos.
- 3) As características bioquímicas e fisiológicas podem indicar regiões genômicas com especificidade capaz de permitir a construção de macro ou microarranjos de DNA que facilite a classificação das estirpes de pectobactérias.
- 4) Os oligonucleotídeos iniciadores RdgF/RdgR, PnlF/PnlR e CytR-RdF/CytR-BR podem auxiliar na detecção de espécies ou subespécies de pectobactérias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTHUR, M. et al. Detection of erythromycin resistance by the polymerase chain reaction using primers in conserved regions of erm rRNA methylase genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.34, n.10, p.2024-2026, 1990.
- BELL, K.S. et al. Sample sequencing of a selected region of the genome of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* reveals candidate phytopathogenicity genes and allows comparison with *Escherichia coli*. **Microbiology**, New York, v.148, n.5, p.1367-1378, 2002.
- BELL, K.S. et al. 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.
- BLATTNER, F.R. et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, Washington, v.277, n.5331, p.1453-1462, 1997.
- BOONHAM, N. et al. Detection of potato viruses using microarray technology: Towards a generic method for plant viral disease diagnosis. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.108, n.2, p.181-187, 2003.
- CALL, D. DNA microarrays - their mode of action and possible applications in molecular diagnostics. **Veterinary Sciences Tomorrow**, Utrecht, n.3, p.1-9, 2001.
- CHO, J.-C.; TIEDJE, J.M. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.8, p.3677-3682, 2001.
- COLLMER, A.; KEEN, N.T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p.383-409, 1986.
- CUI, Y.; CHATTERJEE, A.; CHATTERJEE, A.K. Effects of the two-component system comprising *gacA* and *gacS* of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory *rsmB* RNA, extracellular enzymes, and harpin(Ecc). **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v.14, n.4, p.516-526, 2001.

CUPPELS, D.A.; KELMAN, A. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. **Phytopathology**, St. Paul, v.64, n.4, p.468-475, 1986.

DARRASSE, A. et al. 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**, St. Paul, v. 86, n.9, 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.; COPEMAN, R.J.; VRUGGINK, H. Serogroups of *Erwinia carotovora* potato strains determined with diffusible somatic antigens. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, n.3, p.316-319, 1979.

DE BOER, S.H.; KELMAN, A. *Erwinia* soft rot group. In: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. St. Paul: APS Press, 2001. p.56-72.

DE BOER, S.H.; MCNAUGHTON, M.E. Monoclonal antibodies to the lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* serogroup I. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, n.6, p.828-832, 1987.

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

DELLAGI, A. et al. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*. **Microbiology**, New York, v.146, n.1, p.165-171, 2000.

DICKEY, R.S.; ZUMOFF, C.H.; UYEMOTO, J.K. *Erwinia chrysanthemi*: Serological relationships among strains from several hosts. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n.11, p.1388-1394, 1984.

DIEFFENBACH, C.W.; LOWE, T.M.J.; DVEKSLER, G.S. General concepts for PCR primer design. In: DIEFFENBACH, C.W.; DVEKSLER, G.S. **PCR Primer: A Laboratory Manual**. Plainview: CSHL Press, 1995. p.133-143.

DOPAZO, J. **Microarray data analysis II**. Disponível em: bioinfo.cnio.es/docus/papers/pdfs/3-Dopazo_final.pdf. Acesso em: 4 Feb. 2006.

DUARTE, V. et al. 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.

DURÁN, N.; AZEVEDO, M.M.M. **O que é nanobiotecnologia? Atualidades e perspectivas.** Disponível em: http://www.ifi.unicamp.br/extensao/arg_down/nanobiotecnologia.doc. Acesso em: 18 Dec. 2005.

EL HASSOUNI, M.; CHIPPAUX, M.; BARRAS, F. Analysis of the *Erwinia chrysanthemi* *arb* genes, which mediate metabolism of aromatic beta-glucosides. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, n.11, p.6261-6267, 1990.

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

EL TASSA, S.O.M.; DUARTE, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p.620-625, 2004.

ERIKSSON, A.R.B. et al. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v.11, n.8, p.743-752, 1998.

FESSEHAIE, A.; DE BOER, S.H.; LEVESQUE, C.A. Molecular characterization of DNA encoding 16S-23S rRNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.48, n.5, p.387-398, 2002.

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

FLEGO, D. et al. A two-component regulatory system, *pehR-pehS*, controls endopolygalacturonase production and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v.13, n.4, p.447-455, 2000.

FRÉCHON, D. et al. 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.

FREDERICK, R.D. et al. Identification of a pathogenicity locus, *rpfA*, in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that encodes a two-component sensor-regulator protein. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v.10, n.3, p.407-415, 1997.

GARDAN, L. et al. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. **International**

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v.53, n.2, p.381-391, 2003.

GORRIS, M.T. et al. Characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and comparison of serological methods for its sensitive detection on potato tubers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.2076-2085, 1994.

GRAHAM, D.C. Serological diagnosis of potato blackleg and tuber soft rot. **Plant Pathology**, Oxford, v.12, n.2, p.142-144, 1963.

HARRIS, S.J. et al. The hexA gene of *Erwinia carotovora* encodes a LysR homologue and regulates motility and the expression of multiple virulence determinants. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.28, n.4, p.705-717, 1998.

HAUBEN, L. et al. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.21, n.3, p.384-397, 1998.

HE, S.Y. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.36, p.363-392, 1998.

HÉLIAS, V.; ANDRIVON, D.; JOUAN, B. Internal colonization pathways of potato plants by *Erwinia carotovora* spp. *atroseptica*. **Plant Pathology**, Oxford, v.49, p. 33-42, 2000.

HÉLIAS, V. et al. 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**, Dordrecht, v.104, n.7, p.685-699, 1998.

HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. et al. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.50, n.1, p.213-257, 1996.

HYMAN, L.J. et al. Modified crystal violet pectate medium (CVP) based on a new polypectate source (Slendid) for the detection and isolation of soft rot erwinias. **Potato Research**, Wageningen, v.44, n.3, p.265-270, 2001.

HYMAN, L.J.; TOTH, I.K.; PÉROMBELON, M.C.M. Isolation and identification. In: PÉROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLF, J.M. **Methods for detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potatos**: Laboratory Manual. Dundee: Scottish Crop Research, 1998. p.60-71.

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, n.3, p.185-195, 1986.

JAFRA, S. et al. Expression of *Erwinia chrysanthemi* pectinase genes *pell*, *PeL* and *pelZ* during infection of potato tubers. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v.12, n.10, p.845-851, 1999.

JAIN, K.K. Applications of biochips: From diagnostics to personalized medicine. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, Waburn, v.7, n.3, p.285-289, 2004.

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

KAZAN, K. et al. DNA microarrays: New tools in the analysis of plant defence responses. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.2, n.3, p.177-185, 2001.

KEHRY, M.R.; DAHLQUIST, F.W. The methyl accepting chemotaxis proteins of *Escherichia coli*: Identification of the multiple methylation sites on methyl-accepting chemotaxis protein I. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.257, n.17, p.10378-10386, 1982.

KELEMU, S.; COLLMER, A. *Erwinia chrysanthemi* EC16 produces a second set of plant-inducible pectate lyase isoenzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.6, p.1756-1761, 1993.

KONDOH, H.; BALL, C.B.; ADLER, J. Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein for the ribose and galactose chemoreceptors of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.76, n.1, p.260-264, 1979.

KURATA, K.-I.; SUYAMA, A. Probe design for DNA chips. **Japanese Society Bioinformatics**, Tokyo, p.1-2, 1999.

LEHTIMAKI, S. et al. Characterization of the *hrp* pathogenicity cluster of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: High basal level expression in a mutant is associated with reduced virulence. **Molecular Genetic Genomics**, Berlin, v.270, n.3, p.263-272, 2003.

LÉVESQUE, C.A. Molecular methods for detection of plant pathogens - What is the future? **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.23, n.4, p.333-336, 2001.

LÉVESQUE, C.A.; HARLTON, C.E.; COCK, A.W.A.M. Identification of some oomycetes by reverse dot blot hybridization. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, p.213-222, 1998.

LEWIN, B. **Genes VII**. Oxford, USA: Oxford University Press, 2000. 990 p.

LIEVENS, B. et al. Quantitative assessment of phytopathogenic fungi in various substrates using a DNA macroarray. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.7, n.11, p.1698-1710, 2005.

LIEVENS, B. et al. Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.223, n.1, p.113-122, 2003.

LIEVENS, B.; THOMMA, B.P.H.J. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice. **Phytopathology**, St. Paul, v.95, n.12, p.1374-1380, 2005.

LIPSHUTZ, R.J. et al. High density synthetic oligonucleotide arrays. **Nature Genetics**, New York, v.21, n.1, p.20-24, 1999.

LIU, Y.; CHATTERJEE, A.; CHATTERJEE, A.K. Nucleotide sequence, organization and expression of *rdgA* and *rdgB* genes that regulate pectin lyase production in the plant pathogenic bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in response to DNA-damaging agents. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.14, n.5, p.999-1010, 1994.

LIU, Y. et al. Activation of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase structural gene *pnIA*: a role for RdgB. **Microbiology**, Washington, v.143, n.3, p.705-712, 1997.

LIU, Y. et al. Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.29, n.1, p.219-234, 1998.

LIU, Y. et al. *kdgREcc* negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, *harpinEcc*, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **The Journal of Bacteriology**, Washington, v.181, n.8, p.2411-2421, 1999.

LIU, Y. et al. RecA relieves negative autoregulation of *rdgA*, which specifies a component of the RecA-Rdg regulatory circuit controlling pectin lyase production in *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.22, n.5, p.909-918, 1996.

LOCKHART, D.J. et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nature biotechnology**, New York, v.14, n.13, p.1675-1680, 1996.

MATSUMOTO, H. et al. Peh production, flagellum synthesis, and virulence reduced in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by mutation in a homologue of *cytR*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v.16, n.5, p.389-397, 2003.

MULLIS, K.B.; FALLONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v.155, p.335-350, 1987.

NACHIN, L.; BARRAS, F. External pH: An environmental signal that helps to rationalize *pel* gene duplication in *Erwinia chrysanthemi*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v.13, n.8, p.882-886, 2000.

NASSAR, A. et al. 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.

NCBI. **Contém publicações e amplo banco de dados genéticos.** Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 4 Jan. 2006.

OKINAKA, Y. et al. Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v.15, n.7, p.619-629, 2002.

OLIVEIRA, A.M.R. et al. Incidence of pectolytic erwinias associated with blackleg of potato in Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.1, p.49-53, 2003a.

OLIVEIRA, A.M.R.; SILVEIRA, J.R.P.; DUARTE, V. Doenças bacterianas. In: PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. **O cultivo da Batata na Região Sul do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2003b. p.277-299.

PARENT, J.-G. et al. Identification of *Erwinia carotovora* from soft rot diseased plants by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n.5, p.494-499, 1996.

PAYNE, J.H. et al. Multiplication and virulence in plant tissues of *Escherichia coli* clones producing pectate lyase isozymes PLb and PLe at high levels and of an *Erwinia chrysanthemi* mutant deficient in PLe. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.10, p.2315-2320, 1987.

PERNA, N.T. et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, London, v.409, n.6819, p.529-533, 2001.

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

PÉROMBELON, M.C.M. et al. Microbiological, immunological and molecular methods suitable for commercial detection and quantification of the blackleg pathogen, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, on seed potato tubers: A review. **Bulletin OEPP**, Paris, v.28, p.141-155, 1998.

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**, St. Paul, v.71, n.3, p.283-285, 1987.

PODBIELSKI, A. et al. Molecular characterization of a major serotype M49 group A streptococcal DNase gene (*sdaD*). **Infection and Immunity**, Washington, v.64, n.12, p.5349-5356, 1996.

POSTMA, P.W.; LENGELER, J.W.; JACOBSON, G.R. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v.57, n.3, p.543-594, 1993.

RANTAKARI, A. et al. Type III secretion contributes to the pathogenesis of the soft-rot pathogen *Erwinia carotovora*: partial characterization of the *hrp* gene cluster. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v.14, n.8, p.962-968, 2001.

SAIER, M.H., JR.; REIZER, J. The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.13, n.5, p.755-764, 1994.

SANDKVIST, M. Type II secretion and pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.69, n.6, p.3523-3535, 2001.

SCHMID, K.; SCHMITT, R. Raffinose metabolism in *Escherichia coli* K12. Purification and properties of a new alpha-galactosidase specified by a transmissible plasmid. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.67, n.1, p.95-104, 1976.

SCHMITT, R. Analysis of melibiose mutants deficient in alpha-galactosidase and thiomethylgalactoside permease II in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.96, n.2, p.462-471, 1968.

SHIH, Y.L. et al. The *hexY* genes of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and ssp. *atroseptica* encode novel proteins that regulate virulence and motility coordinately. **Environmental Microbiology**, London, v.1, n.6, p.535-547, 1999.

SINGH, U. et al. Fimbrial-specific monoclonal antibody-based ELISA for European strains of *Erwinia chrysanthemi* and comparison to PCR. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.4, p.443-448, 2000.

SLOCUM, M.K.; PARKINSON, J.S. Genetics of methyl-accepting chemotaxis proteins in *Escherichia coli*: Organization of the *tar* region. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.155, n.2, p.565-577, 1983.

SMADJA, B. et al. Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v.17, n.11, p.1269-1278, 2004a.

SMADJA, B. et al. Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, n.1, p.19-27, 2004b.

SMID, E.J.; JANSEN, A.H.J.; GORRIS, L.G.M. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *E. chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. **Plant Pathology**, Oxford, v.44, n.8, p.1058-1069, 1995.

SNEATH, P.H.A. Bacterial Classification II: Numerical Taxonomy. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkin, 1984. p.5-7. V.1.

SOUZA DIAS, J.A.C.; IMAUTI, M.T. Doenças da batateira. In: KIMATI, H. et. al. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.119-142.

STANGHELLINI, M.E.; MENELEY, J.C. Identification of soft rot *Erwinia* associated with blackleg in Arizona. **Phytopathology**, St. Paul, v.65, n.1, p.86-87, 1975.

SUTCLIFFE, J. et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.40, n.11, p.2562-2566, 1996.

TAKATSU, A.; MELO, S.; GARCIA, E.J. Fruto do pimentão como meio parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, p.550-551, 1981.

THIBAUT, C. et al. Direct microcontact printing of oligonucleotides for biochip applications. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v.3, n.7, p.1-12, 2005.

THOMAS, J.D.; REEVES, P.J.; SALMOND, G.P.C. The general secretion pathway of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: analysis of the membrane topology of OutC and OutF. **Microbiology**, Washington, v.143, n.3, p.713-720, 1997.

TOTH, I.K.; AVROVA, A.O.; HYMAN, L.J. Rapid identification and differentiation of the soft rot erwinias by 16S-23S Intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.9, p.4070-4076, 2001.

TOTH, I.K. et al. Soft rot erwinias: From genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.4, n.1, p.17-30, 2003.

TOTH, I.K.; HYMAN, L.J.; WOOD, J.R. A 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, n.1, p.158-166, 1999.

VAN DER WOLF, J.M.; PÉROMBELON, M.C.M. Immunomagnetic separation-colony count on CVP medium (IMS-CVP). In: PÉROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLF, J.M. **Methods for detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potatoes**: Laboratory Manual. Dundee: Scottish Crop Research, 1998. p.11-18.

VAN VUURDE, J.W.L.; VAN DER WOLF, J.M.; PÉROMBELON, M.C.M. Immunofluorescence staining (IFC). In: PÉROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLF, J.M. **Methods for detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potatoes**: Laboratory Manual. Dundee: Scottish Crop Research, 1998. p.19-27.

WALERON, M. et al. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. **Microbiology**, Washington, v.148, n.2, p.583-595, 2002.

WEISBLUM, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.39, n.3, p.577-585, 1995.

WHITEHEAD, N.A. et al. Quorum-sensing in gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.25, n.4, p.365-404, 2001.

WOSIK, E. **Oligonucleotide arrays-detailed information**. Disponível em: <http://cnx.rice.edu/content/m12388/latest/>. Acesso em: 18 Dec. 2005.

YAHIAOUI-ZAIDI, R.; JOUAN, B.; ANDRIVON, D. Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. **Plant Pathology**, Oxford, v.52, n.1, p.28-40, 2003.

YANG, C.-H. et al. *hrp* genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 are important virulence factors. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v.15, n.5, p.472-480, 2002.

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.

YOUNG, J.M. et al. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p.67-105, 1992.