

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

ESPÉCIES DE *Dickeya* ASSOCIADAS À BATATA-CONSUMO E SEMENTE

YULIET FRANCO CARDOZA
Microbiologista. M.Sc., UH, Cuba

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Ênfase Fitopatologia

Porto Alegre, RS, Brasil
Março de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Franco Cardoza, Yuliet
ESPÉCIES DE *Dickeya* ASSOCIADAS À BATATA-CONSUMO E
SEMENTE / Yuliet Franco Cardoza. -- 2015.
99 f.

Orientador: Valmir Duarte.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Batata. 2. Canela-preta. 3. *Dickeya* spp.. 4.
Podridão-mole. 5. qPCR. I. Duarte, Valmir, orient.
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

YULIET FRANCO CARDOZA
Microbióloga - Universidad de La Habana/Cuba
Mestre em Microbiologia - Universidad de La Habana/Cuba

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM FITOTECNIA

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

Aprovado em: 31.03.2015
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 01.07.2016
Por

VALMIR DUARTE
Orientador - PPG Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

ROBERTO LANNA FILHO
PPG Fitotecnia/UFRGS

EDSON BERTOLINI
Departamento de Fitossanidade
Faculdade de Agronomia/UFRGS

AMAURI BOGO
UDESC

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade
de Agronomia

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me oferecer essa grande oportunidade na vida.

À minha mãe Leydis Cardoza, pelo apoio incondicional e motivação para a realização de todo o trabalho e minha filha Sophia, razão do meu viver.

À minha madrinha, Leticia (*in memorian*), que sempre estará presente na minha vida.

Ao professor Valmir Duarte, pela confiança, orientação e apoio em todo momento.

Aos colegas da Fitossanidade, Ismail Teodoro, Bruna Pozzebon, Fernanda Severo, Guilherme pela amizade e incentivo.

Aos colegas do Laboratório Agrônômica, Dana, Samara, Luciano pelo apoio e companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, pela colaboração.

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

Ao programa TWAS-CNPq, pela disponibilização de uma bolsa de estudos.

ESPÉCIES DE *Dickeya* ASSOCIADAS À BATATA-CONSUMO E SEMENTE¹

Autor: Yuliet Franco Cardoza
Orientador: Valmir Duarte

RESUMO

Bactérias do gênero *Dickeya* são patógenos de grande importância para a cultura da batata e têm como principal fonte de inóculo a batata-semente assintomática. A incidência destas bactérias vem aumentando no Brasil, porém não se tem ainda uma correta identificação das espécies envolvidas. Outro fato importante é que a espécie *D. solani* é considerada praga com alto potencial de prejuízo e a melhor estratégia de manejo é o uso de batatas-semente livres do patógeno. Para tanto, métodos sensíveis de detecção são necessários. O presente trabalho objetivou determinar as espécies de *Dickeya* associadas à batata, avaliar sua virulência nas cultivares Ágata e Asterix a diferentes temperaturas e detectar a presença de *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani* em batata-consumo e semente nacional e importada por qPCR. Duzentas e sete amostras [tubérculos (75) e plantas (10) de batata-consumo, tubérculos (59) e plantas (15) de batata-semente nacional e importada (48)] foram coletadas nos anos de 2010 a 2013, de diferentes regiões do Brasil e do Chile. Através de isolamento, testes bioquímicos, sistema BIOLOG GN2 (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA), PCR com os oligonucleotídeos 1491f/L1rA/L1rG e ADE1/ADE2, e a análise das sequências parciais dos genes *dnaX* e *mdh* foi constatada a presença de *D. dadantii* em 9/85 amostras de batata-consumo e de *D. solani* em 5/74 amostras de batata-semente nacional. As estirpes de *D. dadantii* formaram um grupo heterogêneo baseado nos testes bioquímicos e a análise de sequências. Quando tubérculos das cultivares Ágata e Asterix foram inoculados, não houve diferença na virulência entre as duas espécies, mas maceraram mais a 35 do que a 28 °C, sendo a cultivar Ágata mais suscetível. Duzentas e quatro e 182 amostras de tubérculos coletadas e armazenadas em cartões FTA (Whatman, GE) em 2007-9 e 2010-13, respectivamente, foram analisadas por qPCR com sonda TaqMan® para detecção de *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. *D. solani* foi detectada em 41 amostras nacionais (24 batata-semente e 17 consumo) e quatro do Chile, e *D. dianthicola* em nove amostras nacionais (duas batata-semente e sete consumo). *D. chrysanthemi* não foi detectada e *D. dadantii* e *D. zae* não foram testadas. A detecção de *D. dianthicola* no Brasil por qPCR indica a necessidade de isolamento de estirpes e confirmação de sua identidade por outros métodos. Este é o primeiro relato da ocorrência de *D. solani* em batata no Brasil.

¹Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (99f.) Março, 2015.

SPECIES OF *Dickeya* ASSOCIATED TO IN WARE AND SEED POTATO¹

Author: Yuliet Franco Cardoza

Advisor: Valmir Duarte

ABSTRACT

Dickeya spp. are important pathogenic bacteria on potato. The main source of inoculum is symptomless seed potato. There is evidence that the incidence of these bacteria is being increasing in Brazil but species involved are unknown. Another important fact is that *Dickeya solani* is considered a pest with high economic impact potential. The best management strategy is the use of pathogen-free seed tubers. Therefore high-sensitive methods for detection of these bacteria are mandatory. The aim of this study was to determine *Dickeya* spp. associated to potato, to evaluate their virulence in Ágata and Asterix cultivars and to detect the presence of *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola* and *D. solani* in ware potato and national and imported seed potato by qPCR. Two hundred and seven samples [tubers (75) and plants (10) of ware potato, tubers (59) and plants (15) of national seed-potato and imported (48)] were collected during 2010-2013, from different Brazilian regions and from Chile. Isolation, biochemical tests, BIOLOG GN2 (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA), PCR with primers 1491f/L1rA/L1rG and ADE1/ADE2, and partial sequence analysis of *dnaX* and *mdh* genes allowed to confirm the presence of *D. dadantii* in 9/85 ware potato samples and of *D. solani* in 5/74 national seed potato. Strains of *D. dadantii* formed a heterogeneous group. When tubers of Ágata and Asterix cultivars were inoculated, there was no difference in virulence between the two species; nevertheless there was higher maceration at 35 than at 28 °C, being Ágata more susceptible. Two hundred and four and 182 samples collected and stored in FTA Cards (Whatman, GE), during 2007-9 and 2010-13, respectively were analyzed by qPCR with TaqMan[®] hydrolysis probe for the presence of *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola* and *D. solani*. *D. solani* was detected in 41 national samples (24 seed potato and 17 ware potato) and four samples from Chile and *D. dianthicola* in nine national samples (two seed potato and seven ware potato). The presence of *D. chrysanthemi* was not detected and *D. dadantii* and *D. zea* were not tested. The detection of *D. dianthicola* in Brazil by qPCR indicates the need of obtention of isolates and confirmation of strains identity by other methods. This is the first report of occurrence of *D. solani* in ware and seed potato in Brazil.

¹ Doctoral thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (99p.) March, 2015.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 2.1 Cultivo da batata..... | 4 |
| 2.1.1 Aspectos gerais..... | 4 |
| 2.1.2 Batata-semente..... | 6 |
| 2.1.3 Podridão da haste, canela-preta e podridão-mole dos tubérculos..... | 7 |
| 2.2 <i>Dickeya</i> spp. como agentes causais de doenças em batata..... | 8 |
| 2.3 Métodos de detecção e determinação de <i>Dickeya</i> sp..... | 12 |
| 2.4 Método do cartão FTA para extração, preservação e purificação de ácidos nucleicos de fitopatógenos para o diagnóstico molecular de doenças em plantas..... | 14 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 17 |
| 3.1 Estirpes bacterianas de referência, condições de crescimento e preservação.... | 17 |
| 3.2 Coleta de amostras e transferência para cartões FTA..... | 18 |
| 3.3 Obtenção de isolados..... | 20 |
| 3.4 Determinação e caracterização de <i>Dickeya</i> sp. por testes bioquímicos, fisiológicos e de patogenicidade..... | 21 |
| 3.4.1 Gram direto com KOH 3%..... | 21 |
| 3.4.2 Atividade pectolítica em batata..... | 21 |
| 3.4.3 Teste de oxidase..... | 22 |
| 3.4.4 Teste de catalase..... | 22 |
| 3.4.5 Teste de oxidação/fermentação da glicose..... | 22 |
| 3.4.6 Crescimento a 37 e 39 °C..... | 23 |
| 3.4.7 Utilização de α -metilglicosídeo..... | 23 |
| 3.4.8 Sensibilidade à eritromicina..... | 23 |
| 3.4.9 Tolerância a 5% de NaCl..... | 24 |
| 3.4.10 Caracterização de <i>Dickeya</i> sp. pelo sistema BIOLOG GN2..... | 24 |
| 3.4.11 Produção de pigmentos em diferentes meios de cultura..... | 24 |
| 3.5 Determinação e caracterização de <i>Dickeya</i> sp. por métodos moleculares..... | 25 |
| 3.5.1 Extração de DNA genômico por lise alcalina..... | 25 |
| 3.5.2 PCR..... | 25 |
| 3.5.3 Análise das sequências parciais dos genes <i>dnaX</i> e <i>mdh</i> | 26 |
| 3.6 Virulência de <i>Dickeya dadantii</i> e <i>D. solani</i> | 28 |
| 3.7 Detecção de <i>Dickeya</i> spp. em amostras de batata armazenadas em cartões FTA..... | 30 |
| 3.7.1 Purificação do DNA a partir dos cartões FTA..... | 30 |
| 3.7.2 Construção das curvas-padrão da qPCR..... | 31 |
| 3.7.3 Detecção de <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>D. dianthicola</i> e <i>D. solani</i> por qPCR com sonda TaqMan® | 32 |

| | Página |
|---|--------|
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 33 |
| 4.1 Determinação e caracterização de <i>Dickeya</i> sp. por testes bioquímicos, fisiológicos e de patogenicidade..... | 34 |
| 4.1.1 Caracterização de <i>Dickeya</i> sp. pelo sistema BIOLOG GN2..... | 36 |
| 4.2 Determinação e caracterização de <i>Dickeya</i> sp. por métodos moleculares..... | 38 |
| 4.2.1 PCR | 38 |
| 4.2.2 Análise das sequências parciais dos genes <i>dnaX</i> e <i>mdh</i> | 38 |
| 4.3 Virulência de <i>Dickeya dadantii</i> e <i>D. solani</i> | 46 |
| 4.4 Detecção de <i>Dickeya</i> spp. em amostras de batata armazenadas em cartões FTA..... | 48 |
| 4.4.1 Construção das curvas-padrão da qPCR..... | 48 |
| 4.4.2 Detecção de <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>D. dianthicola</i> e <i>D. solani</i> por qPCR com sonda Taqman® | 49 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 56 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 57 |
| 7. APÊNDICES..... | 65 |

RELAÇÃO DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| 1. Espécies e estirpes bacterianas de referência utilizadas no estudo. Porto Alegre, RS, 2015..... | 17 |
| 2. Número de amostras de batata coletadas nos anos 2010 a 2013 de diferentes regiões do Brasil e do Chile. Porto Alegre, RS, 2015..... | 19 |
| 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação das sequências parciais dos genes <i>dnaX</i> e <i>mdh</i> . Porto Alegre, RS, 2015.. | 27 |
| 4. Oligonucleotídeos e sondas utilizados para detecção de <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>D. dianthicola</i> e <i>D. solani</i> por qPCR. Porto Alegre, RS, 2015..... | 32 |
| 5. Número de amostras coletadas nos anos 2010-2013 e isolados de <i>Dickeya</i> sp. obtidos em meio CPG (Casamino ácido, peptona, glicose). Porto Alegre, RS, 2015..... | 34 |
| 6. Resultado de testes bioquímicos e fisiológicos de 24 isolados de <i>Dickeya</i> sp. oriundos de batata-semente e consumo, coletadas nos anos 2011-2013. Porto Alegre, RS, 2015..... | 35 |
| 7. Resultado da qPCR com oligonucleotídeos SOL-D e a sonda SOL-D-P para os cinco isolados de <i>Dickeya</i> sp. obtidos de batata-semente. Porto Alegre, RS, 2015..... | 43 |
| 8. Amostras processadas e isolados de <i>Dickeya dadantii</i> e <i>D. solani</i> obtidos em meio CPG. Porto Alegre, RS, 2015..... | 45 |
| 9. Espécies e estirpes utilizadas para avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos/sondas para detecção de <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>D. dianthicola</i> e <i>D. solani</i> . Porto Alegre, RS, 2015..... | 49 |

| | Página |
|--|--------|
| 10. Quantidade de DNA de <i>Dickeya chrysanthemi</i> empregada na curva de calibração e número de células detectadas por qPCR. Porto Alegre, RS, 2015..... | 50 |
| 11. Quantidade de DNA de <i>Dickeya dianthicola</i> empregada na curva de calibração e número de células detectadas por qPCR. Porto Alegre, RS, 2015..... | 51 |
| 12. Detecção de <i>Dickeya dianthicola</i> por qPCR com os oligonucleotídeos DIA-C e a sonda DIA-C-P. Porto Alegre, RS, 2015..... | 51 |
| 13. Quantidade de DNA de <i>Dickeya solani</i> empregada na curva de calibração e número de células detectadas por qPCR. Porto Alegre, RS, 2015..... | 51 |
| 14. Amostras positivas para <i>Dickeya solani</i> por qPCR com os oligonucleotídeos SOL-D e a sonda SOL-D-P, procedentes do Brasil e do Chile. Porto Alegre, RS, 2015..... | 53 |

RELAÇÃO DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| 1. Colônias de isolados de <i>Dickeya</i> spp. Produção de pigmento azul em meio NGM (A); coloração creme (B) e amarela (C) em meio BDA. Porto Alegre, RS, 2015..... | 36 |
| 2. Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil metabólico de 19 isolados de batata-consumo e cinco isolados de batata-semente com características de <i>Dickeya</i> sp. utilizando-se algoritmo UPGMA e o Coeficiente de Dice. Porto Alegre, RS, 2015. | 37 |
| 3. Produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) de isolados de pectobactérias com oligonucleotídeos ADE1/ADE2, específicos para <i>Dickeya</i> spp. M: marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen); CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1-14: isolados de <i>Dickeya</i> sp. Porto Alegre, RS, 2015..... | 39 |
| 4. Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene <i>dnaX</i> de 19 isolados de batata-consumo e cinco isolados de batata-semente com características de <i>Dickeya</i> sp. e 43 estirpes de <i>Dickeya</i> spp. incluídas estirpes tipo e de referência. O método Neighbour Joining baseado no modelo Tamura- Nei foi utilizado e as porcentagens de <i>bootstrap</i> foram calculadas com 5000 repetições. Porto Alegre, RS, 2015..... | 40 |
| 5. Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene <i>mdh</i> de 19 isolados de batata-consumo e cinco isolados de batata-semente com características de <i>Dickeya</i> sp. e 18 estirpes de <i>Dickeya</i> spp. incluídas estirpes tipo e de referência. O método Neighbour Joining baseado no modelo Tamura- Nei foi utilizado e as porcentagens de <i>bootstrap</i> foram calculadas com 5000 repetições. Porto Alegre, RS, 2015..... | 41 |

6. Árvore filogenética baseada em sequências parciais concatenadas dos genes *dnaX* e *mdh* de 19 isolados de batata-consumo e cinco isolados de batata-semente com características de *Dickeya* sp. e 8 estirpes de *Dickeya* spp. incluídas estirpes tipo e de referência. O método Neighbour Joining baseado no modelo Tamura- Nei foi utilizado e as porcentagens de *bootstrap* foram calculadas com 5000 repetições. Porto Alegre, RS, 2015..... 42
7. Virulência de isolados de *Dickeya dadantii* (Dda) e de *D. solani* (Dsol) em tubérculos das cultivares Ágata e Asterix a 28 e 35 °C. As colunas representam a média do peso de tecido macerado. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), letras maiúsculas entre variedades e minúsculas entre temperaturas. As barras de erro indicam o erro padrão. O controle negativo consistiu de tubérculos inoculados com água destilada esterilizada. Porto Alegre, RS, 2015..... 47

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a batata-inglesa (*Solanum tuberosum* L.) destaca-se como a olerícola de maior relevância econômica com uma produção anual estimada em três milhões de toneladas, ocupando uma área plantada de aproximadamente 130 mil hectares (IBGE, 2015). Contudo, a produtividade média brasileira de 28 t.ha⁻¹ é considerada baixa quando comparada com a produtividade média de países europeus e norte-americanos que é superior a 40 t.ha⁻¹ (Reis, 2005; de Oliveira, 2011). Dentre os fatores que acometem a produção brasileira estão às doenças, principalmente as de etiologia bacteriana causadas pelos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. Adicionalmente, espécies de ambos os gêneros podem causar sintomas de podridão-mole, talo-oco, canela-preta e murcha, proporcionando perdas de até 100% em pré e pós-colheita (Czajkowski *et al.*, 2011; Toth *et al.*, 2011). No tocante ao gênero *Dickeya* Samson *et al.* (= *Erwinia chrysanthemi* Burkholder *et al.*, 1953), na última década as espécies patogênicas à batata têm ocasionado grandes perdas econômicas em países europeus. Em especial, na Holanda, anualmente são contabilizados prejuízos que ultrapassam 30 milhões de euros (Laurila *et al.*, 2010, Palacio Bielsa *et al.*, 2010; Toth *et al.*, 2011). O Brasil importa cerca de 2.700 toneladas por ano de batata-semente da Europa (Aliceweb, 2015) e a presença de bactérias do gênero *Dickeya* em tubérculos importados daquele continente pode ocasionar a introdução de novas espécies ainda não descritas no país. Estudos têm mostrado o surgimento de novas estirpes, não correspondentes às espécies descritas.

Como exemplo, a espécie *D. solani* biovar 3, considerada quarentenária em alguns países da Europa, foi descrita como um novo grupo, de alta agressividade, quando comparada às espécies: *D. dianthicola*, *D. zaeae* e *D. dadantii* (Samson *et al.*, 2005; Palacio Bielsa *et al.*, 2010; Toth *et al.*, 2011).

Não existe na legislação brasileira nenhuma instrução normativa que defina a inspeção da presença de infecções latentes em batata-semente. A inspeção realizada em batata-semente importada avalia a presença de vírus e nematoides em laboratório, mas para bactérias e fungos é feita apenas a inspeção visual para verificar a presença de sintomas da doença, baseando-se nos níveis de tolerância para semente básica e certificada. Esses níveis para *Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp. são de 1,0% para semente básica e certificada de 1ª geração e de 2,0% para semente certificada de 2ª geração (IN 32/2012/MAPA).

A falta de informações e estudos sobre as espécies de *Dickeya* no Brasil, devido à falta de métodos para a sua determinação, representa uma séria ameaça à produção da batata nacional (Carvalho, 2009). Neste contexto, surge a necessidade de estudos para determinar a prevalência desses patógenos em lavouras de batata brasileiras para determinar quais as espécies de ocorrência no país. Isto permitirá: i) atualizar a Legislação Nacional em decorrência das mudanças ocorridas na antiga taxonomia do grupo *Erwinia* e incluir novas espécies ainda não descritas, ii) atualizar os níveis de tolerância desses patógenos para fins de importação de batata-semente, iii) adotar medidas quarentenárias às espécies ausentes no país.

A detecção e determinação de pectobactérias têm sido feitas por análise bioquímica, fisiológica, métodos sorológicos, marcadores moleculares, macro e microarranjos de DNA, e métodos baseados em PCR (reação em cadeia da polimerase). No Brasil, a maioria dos laboratórios realizam a detecção e determinação de

pectobactérias por análises morfológicas, ecológicas, fisiológicas e bioquímicas, que são de baixa especificidade, sensibilidade e pouco confiáveis, em comparação com métodos moleculares.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo determinar as espécies de *Dickeya* associadas à batata e sua presença em batata-consumo e sementes nacional e importada através de: métodos bioquímicos, da avaliação da virulência em tubérculos de batata, qPCR e a análise das sequências parciais dos genes constitutivos *dnaX* e *mdh*. Algumas destas análises vão além do praticado no Brasil constituindo um diferencial do estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultivo da batata

2.1.1 Aspectos gerais

A batata (*Solanum tuberosum* L.), pertencente à família Solanaceae, é originária da América do Sul, mais precisamente na divisa entre Bolívia e Peru (CIP, 2010). Atualmente, é um dos alimentos mais consumidos no mundo devido a seu valor energético e o teor de proteínas e vitaminas (Kandil *et al.*, 2011).

Até os anos 90, grande parte da batata era cultivada e consumida na Europa e América do Norte. Nas últimas décadas, o setor produtivo de batata vem sofrendo algumas mudanças como o aumento do consumo e produção na Ásia, África e América Latina. O maior produtor mundial de batata é a China com uma produção em 2013 de aproximadamente 95 milhões de toneladas, e produtividade de 17 t.ha⁻¹. As maiores produtividades ainda são encontradas nos EUA e Canadá, com aproximadamente 47 e 33 t.ha⁻¹, respectivamente, seguidos pela Europa e América Latina, com 19 e 16 t.ha⁻¹, respectivamente (FAOSTAT, 2015).

No Brasil, a cultura da batata foi introduzida pelos portugueses, inicialmente na Região Sul, onde as condições climáticas eram mais favoráveis à produção (Pereira e Daniels, 2003). Com o tempo surgiram novas regiões produtoras e atualmente o país possui uma área destinada à plantação de batata de aproximadamente 130 mil hectares com uma produção anual estimada em três milhões de toneladas e uma produtividade de

25-30 t.ha⁻¹. Entre os principais estados produtores estão: Minas Gerais (1.200.359 t), Paraná (838.140 t), São Paulo (764.428 t) e Rio Grande do Sul (357.236 t) (IBGE, 2015).

A diversidade climática do Brasil permite que o cultivo da batata seja feito em três épocas distintas durante o ano: safra das águas, safra de inverno e safra da seca. A safra “das águas” que é plantada nos meses de agosto-dezembro e colhida nos meses de novembro em diante é a principal época de cultivo de batata que ocorre nas Regiões Sul e Sudeste. Já o plantio “de inverno”, realizado de abril a julho e colhido em julho-outubro, é praticado nas Regiões Sudeste e Nordeste, em locais onde não ocorrem geadas, dependendo principalmente de irrigação durante todo o ciclo de cultivo. O cultivo “da seca”, que começa em janeiro-março, deve ser realizado o mais cedo possível para evitar as geadas em regiões com o inverno um pouco mais rigoroso (Pereira & Daniels, 2003).

Apesar do grande potencial brasileiro em termos de área plantada, a média da produtividade das lavouras brasileiras ainda é muito baixa quando comparada com a de outros países produtores da Europa e América do Norte (Reis, 2005; de Oliveira, 2011). A baixa qualidade fitossanitária da batata-semente utilizada no campo é um dos fatores que levam à diminuição da produtividade, uma vez que a disseminação de vários patógenos como bactérias, fungos, vírus, nematoides e fitoplasmas é favorecida por esta forma de propagação. O risco aumenta pela capacidade de alguns patógenos de infectar batatas de forma latente, e evadir potencialmente a detecção, até se espalhar por todo o sistema de produção. Além disso, sabe-se que a porcentagem do uso de batata-consumo para o plantio é bastante elevada, o que leva também à disseminação destes patógenos, visto que não é feita a certificação nestes tubérculos (Pereira, 2011).

2.1.2 Batata-semente

A qualidade da batata-semente é fundamental para garantir a produtividade e a rentabilidade na cultura da batata. O plantio de material de qualidade inferior pode comprometer uma safra, mesmo que as demais condições sejam favoráveis ao cultivo. Portanto, recomenda-se o uso de uma batata-semente com estado fisiológico e brotação adequados e com boa sanidade. Esta última é proporcionada pelas inspeções no campo, na colheita e no armazém, garantindo níveis toleráveis de doenças (Olegário, 2011).

Aproximadamente 15% da produção mundial de batata destinam-se às sementes. A Holanda e o Chile chegam a destinar 25% e 15% da produção, respectivamente, para sementes, devido à exportação deste insumo. No Brasil, cerca de 13% da produção é destinada a sementes, mas apenas 20 a 30% desse total correspondem a sementes de qualidade, ou seja, certificadas (Pereira & Daniels, 2003). Assim, quase 70% da batata-semente básica utilizada no Brasil é importada, sendo a Europa o principal fornecedor. No entanto, o país vem trabalhando no sentido de propiciar ao produtor meios e condições para que se possa produzir em território nacional material para plantio com boa qualidade fitossanitária e genética e precisar menos de material importado (Pereira, 2011). Desta forma, a produção e comercialização de batata-semente possuem normas, padrões e procedimentos específicos.

No Brasil, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa MAPA nº 32, de 20 de novembro de 2012, no processo de certificação, a batata-semente genética é aquela proveniente de material de reprodução sob a responsabilidade e controle direto de seu obtentor ou introdutor. A partir da semente genética tem-se a semente básica que pode ser multiplicada por até quatro gerações: G0 (muda, planta *in-vitro* e minitubérculo), G1 (primeira colheita em campo), G2 (segunda colheita em campo), G3 (terceira colheita em

campo). Em seguida, a batata-semente certificada, que pode ser multiplicada por mais duas gerações, sendo denominada de certificada de primeira geração (quarta colheita no campo) e certificada de segunda geração (quinta colheita no campo).

A batata-semente categoria S1 terá como origem a batata-semente categoria certificada de segunda geração - C2 ou categorias superiores ou a muda certificada. A batata-semente categoria S2 terá como origem a batata-semente categoria S1 ou categorias superiores ou a muda certificada.

As infecções latentes são de particular importância na cultura da batata. A batata-semente infectada constitui a principal fonte de inóculo e a mais importante via de disseminação a longa distância de vários patógenos principalmente pectobactérias (Tsrer *et al.*, 2009; Toth *et al.*, 2011).

2.1.3 Podridão da haste, canela-preta e podridão-mole dos tubérculos

A podridão-da-haste, canela-preta e podridão-mole, causadas por espécies dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*, estão entre as principais doenças bacterianas que afetam a cultura da batata e têm causado perdas elevadas ao longo dos anos em escala mundial tanto em pré- quanto em pós-colheita. Estima-se que no campo estas podem chegar a 40% e no armazenamento até 100% (Lopes & Takasu, 1997; Czajkowski *et al.*, 2011; Toth *et al.*, 2011).

A podridão-da-haste (também chamada de podridão-aérea-da-haste ou canela-preta aérea) inicia-se de fontes externas à batata-semente. A infecção pode ocorrer via ferimentos ou aberturas naturais, pela água de irrigação contaminada, chuva com ventos fortes, ou ainda por insetos que carregam a bactéria e se alimentam das plantas. Lesões em hastes doentes, primeiramente aparecem como áreas escurecidas irregulares, que depois aumentam resultando em podridão-mole em toda a haste,

levando à murcha e morte da planta (Pérombelon, 2002; van der Wolf & De Boer, 2007).

Os sintomas de canela-preta e podridão-mole podem ocorrer em diversos estádios de desenvolvimento da planta. A canela-preta inicia a partir da batata-semente contaminada. Em casos mais graves, a batata-semente inteira, junto com os brotos, apodrece no solo antes da emergência da planta, resultando na redução do estande. A doença pode ainda se desenvolver após a emergência das plantas até o estágio de florescimento. Nestes casos, folhas de plantas infectadas tendem a murchar ou enrolar-se nas margens, tornando-se amareladas, e depois morrem. Além disso, a base da haste de plantas doentes apresenta uma podridão marrom a negra (Tsrer *et al.*, 2009).

Os sintomas típicos de podridão-mole nos tubérculos são caracterizados pela degradação da parede celular e a lamela média pelas enzimas pectolíticas secretadas pela bactéria, resultando numa aparência amolecida e consistência levemente granular, de coloração creme a marrom claro, e uma borda negra, separa áreas com tecido sadio do tecido doente. Em estádios avançados da doença, é comum a presença de um odor desagradável, devido à proliferação de bactérias secundárias que invadem os tecidos já infectados (Pereira & Daniels, 2003; Mantsebo, 2014).

2.2 *Dickeya* spp. como agentes causais de doenças em batata

Dickeya spp. (Samson *et al.*, 2005) são bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae que caracterizam-se pela produção de grandes quantidades de enzimas pectolíticas extracelulares. São Gram-negativas, móveis por flagelos peritriquios, não formadoras de endósporos e anaeróbicas facultativas (Samson *et al.*, 2005). Devido à ampla gama de hospedeiros e seu impacto econômico, têm sido reconhecidas entre os 10 patógenos bacterianos mais importantes (Mansfield *et al.*, 2012). O seu estudo é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle que

sejam benéficas para o produtor, a indústria da batata e para o consumidor (Garlant, 2015).

O gênero *Dickeya* surgiu pela reclassificação de *Pectobacterium chrysanthemi* (sin. *Erwinia chrysanthemi*) (Burkholder *et al.*, 1953) e *Brenneria paradisiaca* como *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. (sub-dividida em dois biovares: *chrysanthemi* e *parthenii*) e *D. paradisiaca* comb. nov., respectivamente e a definição de quatro novas espécies: *D. zea* sp. nov., *D. dadantii* sp. nov., *D. dieffenbachiae* sp. nov., *D. dianthicola* sp. nov. baseado na análise do gene DNAr 16S, hibridização DNA-DNA e várias características fenotípicas (Samson *et al.*, 2005). Recentemente, *D. dieffenbachiae* foi reclassificada como subespécie de *D. dadantii* (Brady *et al.*, 2012) e *D. aquática* descrita como uma nova espécie (Parkinson *et al.*, 2014). O gênero tem sofrido várias mudanças na taxonomia mas tende a ficar consolidado graças à análise comparativa de sequências de genoma completo das espécies e estirpes (Garlant, 2015).

O primeiro relato de *Dickeya* sp. na cultura da batata ocorreu em 1970, na Holanda. Subsequentemente, diversos relatos da sua ocorrência foram registrados na Inglaterra, Finlândia, França, Hungria, Polônia, Bélgica, Espanha, Israel e Suíça, sendo a maioria desses surtos epidêmicos provocado por *D. dianthicola* (Tsrer *et al.*, 2009; Cahill *et al.*, 2010; Janse, 2012).

Essas bactérias podem ocorrer endemicamente em todas as áreas em que a batata é cultivada no mundo. A distribuição geográfica envolve fatores climáticos, tais como a temperatura de desenvolvimento dessas espécies, na qual *D. dianthicola* está mais adaptada a temperaturas amenas (clima temperado a subtropical), já *D. zea* e *D. dadantii* são mais adaptadas a climas tropicais e subtropicais (Samson *et al.*, 2005).

Até o ano 2000, *Pectobacterium atrosepticum* (sin. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) e *D. dianthicola* foram responsáveis pela maioria dos surtos de canela-preta

na Europa (Pérombelon, 2002a). Na última década, a incidência de canela-preta nesse continente tem aumentado consideravelmente, com a ocorrência de *Dickeya* spp. ao invés de *P. atrosepticum* e ocasionando grandes perdas econômicas (Lojkowska *et al.*, 2010; Toth *et al.*, 2011).

O impacto econômico varia entre os diferentes países devido às diferenças nos níveis de tolerância na certificação da batata. Em Israel reduções de 20-25% no rendimento têm sido relatadas em várias cultivares de batata devido a infecções com *Dickeya* sp. (Tsrer *et al.*, 2009). Porém as perdas mais diretas na produção de batata na Europa têm ocorrido como resultado da rejeição e desclassificação da batata-semente durante a certificação, chegando a 30 milhões de euros anuais na Holanda (Lojkowska *et al.*, 2010; Palacio-Bielsa *et al.*, 2010; Toth *et al.*, 2011; Waleron *et al.*, 2013).

O aumento na incidência de canela-preta tem sido associado com a presença de estirpes atípicas de *Dickeya* pertencentes ao biovar 3. Essas estirpes apresentam crescimento em temperatura mais elevada (≥ 27 °C) do que *D. dianthicola* e maior virulência em batata (Toth *et al.*, 2010; Saddler, 2010) e têm sido isoladas em vários países europeus, Israel e Geórgia (Laurila *et al.*, 2008; Slawiak *et al.*, 2009; Tsrer *et al.*, 2011). Estudos recentes permitiram verificar que as mesmas constituem uma nova espécie, denominada *D. solani* (Van der Wolf *et al.*, 2014a). Essa espécie é capaz de colonizar raízes das plantas de batata a partir do solo de forma rápida e eficiente e requer temperaturas ótimas elevadas (25-39 °C) para o desenvolvimento da doença e para o crescimento. Atualmente é o patógeno bacteriano predominante na batata em vários países europeus (Toth *et al.*, 2011; Van der Wolf *et al.*, 2014 a).

Na Escócia a tolerância “zero” para todas as espécies de *Dickeya* foi introduzida no Esquema de Classificação de Batata Semente Escocesa (SPCS) a partir de 2010 (Toth *et al.*, 2011). A mesma política está sendo aplicada gradualmente em outros

países, especialmente no Norte da África (Egito), onde *Dickeya* spp. podem ocasionar perdas mais severas na produção de batata do que na Europa (Tsrer *et al.*, 2009). No Brasil, os níveis de tolerância para *Dickeya* spp. na batata-semente a ser produzida, importada e comercializada no país são de 1,0% para semente básica e certificada de 1ª geração e de 2,0% para semente certificada de 2ª geração (IN 32/2012/MAPA).

As informações sobre a distribuição de *Dickeya* spp. em batata-semente no Brasil e, principalmente, sobre o nível de infecção latente nos mesmos são escassas. No entanto, registros indicam que a incidência deste patógeno vem aumentando no país. Em levantamento realizado por Oliveira *et al.* (2003) no estado do Rio Grande do Sul, 55% dos 408 isolados obtidos a partir de plantas com sintomas de canela-preta foram identificados como *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (sin. *P. atrosepticum*), 42% como *E. carotovora* subsp. *carotovora* (sin. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*), 1,0% como *E. chrysanthemi* (sin. *Dickeya* sp.) e 2,0% apresentaram características que não corresponderam ao padrão bioquímico e fisiológico de nenhuma dessas espécies ou subespécies. Carvalho (2009) constatou uma alta incidência de *Dickeya* spp. nas principais zonas de produção de batata, sendo que de 206 amostras, 54,9% estavam infectadas com o patógeno.

O controle eficiente de *Dickeya* spp. em batata consiste principalmente na exclusão e redução do inóculo, pois os produtos químicos são ineficientes. Assim, se faz necessária a implantação da certificação de sementes com o uso de métodos rápidos, confiáveis e reproduzíveis para a detecção destes patógenos em baixo nível populacional (Toth *et al.*, 2011; Czajkowski *et al.*, 2012; Tsrer *et al.*, 2012; Waleron *et al.*, 2013).

2.3 Métodos de detecção e determinação de *Dickeya* sp.

Vários métodos têm sido empregados na detecção e determinação de *Dickeya* sp. como métodos bioquímicos, fisiológicos e sorológicos (ELISA, imunofluorescência), marcadores moleculares como RFLP (Polimorfismo de Longitude dos Fragmentos de Restrição), REP-PCR (Sequências Palindrômicas extragênicas repetidas) e RAPD (DNA Polimórfico Aleatoriamente Amplificado), métodos baseados em PCR e análise de sequências de diferentes genes. No entanto, nos métodos bioquímicos, a ocorrência de estirpes atípicas com características intermediárias e a falta de ferramentas suficientemente robustas para essa discriminação dificultam a determinação correta desses patógenos (Duarte *et al.*, 2004; Czajkowski *et al.*, 2015).

Nas técnicas sorológicas, reações cruzadas são verificadas mediante uso de antissoros policlonais, devido à presença de antígeno flagelar comum entre estas bactérias. Outras bactérias pectolíticas presentes nos tubérculos ou saprófitas do solo, também podem interferir nos testes sorológicos produzindo reações falso-positivas (Toth *et al.*, 2011; Czajkowski *et al.*, 2015). Isto unido a limitações na sensibilidade constitui um problema para a detecção sorológica de *Dickeya* sp. (Van der Wolf *et al.*, 1993).

Marcadores moleculares como RFLP, REP-PCR e RAPD tem se mostrado eficientes na identificação de *Dickeya* spp. (Tsrer *et al.*, 2009; Slaviak *et al.*, 2009b; Waleron *et al.*, 2013). A caracterização genotípica de estirpes de *Dickeya*, por PCR-RFLP do gene *recA* com a endonuclease *XbaI*, resultou na diferenciação de *D. solani* do resto das espécies devido à presença nessa espécie de um sítio de corte único para a enzima (Waleron *et al.*, 2013). Num estudo de caracterização de estirpes de *Dickeya* spp., a REP-PCR, seguida de análises de agrupamento, mostrou-se valiosa para a

análise filogenética das espécies, obtendo-se uma classificação similar à da análise de sequência do gene *dnaX* (Slaviak *et al.*, 2009b).

Os métodos moleculares baseados em PCR têm se mostrado mais promissores e amplamente utilizados em função da sensibilidade e especificidade, além da facilidade de realização em relação aos outros métodos (Czajkowski *et al.*, 2015). A PCR pode ser utilizada para verificar a presença de patógenos em nível de espécie, subespécie, biovar, raça em uma mesma reação (PCR multiplex) ou isoladamente, com uma sensibilidade de aproximadamente 100 pg de DNA genômico (DNAg)(Carvalho, 2009; Palacio-Bielsa *et al.*, 2009). Várias PCR convencionais estão disponíveis para a detecção do gênero *Dickeya* (Van der Wolf *et al.*, 1995) sendo o mais utilizado o descrito por Nassar *et al.* (1996) com uso dos primers ADE1 /ADE2 específicos para o grupo de genes *pelADE*.

A sensibilidade da PCR pode ser aumentada para quase 100 fg de DNA utilizando qPCR que permite a quantificação da carga de inóculo presente em amostras de plantas e está se tornando uma técnica padrão para o diagnóstico de bactérias fitopatogênicas. A sensibilidade desta última técnica parece promissora para avaliar a ocorrência de infecções latentes em batata-semente e plantas (Carvalho, 2009; Palacio-Bielsa *et al.*, 2009). qPCR baseada na sequência 16S-23S rDNA foi desenvolvida para diferenciar *Dickeya* de *Pectobacterium* (Laurila *et al.*, 2010). Carvalho (2009) desenhou os oligonucleotídeos mtlDF/R a partir do gene *mtlD* para a detecção de *Dickeya* sp. por qPCR com SYBR Green I. Recentemente, primers e sondas têm sido disponibilizados para a detecção de espécies de *Dickeya* e vários ensaios de qPCR baseados em diferenças em genes *housekeeping* ou em sequências do genoma completo estão sendo desenvolvidos e validados para este fim (Pritchard *et al.*, 2012; Van der Wolf *et al.*, 2014b).

Atualmente a PCR está aliada ao sequenciamento, permitindo um grande avanço na taxonomia de bactérias. Neste sentido, a filogenia baseada em análises de sequência multiloci (MLSA) de diferentes genes *housekeeping* tem se mostrado útil para a taxonomia de *Dickeya*. Estes genes estão envolvidos em diversos aspectos do metabolismo bacteriano e em muitos deles existe suficiente diversidade de sequência como para realizar análises de filogenia bacteriana. O método tem demonstrado uma melhor correlação com a hibridização DNA-DNA do que a filogenia construída com o gene 16S rDNA. Além disso, é relativamente simples, economicamente viável e permite aos usuários compartilhar dados filogenéticos sem necessidade de intercâmbio de estirpes (Ma *et al.*, 2007).

Num estudo epidemiológico e filogenético de bactérias pectolíticas com uso de Polimorfismo de Longitude dos Fragmentos Amplificados (AFLP) e MLSA, as estirpes de *Dickeya* formaram um grupo claramente distante de *Pectobacterium* em ambas as análises (Nabhan *et al.*, 2012).

2.4 Método do cartão FTA para extração, preservação e purificação de ácidos nucléicos de fitopatógenos para o diagnóstico molecular de doenças em plantas.

Métodos de extração de ácidos nucléicos rápidos e eficientes são fundamentais para a detecção molecular de bactérias fitopatogênicas em batata-semente. Os primeiros passos e mais importantes para uma análise genética são a coleta de amostras e a purificação. Outro aspecto de extrema importância, antes de qualquer análise, é a manutenção da integridade das amostras (Wolf, 2011).

A tecnologia dos cartões FTA (Flinders Technology Associates) (Whatman, 2002) foi desenvolvida para a rápida coleta, transporte, armazenagem e purificação do material genético de vários tipos de amostras, tais como sangue, saliva, tecidos de

plantas, bactérias, vírus e outros microrganismos (Muthukrishnan *et al.*, 2008; Nechvatal *et al.*, 2008).

Os cartões FTA permitem fixar e armazenar os ácidos nucléicos diretamente dos tecidos frescos pressionados ou homogeneizados em tampão e transferidos para o papel. A matriz de papel é impregnada com uma mistura de reagentes, contendo desde tampões fortes, agentes desnaturantes de proteínas e quelantes de radicais livres. Esses reagentes capturam o DNA, o estabilizam e protegem de nucleases, oxidação e danos causados pela luz UV, assim como da degradação microbiana (Kubo & Fujita, 2006). Os patógenos são inativados fazendo com que a manipulação e o transporte da amostra sejam seguros.

Esta tecnologia tem aumentado a sensibilidade de detecção comparada a métodos de extração convencionais do DNA, além de propiciar a coleta de um grande número de amostras (Rajendram *et al.*, 2006). O DNAg pode ser armazenado nos cartões FTA por mais de quatorze anos à temperatura ambiente, e analisado no momento desejado por PCR, RFLP, RT-PCR e qPCR. Outra vantagem do uso destes cartões é a rapidez no processo de purificação que dura em média de 20 a 30 min por amostra (GE Healthcare, 2011).

O uso dos cartões FTA tem sido extensivo na área da saúde, no entanto, existem poucos relatos para a detecção de fitobactérias. Ribas (2007), Figueiró (2008) e Carvalho (2009) relataram a utilidade desses cartões para detecção de pectobactérias e *Ralstonia solanacearum* em plantas e tubérculos de batata.

A existência de uma nova espécie de *Dickeya*, de elevada virulência e considerada quarentenária na Europa, de onde o Brasil importa anualmente cerca de 2.700 toneladas de batata-semente, unido à constatação de uma elevada incidência de *Dickeya* em batata no território nacional e a não identificação das espécies presentes,

fundamentam a necessidade de este estudo com o objetivo de verificar quais estirpes desse gênero bacteriano estão presentes no país e de adotar medidas adequadas de quarentena com espécies ainda não presentes.

O conhecimento da diversidade destes isolados é um importante pré-requisito para o desenvolvimento de métodos de detecção e estudos epidemiológicos, principalmente quando há ocorrência de diferentes espécies relacionadas no mesmo hospedeiro, evitando possíveis reações cruzadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estirpes bacterianas de referência, condições de crescimento e preservação

As estirpes bacterianas de referência (ou DNAg) utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 1. Estas foram cultivadas rotineiramente em meio CPG (casamino ácido, 1,0; peptona, 10,0; glicose, 10,0; ágar, 18,0 g/L) e nutriente ágar (NA) (Schaad *et al.*, 2001).

TABELA 1. Espécies e estirpes bacterianas de referência utilizadas no estudo. Porto Alegre, RS, 2015.

| Espécies/Estirpes | Hospedeiro | País | Fonte |
|--|---------------------------------|------------|------------------------|
| <i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i> NCPPB 402 * ^T | <i>Chrysanthemum morifolium</i> | EUA | Toth, I ² |
| <i>D. chrysanthemi</i> bv. <i>parthenii</i> NCPPB 516 ^T | <i>Parthenium argentatum</i> | Dinamarca | Toth, I ² |
| <i>D. dadantii</i> NCPPB 898 * ^T | <i>Pelargonium capitatum</i> | Comoros Is | Toth, I ² |
| <i>D. dianthicola</i> NCPPB 453 * ^T | <i>Dianthus caryophyllus</i> | UK | Toth, I ² |
| <i>D. dianthicola</i> NCPPB 3534 * | <i>Solanum tuberosum</i> | Holanda | Toth, I ² |
| <i>D. dieffenbachiae</i> NCPPB 2976 * ^T | <i>Dieffenbachia</i> sp. | EUA | Toth, I ² |
| <i>D. paradisíaca</i> NCPPB 2511 * ^T | <i>Musa paradisíaca</i> | Colômbia | Toth, I ² |
| <i>D. zaeae</i> NCPPB 2538 * ^T | <i>Zea mays</i> | EUA | Toth, I ² |
| <i>D. solani</i> 2222 * ^T | <i>Solanum tuberosum</i> | Holanda | Toth, I ² |
| <i>D. chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i> IBSBF 231 ^T | <i>Chrysanthemum morifolium</i> | EUA | IB ³ |
| <i>Pectobacterium atrosepticum</i> IBSBF 790 ^T | <i>Solanum tuberosum</i> | UK | IB ³ |
| <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> IBSBF 791 ^T | <i>Solanum tuberosum</i> | Dinamarca | IB ³ |
| <i>P. brasiliensis</i> IBSBF 1692 ^T | <i>Solanum tuberosum</i> | Brasil | Duarte, V ⁴ |
| <i>P. brasiliensis</i> IBSBF 1697 | <i>Solanum tuberosum</i> | Brasil | Duarte, V ⁴ |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> 93 (bv 1) | <i>Solanum tuberosum</i> | Brasil | IB ³ |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> 126 (bv 2) | <i>Solanum tuberosum</i> | Brasil | IB ³ |
| <i>Bacillus subtilis</i> IBSBF 760 | - | Brasil | IB ³ |

* -DNAg; ^T estirpe tipo; ²James Hutton Institute, Dundee, Scotland; ³IB- Coleção de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil; ⁴ Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Dep. Fitossanidade, Porto Alegre, RS, Brasil.

A preservação foi realizada em ampolas de criopreservação em glicerol 40 % e em nitrogênio líquido. No primeiro caso, as estirpes foram cultivadas sob agitação (150 rpm) em meio líquido Luria-Bertani (LB) (triptona, 10,0; extrato de levedura, 5,0; cloreto de sódio 5,0) por 24 h a 28 °C, e adicionou-se 0,5 mL de glicerol 80%, na concentração de 1:1. As ampolas de criopreservação corretamente identificadas foram depositadas em freezer a - 20 °C. Para a conservação em nitrogênio foi utilizado o agente crioprotetor glicerol a 10% (v/v).

Para a extração de DNA ou recuperação das estirpes preservadas a - 20 °C, estas foram cultivadas em meio líquido LB por 24 h a 28 °C sob agitação.

3.2 Coleta de amostras e transferência para cartões FTA

Duzentas e sete amostras [tubérculos (75) e plantas (10) de batata-consumo, tubérculos (69) e plantas (15) de batata-semente nacional e importada do Chile (48)] foram coletadas nos anos de 2010 a 2013, de diferentes regiões e cultivares (Tabela 2). As amostras foram compostas por 10 tubérculos ou plantas.

Para as amostras de tubérculos (182) foi realizada a transferência para os cartões FTA (Whatman, GE) pelo método de pressão direta (Carvalho, 2009). O procedimento consistiu em cortar um cone do tubérculo na região da inserção do estolão, triturar a extremidade e colocar o extrato em contato com a superfície do cartão.

Posteriormente, os cartões FTA foram colocados para secar à temperatura ambiente durante 24 h e guardados em pacotes plásticos com sílica. Os pacotes plásticos foram colocados dentro de caixas plásticas e armazenados à temperatura ambiente, até o momento da purificação do DNA.

TABELA 2. Número de amostras de batata coletadas nos anos 2010 a 2013 de diferentes regiões do Brasil e do Chile. Porto Alegre, RS, 2015.

| Procedência | Nº amostras 2010-2013 |
|--------------------------|----------------------------------|
| Minas Gerais | 36 |
| Pouso Alegre | 26 |
| Várzea da Palma | 5* |
| Paracatu | 2* |
| NI | 3 |
| Paraná | 11 |
| Contenda | 3 |
| Ponta Grossa | 2 |
| Guarapuava | 3 |
| NI | 3 |
| Santa Catarina | 30 |
| São Joaquim | 28 |
| NI | 2 |
| Rio Grande do Sul | 40 |
| Ibiraiaras | 7 |
| São Francisco de Paula | 8 |
| Bom Jesus | 9 |
| Porto Alegre | 16 |
| São Paulo | 12 |
| Paranapanema | 2 |
| Itapetininga | 1 |
| Tacuarivai | 2 |
| NI | 4 |
| Vargem Grande do Sul | 3* |
| Bahia | 8 |
| Mucugé | 4 |
| Ibicoara | 4 |
| Goiás | 12 |
| Cristalina | 12(5*) |
| Brasília | 10 |
| PAD-DF | 10* |
| Outros países | 48 |
| Chile | 48 |
| Total | 207 |

NI: não identificado; *amostras de plantas com canela preta; PAD-DF: área do Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal.

3.3 Obtenção de isolados

Para as amostras de batata-semente, antes do isolamento, cada tubérculo foi lavado com água corrente, deixado secar à temperatura ambiente, perfurado com palitos de madeira em 10 lenticelas e coberto com óleo mineral para criar uma condição de anaerobiose. Após escorrer, foram colocados individualmente em papel toalha umedecido dentro de um saco plástico transparente e incubados a 28 °C por 96 h. Posteriormente foi realizado o isolamento e a determinação de *Dickeya* spp.

Para a obtenção dos isolados, palitos de madeira esterilizados foram encostados nas lesões dos tubérculos ou as hastes com podridão e introduzidos em frutos de pimentão verde, previamente desinfestados (álcool 70% por 30 s, NaOCl 1% por mais 30 s e lavados com água destilada esterilizada) que tem sido descritos como parcialmente seletivos para pectobactérias (Takatsu *et al.*, 1981). Os pimentões foram colocados em bandeja, contendo papel toalha umedecido no fundo, cobertas com saco plástico e incubados a 28 °C durante 24-48 h. O controle negativo constou de palitos submersos em água destilada esterilizada (ADE) e introduzidos nos pimentões. Após, a epiderme do pimentão no local da lesão foi retirada, a alça de platina encostada no tecido de transição entre a parte sintomática e a sadia e posteriormente colocada em placas com meio de cultura CPG para repicagem pelo método de estrias compostas (Couto e Gonçalves, 2007). Colônias de coloração creme, com bordos irregulares, opacas foram repicadas para meio NA para purificação.

Os isolados foram armazenados em ADE a 4 °C e também em glicerol 40% e nitrogênio líquido conforme descrito no item 3.1.

3.4 Determinação e caracterização de *Dickeya* sp. por testes bioquímicos, fisiológicos e de patogenicidade

Os isolados obtidos foram submetidos aos seguintes testes: Gram direto, atividade pectolítica em batata, oxidase, catalase, oxidação/fermentação de glicose (O/F), crescimento a 37 e 39 °C, produção de ácido a partir de α -metilglicosídeo, lactose e maltose, sensibilidade à eritromicina, crescimento em NaCl a 5% e caracterização pelo sistema BIOLOG GN2 (De Boer & Kelman, 2001) Adicionalmente, foram avaliadas a produção de pigmento indigoidine em meio NGM [NA, 23 g/L; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 2 mM; 10 mL glicerol (1,0% v/v)], para diferenciar *Pectobacterium* spp. de *Dickeya* spp. (Lee & Yu, 2006) e a produção de pigmento amarelo em BDA (batata dextrose ágar) que permite distinguir *D. solani* do resto das espécies do gênero.

3.4.1 Gram direto com KOH 3% (método de Ryu)

Duas gotas de uma solução de KOH a 3% (p/v) foram colocadas em uma lâmina limpa e com o auxílio de um palito de dente esterilizado foi transferida parte da colônia bacteriana para o KOH e misturado em movimentos circulares durante 30 s. Durante esse tempo foi erguido o palito cerca de 1 a 2 cm da superfície da lâmina para observar a formação de fios de material viscoso. A formação de um fio viscoso indica que a bactéria é Gram-negativa (Powers, 1995).

3.4.2 Atividade pectolítica em batata

A partir de tubérculos de batata, previamente lavados e desinfetados (álcool 70% por 30 s, NaOCl 1,0% por mais 30 s e lavados com água destilada esterilizada) foram cortadas rodela de 3 mm de espessura que foram colocadas em placas de Petri. Em seguida depositou-se no centro das rodela, com ajuda de um palito de dente esterilizado, parte da colônia bacteriana testada, crescida por 24 h. Após incubação a 28 °C durante 24 h foi avaliada a consistência do tecido das rodela.

3.4.3 Teste de oxidase

Foram utilizadas tiras (impregnadas com N-N-dimetil-parafenileno-diamina 2,5 g/L; alfa-naftol 2,5 g/L; álcool etílico 500 mL/L) para determinação da reação de oxidase. Uma colônia de 24 h de crescimento do isolado a ser testado foi transferida para a tira com uma alça descartável e friccionada. O desenvolvimento de uma coloração púrpura intensa em até 10 s indicou resultado positivo para o teste. Entre 10 e 60 s o isolado foi considerado como positivo tardio e após esse tempo considerou-se negativo (Schaad *et al.*, 2001).

3.4.4 Teste de catalase

Esta enzima atua sobre a água oxigenada (peróxido de hidrogênio 3%) desdobrando-a em oxigênio e água. Para o teste, uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% foi colocada numa lâmina e, em seguida, com uma alça de platina, foi depositada sobre a gota uma porção da colônia bacteriana, crescida de 24-48 h. A presença da enzima foi detectada pelo desprendimento de bolhas devido à liberação do oxigênio (Schaad *et al.*, 2001).

3.4.5 Teste de oxidação/fermentação da glicose

Para determinação do metabolismo oxidativo/fermentativo da glicose foi utilizado o meio O/F (peptona, 2,0; cloreto de sódio, 5,0; KH_2PO_4 , 0,3; ágar, 3,0 g/L, solução aquosa 1,0% de azul de bromotimol, 3,0 mL) (Hugh & Leifson, 1953) suplementado com 1,0% de glicose. O pH foi ajustado a 7,1 e foram adicionados 3,0 mL do indicador azul de bromotimol. Foram inoculados, por picada, dois tubos do meio com cada uma das culturas. Posteriormente, cobriu-se um dos tubos com uma camada de óleo mineral, de aproximadamente 5 mm de espessura. Após incubação durante 24 h a 28 °C foi verificada a cor do meio em cada um dos tubos e registrado. A bactéria que oxida, mas não fermenta a glicose, acidifica (torna o meio amarelo) apenas no tubo que

não contém óleo. A bactéria que fermenta e oxida, acidifica o meio de cultura nos dois tubos.

3.4.6 Crescimento a 37 e 39 °C

Foi realizada a repicagem dos isolados em placas de Petri com meio NA pela técnica de esgotamento por estrias. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 e 39 °C e foi observado o desenvolvimento ou não de colônias durante três dias (Schaad *et al.*, 2001).

3.4.7 Utilização de α -metilglicosídeo

Foi utilizado um meio de cultura basal (KH_2PO_4 , 2,0; K_2HPO_4 , 7,0; NH_4Cl , 1,0; 10% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 mL; casamino ácido, 1,0; ágar, 15 g/L) suplementado com 50 mL de α -metilglicosídeo 20% e 2 mL de cloreto de tetrazolium 1,0%. As placas foram inoculadas com cada isolado por repicagem em estrias e incubadas por 48 h a 28 °C. Estirpes positivas crescem bem e formam colônias com centro vermelho (Schaad *et al.*, 2001).

3.4.8 Sensibilidade à eritromicina

Para testar a sensibilidade à eritromicina foram preparadas suspensões bacterianas dos diferentes isolados em solução salina (NaCl 0,85%) e a concentração ajustada conforme a escala 0,5 de MacFarland. Em seguida, uma alíquota da suspensão foi transferida e inoculada uniformemente na superfície de uma placa de Petri com meio de cultura Mueller-Hinton. Com o auxílio de uma pinça esterilizada foi colocado sobre a superfície do meio e no centro da placa, um disco de papel de filtro impregnado com eritromicina (15 μg) (Laborclin). Após incubação a 28 °C por 48 h considerou-se como resultado positivo para sensibilidade o aparecimento de um halo de inibição ao redor do disco (Schaad *et al.*, 2001).

3.4.9 Tolerância a 5% de NaCl

Os isolados foram repicados em NA suplementado com NaCl 5,0% e as placas foram incubadas a 28 °C durante 24 h. O crescimento bacteriano sobre o meio de cultura indicou tolerância à concentração do sal. Como testemunha os isolados foram repicados em NA sem acrescentar o sal.

3.4.10 Caracterização de *Dickeya* sp. pelo sistema BIOLOG GN2

O teste foi realizado segundo recomendação do fabricante. Para isto, isolados bacterianos, cultivados em meio NA a 28 °C por 24 h foram transferidos para meio BUGM (Biolog Universal Growth Medium) e incubados nas mesmas condições. Posteriormente, foi feita uma suspensão bacteriana em solução salina (NaCl 0,85%) com a concentração ajustada conforme a escala 0,5 de MacFarland e alíquotas de 150 µL da suspensão foram adicionadas em cada um dos 96 poços das microplacas do sistema BIOLOG GN2 (BIOLOG, Inc., Hayward, CA, EUA), contendo 95 diferentes fontes de carbono. Após incubação por 24 h a 28 °C foi realizada a leitura dos resultados de forma visual e a identificação dos isolados no programa MicroLog (BIOLOG, Inc., Hayward, CA, EUA). Os dados obtidos foram transformados em dados binários para a construção de uma matriz de similaridade baseada no Coeficiente de Dice, sendo atribuídos os valores de 1 ou 0 baseado na utilização ou não da fonte de carbono. A análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA no programa NTSYS-pc v2.01a.

3.4.11 Produção de pigmentos em diferentes meios de cultura

Utilizou-se o meio NGM para diferenciar *Pectobacterium* spp. de *Dickeya* spp. Estas últimas produzem colônias com uma coloração marrom a azul neste meio de cultura (Lee & Yu, 2006). O meio BDA foi usado para diferenciar *Dickeya solani*, que

produz colônias amarelas, do resto das espécies desse gênero que produzem colônias de cor creme (B. Carter, Fera, York, UK, comunicação pessoal).

3.5 Determinação e caracterização de *Dickeya* sp. por métodos moleculares

3.5.1 Extração de DNA genômico por lise alcalina

O DNAg das estirpes avaliadas foi extraído mediante um protocolo adaptado de De Boer & Ward (1995). Células bacterianas presentes em 1,0 mL de cultura foram precipitadas por centrifugação (12.000 x g por 2 min) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram suspensas em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e lisadas pela adição do tampão de lise (0,2 N NaOH, 1,0% SDS). Posteriormente os componentes proteicos foram precipitados com 300 µL de acetato de amônio 7,5 M e removidos por centrifugação durante 5 min a 12.000 x g. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo. Logo, o DNA foi precipitado com etanol 95% seguido de centrifugação por 15 min a 12.000 x g. A eliminação dos sais foi efetuada por lavagem do DNA em etanol 70% seguido de centrifugação por 5 min. O DNA das estirpes foi solubilizado em 50 µL de água Milli-Q e armazenado a - 20 °C.

A quantificação (260 nm) e verificação da qualidade (relação 260/280 nm) do DNA extraído de cada estirpe bacteriana foram realizadas em espectrofotômetro *Nanodrop® 2000* (Thermo Scientific). Posteriormente, todos os DNAs foram diluídos em concentrações conhecidas para serem utilizados em PCR e qPCR.

3.5.2 PCR

Para a determinação preliminar dos isolados primeiramente foi realizada a PCR com os oligonucleotídeos iniciadores: 1491f (5'-GAA GTCGTAACAAGGTA-3')/ L1rA (5'-CAAGGCATCCACCGT-3')/ L1rG (5'-CAGGGCATCCACCGT-3') (Fessehaie *et al.*, 2002) que amplificam região espaçadora intergênica (IGS) 16S-23S do

DNAr e permitem diferenciar *Pectobacterium* spp. (fragmentos de 450 e 490 pb) de *Dickeya* spp. (fragmentos de 356 e 491 pb); ADE1 (5'-GATCAGAAAGCCCCGCAGCCAGAT-3') / ADE2 (5'-CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC-3') (Nassar *et al.*, 1996) específico para *Dickeya* spp. e que amplificam um fragmento de 420 pb do agrupamento de genes *pelADE* que codifica para a enzima pectato-liase.

As ampliações foram efetuadas em volume final de 25 µL em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.). Com os oligonucleotídeos 1491f/L1rG/L1rA o regime térmico foi: 94 °C/ 2 min, (94 °C/45 s, 62 °C/45 s, 72 °C/90 s) 30X, 72 °C/10 min e a mistura de reação continha 2,0 µM de 1491f, 1,0 µM de L1G, 1,0 µM de L1A, tampão de reação 1X, 0,1 mM de dNTP (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µL de DNAg. As reações com ADE1/ADE2 continham 1,0 µM de cada oligonucleotídeo, tampão de reação 1 X, 0,1 mM de dNTP (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,0 µL de DNAg e foram conduzidas a 94 °C por 4 min, (94 °C/ 60 s, 65 °C/ 60 s, 72 °C/ 60 s) 35X, 72 °C/10 min.

Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 80 V durante 90 min. Para determinar o tamanho dos fragmentos foi utilizado o padrão de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizados sob luz UV e fotodocumentados com câmera Sony Cyber-shot DSC H50.

3.5.3 Análise das sequências parciais dos genes *dnaX* e *mdh*

Para cada isolado estudado foram amplificadas as sequências parciais dos genes “housekeeping” *dnaX* (subunidades γ e τ da DNA polimerase III) e *mdh* (malato desidrogenase) (Tabela 3). Para o gene *dnaX* a reação foi conduzida sobre as seguintes

condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, hibridização a 59 °C durante 1 min, e extensão a 72 °C por 2 min, finalizando com uma extensão final a 72 °C durante 5 min (Slawiak *et al.*, 2009b). A mistura de reação continha 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, tampão de reação 1X, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂, 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1,0 µL de DNAg (50 ng/µL).

A PCR para o gene *mdh* consistiu em uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 52 °C durante 30s e 72 °C por 1 min e um último passo de extensão a 72 °C por 6 min (Ma *et al.*, 2007). A mistura de reação constou de 0,8 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, tampão de reação 1X, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen), 3,0 mM de MgCl₂, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1,0 µL de DNAg (50 ng/µL).

TABELA 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação das sequências parciais dos genes *dnaX* e *mdh*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Gene | Sequência | Tamanho do produto (pb) | Referência |
|-------------|--|-------------------------|-------------------------------|
| <i>dnaX</i> | <i>dnaXf</i> -5'-TATCAGGTYCTTGCCCGTAAGTGG-3' | 535 | Slawiak <i>et al.</i> , 2009b |
| | <i>dnaXr</i> -5'-TCGACATCCARCGCYTTGAGATG-3' | | |
| <i>mdh</i> | <i>mdh86F</i> -5'-CCCAGCTTCCTTCAGGTTCCAGA-3' | 563 | Ma <i>et al.</i> , 2007 |
| | <i>mdh628R</i> -5'-CTGCATTCTGAATACGTTTGGTCA-3' | | |

Obs. R = A, G; Y= C, T

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) e os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) a 100 V durante 60 min. Como padrão de peso molecular para determinação do tamanho dos fragmentos, utilizou-se 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/ mL), visualizados sob luz UV e fotodocumentados com câmera Sony Cyber-shot DSC H50.

Os fragmentos de tamanho esperado foram purificados com Illustra™ ExoProStar (GE, Healthcare) e a qualidade e concentração avaliada no espectrofotômetro Nanodrop® 2000. Os fragmentos purificados foram sequenciados em ambas direções pelo método Bigdye Terminator, v 3.1 em sequenciador ABI3130 (Applied Biosystem). Os oligonucleotídeos usados para o sequenciamento foram os mesmos da PCR.

As sequências obtidas foram analisadas e editadas com BioEdit v 7.0.9 (BioEdit, 1999). Para a análise filogenética além dos isolados obtidos neste trabalho foram recopiladas sequências destes genes depositadas no GenBank para as diferentes espécies de *Dickeya*. Devido a diferenças nas sequências submetidas no GenBank, as mesmas tiveram que ser cortadas para um tamanho consenso.

O alinhamento das sequências foi realizado com o algoritmo Clustal W 1.6 na plataforma MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). As árvores filogenéticas foram geradas para cada gene e para as sequências concatenadas com o método Neighbor Joining baseado no modelo Tamura-Nei. Análises de bootstrap com 5000 repetições foram realizadas para calcular a consistência dos agrupamentos nas árvores.

As sequências do gene *dnaX* de *Pectobacterium atrosepticum* IPO 998, *P. atrosepticum* IPO 161, *P. atrosepticum* SCRI1043 e *P. carotovorum* 3733 e a sequência *mdh* de *P. atrosepticum* SCRI1043 foram usadas como outgroup para a construção das árvores.

3.6 Virulência de *Dickeya dadantii* e *D. solani*

A virulência de *D. dadantii* e *D. solani* foi determinada mediante a mensuração da quantidade de tecido macerado de tubérculos de batata das cultivares Ágata e Asterix. Os tubérculos foram previamente lavados com água corrente e posteriormente desinfestados com hipoclorito de sódio 0,5% durante 10 min e lavados com água

destilada esterilizada (Adriaenssens *et al.*, 2012). Depois de secarem ao ar livre, foram pesados e inoculados em condições de laboratório. Dezenove estirpes de *D. dadantii* e cinco de *D. solani* obtidas nesta pesquisa foram utilizadas, sendo seis tubérculos usados para cada isolado.

Para a inoculação foi realizada uma perfuração de 1,0 cm de profundidade na região de inserção do estolão, onde foram colocados 10 µL de suspensão bacteriana ajustada a uma densidade ótica (DO) de 0,2 a 600 nm (Laurila *et al.*, 2008) em espectrofotômetro Beckman DU65. A concentração bacteriana para essa DO, verificada por diluição e contagem das colônias em placa com meio CPG, foi equivalente a $1,6-2,0 \times 10^8$ UFC/mL. Após a inoculação, os orifícios foram tampados com algodão estéril umedecido com água destilada esterilizada e os tubérculos colocados em câmara úmida a 21, 28 e 35 °C durante cinco dias. A testemunha constou de seis tubérculos inoculados com água destilada esterilizada. A avaliação consistiu em cortar os tubérculos pela metade, ao longo do ponto de inoculação, retirar o tecido macerado e pesá-lo (Kim *et al.*, 2009; Mole *et al.*, 2010).

Os dados foram analisados com o programa estadístico SAS v 9.4 (SAS, 2008). Devido a que os dados da temperatura 21 °C apresentaram variância=0 não foram incluídos na análise. Com o resultado das outras duas temperaturas efetuou-se uma Análise de Variância (ANOVA) com três fatores (Isolado, Cultivar e Temperatura) via Modelos Generalizados (GLM). A comparação das médias de ambas as espécies foi realizada pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As cultivares foram selecionadas por serem umas das mais utilizadas na produção brasileira atualmente e as temperaturas devido à diversidade climática do país.

3.7 Detecção de *Dickeya* spp. em amostras de batata armazenadas em cartões FTA

Duzentas e quatro e 182 amostras de tubérculos coletadas e armazenadas em cartões FTA em 2007-2009 e 2010-2013, respectivamente, foram analisadas para a presença de *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani* (Anexo I).

3.7.1 Purificação do DNA a partir dos cartões FTA

Discos dos cartões FTA (3,0 mm de diâmetro) foram cortados e retirados com um cortador Harris Micro Punch (Fitzco Inc., MN, USA) e colocados em tubos para PCR (200 µL). Discos sem a presença de amostras foram retirados e utilizados como controle negativo para o uso do cartão FTA. Para a purificação do DNA, os discos foram lavados duas vezes com 200 µL do reagente de purificação do cartão FTA (Whatman, GE) e incubados durante 5 min. Posteriormente foram enxaguados duas vezes com 200 µL de tampão TE⁻¹ (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH 8,0) por 5 min. Após, os discos foram secos a 56 °C por 20 min no bloco de aquecimento do termociclador com os tubos abertos. Em seguida, eles foram submetidos à eluição do DNA que consiste na liberação do DNA do disco pelo método alcalino descrito pelo fabricante. O mesmo requer dois reagentes, uma solução alcalina e uma neutra. A primeira possibilita que o DNA purificado seja liberado da matriz, porém encontra-se desestabilizado. A segunda solução é adicionada para que ocorra a estabilização da fita dupla de DNA.

Para realizar o procedimento, os discos depois de secos foram colocados em tubos de 1,5 mL, onde foram adicionados 35 µL de uma solução alcalina (0,1 N NaOH; 0,3 mM EDTA; pH 13,0) e foram incubados por 5 min à temperatura ambiente. Depois, adicionaram-se 65 µL da solução neutra e homogeneizou-se em agitador vórtex. A solução foi incubada por 10 min e homogeneizada novamente. Posteriormente, os

discos foram removidos da solução com auxílio de ponteiras estéreis. Os 100 µL de DNA eluído foram armazenados a -20 °C até o momento de usar na qPCR.

3.7.2 Construção das curvas-padrão da qPCR

As curvas-padrão da qPCR de *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani* foram construídas com DNAg em concentrações que variaram de 125 ng/µL a 0,000125 ng/µL. Os valores médios de Ct (número do ciclo em que se detecta aumento de fluorescência), obtidos para cada diluição em triplicatas, foram representados graficamente em função do logaritmo da concentração de DNA, obtendo-se uma regressão linear dos pontos assim como o seu coeficiente de correlação. Foi ainda calculado o desvio padrão dos valores de Ct para avaliar a precisão da qPCR.

A elaboração destas curvas-padrão permitiu calcular a eficiência da qPCR com base na inclinação da reta obtida através da seguinte fórmula: $E = 10^{(-1/\text{inclinação})} - 1$. Por outro lado permitiu determinar o limite de detecção da técnica e quantificar o número de cópias de DNA alvo nas amostras. O DNAg presente nas amostras corresponde ao número de células bacterianas baseado no tamanho do genoma de cada espécie e no número de cópias do gene onde foram desenhados os oligonucleotídeos.

3.7.3 Detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani* por qPCR com sonda TaqMan[®]

Oligonucleotídeos e sondas TaqMan[®] foram utilizados na detecção de *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani* por qPCR nas 386 amostras de tubérculos de batata armazenadas em cartões FTA (Tabela 4).

As reações para *D. dianthicola* e *D. solani* foram realizadas em termociclador Rotor Gene-Q (Qiagen) em volume de 12,5 µL e continham em concentração final: Rotor-Gene Probe PCR Master Mix 1X, 0,5 µM dos oligonucleotídeos, 0,1 µM da sonda e 3,0 µL de DNA alvo. As condições da PCR foram 48 °C, 30 s; 95 °C, 10 min

TABELA 4. Oligonucleotídeos e sondas utilizados para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani* por qPCR. Porto Alegre, RS, 2015.

| Espécie | Oligonucleotídeos e sondas | Referência |
|------------------------|--|---|
| <i>D. solani</i> | SOLDF-5'-GCCTACACCATCAGGGCTAT-3' | Pritchard <i>et al.</i> , (2012) |
| | SOLDR-5'-CACTACAGCGCGCATAACT-3' | |
| | SOLDP-5'-FAM-CCAGGCCGTGCTCGAAATCC-TAMRA-3' | |
| <i>D. dianthicola</i> | DIACF-5'-CCAACGATTAGTCGGATCT-3' | “ |
| | DIACR-5'-TAGTTGGTGCCAGGTTGGTA-3' | |
| | DIACP-5'-FAM-TCGACGTATGGGACGGTCGC-TAMRA-3' | |
| <i>D. chrysanthemi</i> | DCHF-5'-CGATTTCCCGCAAGTGT-3' | Van der Wolf <i>et al.</i> , (2014b) |
| | DCHR-5'-TGGCAAAAGGGCTGAATTG-3' | |
| | DCHP*-5'-FAM-cgccgTCActccc-BHQ-1-3' | |

F- forward; R- reverso; P- probe (sonda); P*-sonda tipo LAN. Nas sondas, o fluoróforo FAM é ligado na região 5' e a molécula quencher (TAMRA ou BHQ) é ligada na região 3'.

seguidos de 40X (95 °C, 15 s; 55 °C, 60 s). Além do controle negativo para o uso do cartão FTA foi utilizado um controle negativo para a PCR que continha água Milli-Q esterilizada ao invés do DNA alvo.

Para a detecção de *D. chrysanthemi* as reações foram realizadas em volume de 12,5 µL e continham em concentração final: Rotor-Gene Probe PCR Master Mix 1X, 0,3 µM dos oligonucleotídeos, 0,1 µM da sonda e 3,0 µL de DNA alvo. As condições da PCR foram 50 °C, 2 min; 95 °C, 10 min seguidos de 40X (95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s). Além do controle negativo para o uso do cartão FTA foi utilizado um controle negativo para a qPCR que continha água Milli-Q esterilizada ao invés do DNA alvo.

Os dados da qPCR foram analisados manualmente e pelo software do aparelho Rotor-Gene Q v 2.0.2. A partir dos dados de Ct foram calculados a média e o desvio padrão das médias das amostras a partir de três repetições para avaliar a precisão da qPCR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação e caracterização de *Dickeya* sp. por testes bioquímicos, fisiológicos e de patogenicidade

Vinte e quatro isolados de *Dickeya* sp. foram obtidos do processamento das 207 amostras de batata coletadas nos anos 2010 a 2013 (Tabela 5). Dezenove foram obtidos de batata-consumo e cinco de batata-semente. Todos foram Gram-negativos, anaeróbios facultativos, positivos para catalase, negativos para oxidase e maceraram batata após 24 h (Tabela 6).

Todos os isolados cresceram à 37 e a 39 °C (Tabelas 5 e 6), não toleraram concentrações de 5% de NaCl, não utilizaram o α -metilglicosídeo e apresentaram sensibilidade à eritromicina. No meio ágar nutritivo-glicerol-MnCl₂ (NGM) produziram um pigmento marrom a azul escuro, característico das espécies de *Dickeya* (Fig. 1A; Anexo II).

Por outro lado, os cinco isolados de batata-semente apresentaram coloração amarela em meio BDA (Fig. 1C), fato informado para *D. solani* (B. Carter, Fera, York, UK, comunicação pessoal, citado por Toth *et al.*, 2011).

TABELA 5. Número de amostras coletadas nos anos 2010-2013 e isolados de *Dickeya* sp. obtidos em meio CPG (casamino ácido, peptona, glicose). Porto Alegre, RS, 2015.

| País | Estado | Procedência | Quantidade amostras | Tipo de batata* | Isolados de <i>Dickeya</i> sp. |
|--------------|-------------|------------------------|---------------------|-----------------|--------------------------------|
| Brasil | RS | Ibiraiaras | 3 | S | 0 |
| | | “ | 4 | C | 1 |
| | | Porto Alegre | 16 | C | 1 |
| | | São Francisco de Paula | 8 | C | 9 |
| | | Bom Jesus | 9 | C | 1 |
| | MG | Pouso Alegre | 26 | S | 0 |
| | | Várzea da Palma | 5** | S | 5 |
| | | Paracatu | 2** | C | 0 |
| | | Belo-Horizonte | 3 | C | 6 |
| | GO | Cristalina | 12(5**/12) | C | 1 |
| | BA | Mucugé | 4 | C | 0 |
| | | Ibicoara | 4 | C | 0 |
| | SP | NI | 4 | C | 0 |
| | | Itapetininga | 1 | C | 0 |
| | | Paranapanema | 2 | C | 0 |
| | | Tacuarivai | 2 | C | 0 |
| | | Vargem Grande do Sul | 3** | C | 0 |
| | PR | NI | 3 | C | 0 |
| | | Contenda | 3 | C | 0 |
| | | Guarapuava | 3 | C | 0 |
| Ponta Grossa | | 2 | C | 0 | |
| SC | São Joaquim | 30 | S | 0 | |
| DF | PAD-DF | 10** | S | 0 | |
| Chile | NI | NI | 48 | S | 0 |
| Total | | | 207 | - | 24 |

*C: batata-consumo, S:batata-semente; **amostras de plantas com canela- preta; NI: não identificado; PAD-DF: área do Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal.

TABELA 6. Resultado de testes bioquímicos e fisiológicos de 24 isolados de *Dickeya* sp. oriundos de batata-semente e consumo coletadas nos anos 2010-2013. Porto Alegre, RS, 2015.

| Gênero | Nº de isolados | Testes bioquímicos e fisiológicos (% positivos) | | | | | | | | | | | |
|----------------|----------------|---|-----|-----|---------|----------|------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---|------------------|--------------------|
| | | G- | AP | O/F | Oxidase | Catalase | Sensibilidade à eritromicina | Crescimento a 37 °C | Crescimento a 39 °C | Tolerância NaCl 5% | Utilização de α -metilglucosídeo | Pigmento em NGM* | Coloração em BDA** |
| <i>Dickeya</i> | 24 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 20,8 |

G-: Gram -; AP: atividade pectolítica; O/F: metabolismo oxidativo-fermentativo da glicose; *pigmento marrom a azul; **coloração amarela.

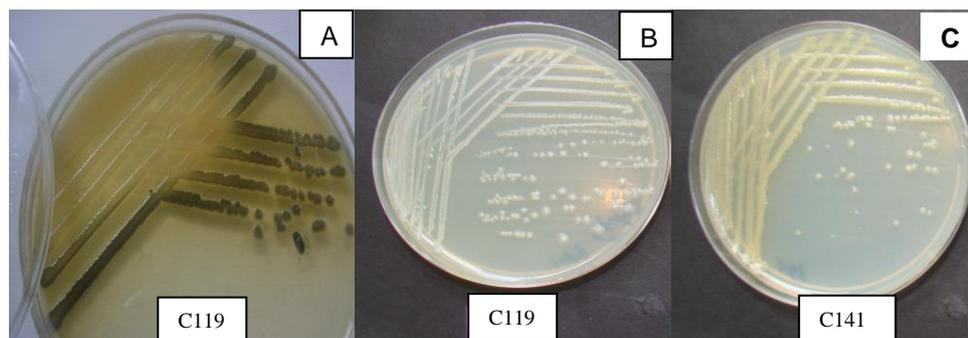


FIGURA 1. Colônias de isolados de *Dickeya* spp. Produção de pigmento azul em meio NGM (A); coloração creme (B) e amarela (C) em meio BDA. Porto Alegre, RS, 2015.

O crescimento a 39 °C é característico da maioria das espécies de *Dickeya* sendo negativas somente *D. dianthicola* e *D. paradisiaca* (Samson *et al.*, 2005). Quanto à produção do pigmento indigoidine, Lee & Yu (2006) encontraram que a produção do pigmento no meio NGM é uma propriedade muito estável e pode ser usada como propriedade fenotípica para a diferenciação de *Dickeya* spp. (Fig. 1A). Van Vaerenbergh *et al.* (2012) relataram sucesso na utilização do meio para a diferenciação de *D. dianthicola* e *D. solani* de *Pectobacterium* spp.

4.1.1 Caracterização de *Dickeya* sp. pelo sistema BIOLOG GN2

Os 19 isolados de batata-consumo e os cinco de batata-semente com características bioquímicas e fisiológicas de *Dickeya* sp. foram caracterizados pelo sistema BIOLOG GN2. Alguns isolados (C103, C104, C105 e CL149) usaram mais de 60 substratos, no entanto C70 e C111 utilizaram somente 32 e 39, respectivamente.

Dentre os 95 compostos de carbono que fazem parte do sistema, 22 foram metabolizados por todos os isolados e 18 fontes não foram utilizadas por nenhum deles. As fontes de carbono restantes foram usadas de forma variável pelos diferentes isolados (Anexo III).

O padrão de utilização de substratos do BIOLOG GN2 evidenciou uma elevada diversidade metabólica entre estes isolados. A análise de agrupamento evidenciou a

formação de sete grupos com 88,8% de similaridade (Fig. 2), sendo os grupos A e E formados por apenas um isolado; os grupos B e F, cinco isolados; o grupo C, dois isolados; o grupo D, seis isolados e o grupo G, quatro isolados. O grupo D agrupou estirpes procedentes de Minas Gerais e isoladas da cultivar Ágata; o grupo F incluiu estirpes também de Minas Gerais, mas obtidos da cultivar Taurus. Para o restante dos isolados, a distribuição nos diferentes grupos ocorreu sem correspondência com a procedência ou a cultivar.

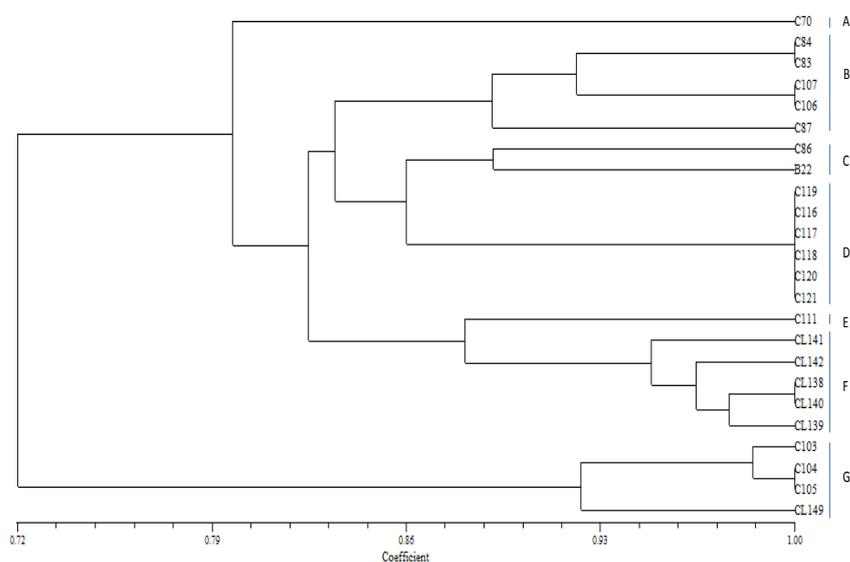


FIGURA 2. Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil metabólico de 19 isolados de batata-consumo e cinco isolados de batata-semente com características de *Dickeya* sp. utilizando-se algoritmo UPGMA e o Coeficiente de Dice. Porto Alegre, RS, 2015.

Ao se comparar a porcentagem dos 24 isolados de *Dickeya* sp. que utiliza cada fonte de carbono com a porcentagem de isolados de *Dickeya* spp. (sin. *Erwinia chrysanthemi*) que segundo a base de dados do BIOLOG mostra resultado positivo, observou-se correspondência para a maioria das fontes (Anexo III). Porém, notou-se variação em algumas que têm sido relatadas como negativas para o gênero tais como D-arabitol e sorbitol (Samson *et al.*, 2005).

A variação em testes bioquímicos tem sido frequentemente observada para *Dickeya* spp. e em geral para as pectobactérias (Slaviak *et al.*, 2009a). Palacio-Bielsa *et al.*, (2010) encontraram isolados de *Dickeya* spp. de cebola com tolerância a NaCl 5% e um isolado positivo para α -metilglicosídeo. Contudo, como indicado por Cother & Sivasithamparam (1983), algumas estirpes podem apresentar ligeiras variações nas características bioquímicas e fisiológicas em comparação com a estirpe de referência e ainda ser considerada um membro válido da espécie.

4.2 Determinação e caracterização de *Dickeya* sp. por métodos moleculares

4.2.1 PCR

Os 19 isolados de batata-consumo e os cinco de batata-semente, com características fisiológicas e bioquímicas similares a *Dickeya* produziram fragmentos de 356 e 491 pb na PCR com os oligonucleotídeos iniciadores: 1491f/ L1rA / L1rG (Fessehaie *et al.*, 2002). Além disso, amplificaram o fragmento esperado de 420 pb após PCR com os oligonucleotídeos ADE1/ADE2 (Fig.3) (Nassar *et al.*, 1996), confirmando tratarem se de estirpes de *Dickeya*.

4.2.2 Análise das sequências parciais dos genes *dnaX* e *mdh*

Para a determinação dos 19 isolados de batata-consumo e os cinco de batata-semente com características de *Dickeya* sp., o DNA de dois genes “housekeeping” (*dnaX* e *mdh*) foi sequenciado e analisado (Fig. 4-6). Sequências parciais, de aproximadamente 450 nucleotídeos foram obtidas para ambos os genes. Entretanto, as análises constaram da comparação de 316 e 331 nucleotídeos dos genes *dnaX* e *mdh*, respectivamente. O comprimento total do alinhamento para a árvore concatenada foi de 647 nucleotídeos.

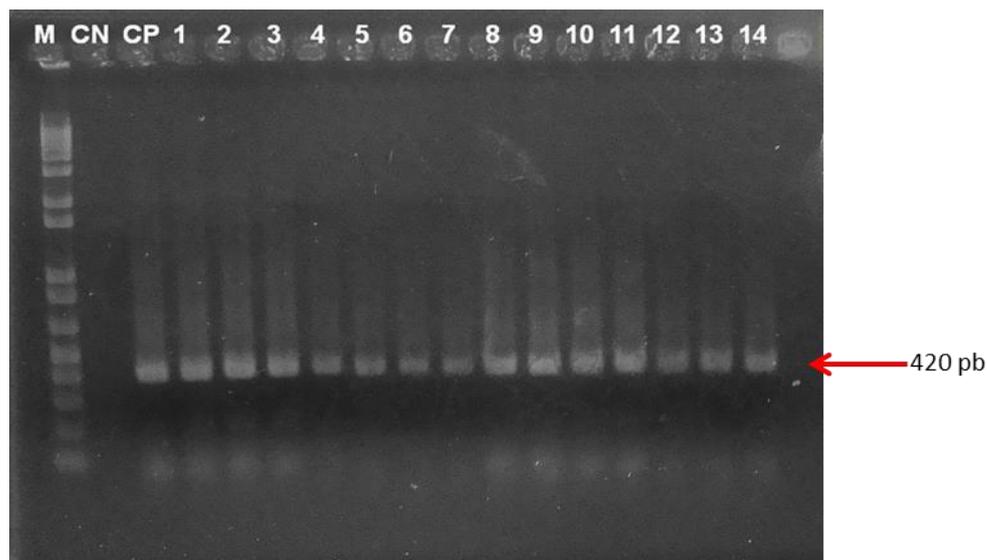


FIGURA 3. Produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) de isolados de pectobactérias com oligonucleotídeos ADE1/ADE2, específicos para *Dickeya* spp. M: marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen); CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1-14: isolados de *Dickeya* sp. Porto Alegre, RS, 2015.

Nas árvores filogenéticas dos genes independentes e concatenados foi observada uma topologia similar com uma ligeira variação na posição de *D. zea* e *D. dieffenbachiae*. Esta última espécie agrupou junto com *D. dadantii* para o gene *mdh* (Fig. 5).

A relação estreita entre *D. dadantii* e *D. dieffenbachiae* observada para o gene *mdh* tem sido relatada em trabalhos prévios baseados em análise de sequência de genes “housekeeping” (Parkinson *et al.*, 2009, Palacio-Bielsa *et al.*, 2010) e sustentam a recente reclassificação de *D. dieffenbachiae* como uma subespécie de *D. dadantii* (Brady *et al.*, 2012).

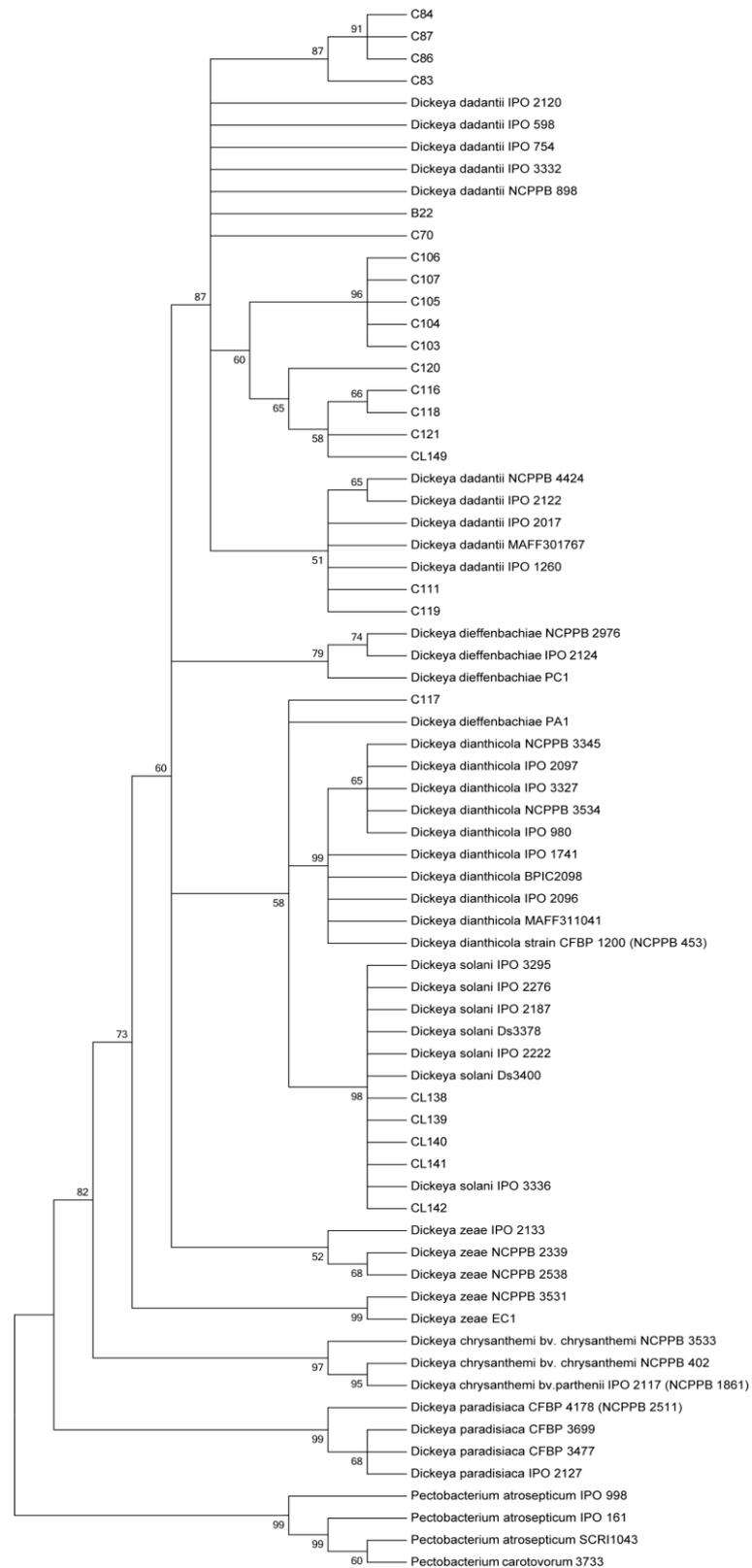


FIGURA 4. Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene *dnaX* de 19 isolados de batata-consumo e cinco isolados de batata-semente com características de *Dickeya* sp. e 43 estirpes de *Dickeya* spp. incluídas estirpes tipo e de referência. O método Neighbour Joining baseado no modelo Tamura-Nei foi utilizado e as porcentagens de *bootstrap* foram calculadas com 5000 repetições. Porto Alegre, RS, 2015.

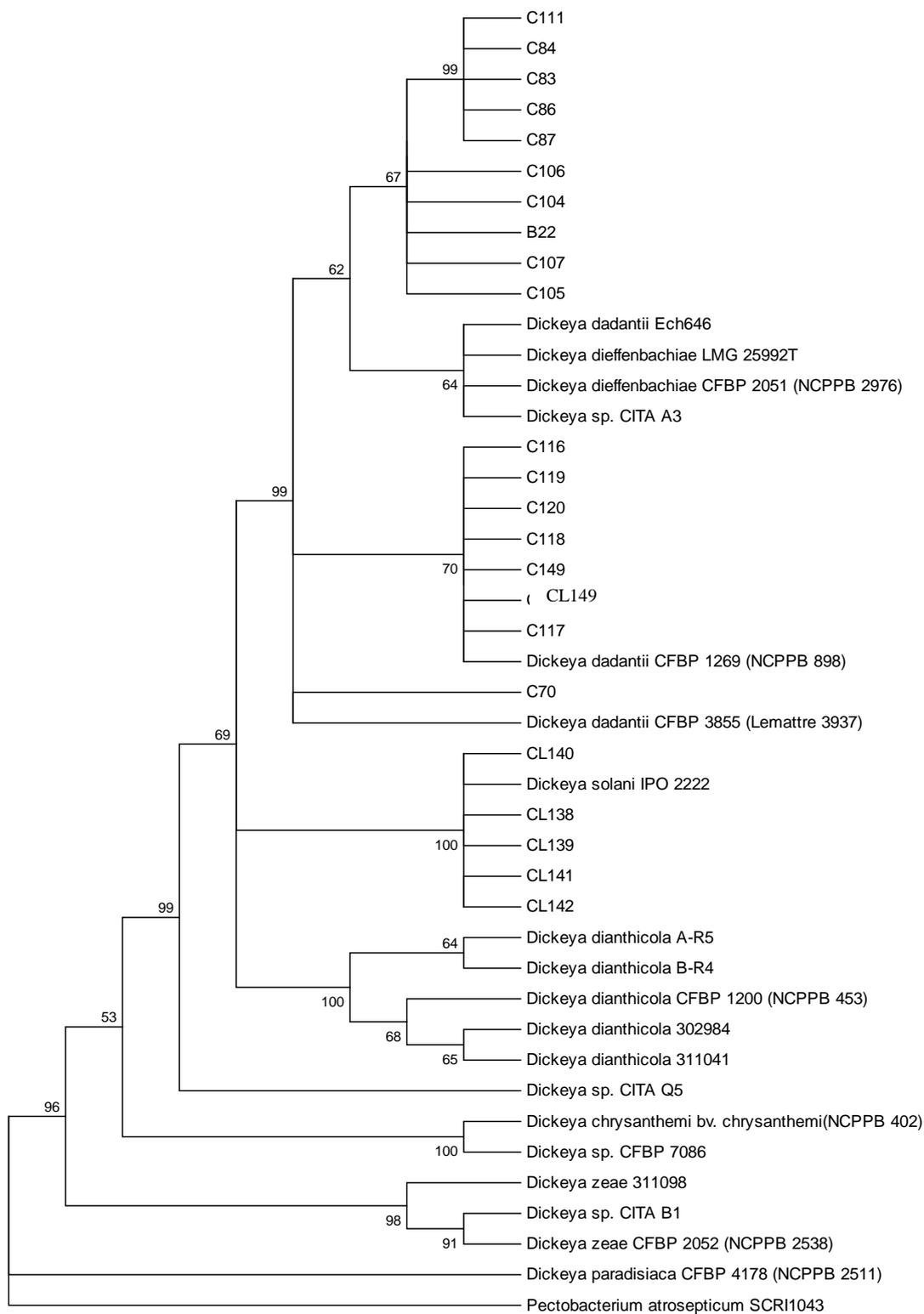


FIGURA 5. Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene *mdh* de 19 isolados de batata-consumo e cinco isolados de batata-semente com características de *Dickeya* sp. e 18 estirpes de *Dickeya* spp. incluídas estirpes tipo e de referência. O método Neighbour Joining baseado no modelo Tamura-Nei foi utilizado e as porcentagens de *bootstrap* foram calculadas com 5000 repetições. Porto Alegre, RS, 2015.

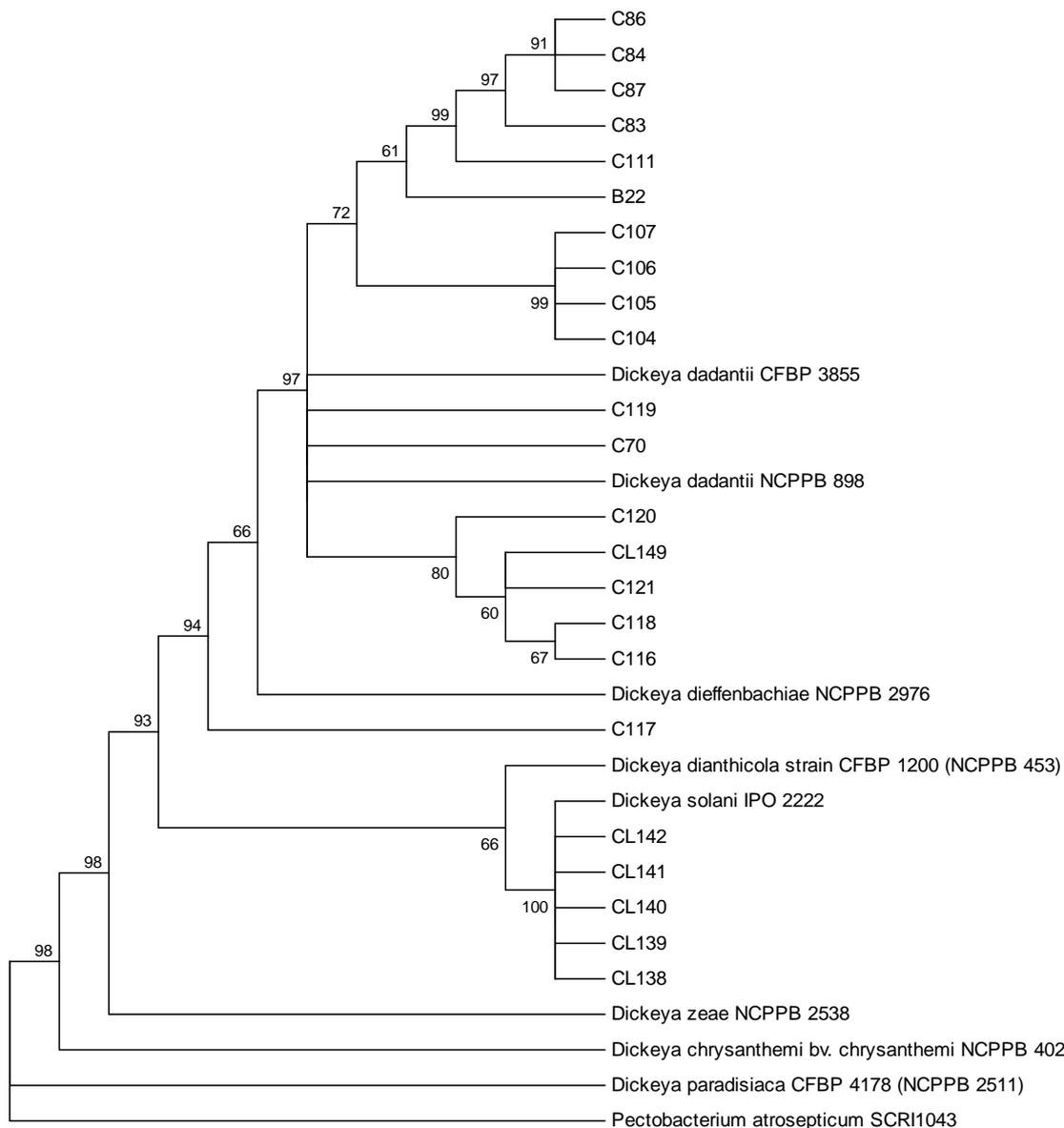


FIGURA 6. Árvore filogenética baseada em sequências parciais concatenadas dos genes *dnaX* e *mdh* de 19 isolados de batata-consumo e cinco isolados de batata-semente com características de *Dickeya* sp. e 8 estirpes de *Dickeya* spp. incluídas estirpes tipo e de referência. O método Neighbour Joining baseado no modelo Tamura- Nei foi utilizado e as porcentagens de *bootstrap* foram calculadas com 5000 repetições. Porto Alegre, RS, 2015.

Os isolados CL138, CL139, CL140, CL141 e CL142 tiveram sequências *dnaX* e *mdh* idênticas. Nas árvores pode ser observada uma elevada homogeneidade entre estes isolados e estirpes de *D. solani* incluindo a estirpe tipo *D. solani* IPO 2222; com a formação de um clado separado do resto das espécies de *Dickeya* e sustentado por altos

valores de *bootstrap* (Fig. 4-6). Isto unido aos resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos e a amplificação com oligonucleotídeos e sonda específicos (Pritchard *et al.*, 2012) permitiu confirmar esses cinco isolados como pertencentes à espécie *D. solani* (Tabela 7).

TABELA 7. Resultado da qPCR com oligonucleotídeos SOL-D e a sonda SOL-D-P para os cinco isolados de *Dickeya* sp. obtidos de batata-semente. Porto Alegre, RS, 2015.

| Isolado | qPCR <i>D. solani</i> | Ct médio |
|----------------|------------------------------|-----------------|
| CL138 | + | 21,35 |
| CL139 | + | 22,85 |
| CL140 | + | 20,27 |
| CL141 | + | 19,89 |
| CL142 | + | 20,45 |
| Ds2222 | + | 18,98 |

O isolado C117 foi similar a *D. dieffenbachiae* com identidade de sequência de 97 e 99 % para *dnaX* e *mdh*, respectivamente. Porém, devido ao resultado positivo para produção de ácido a partir de lactose, (+)-D-rafinose e (+)-D-melibiose (Anexo III) (Samson *et al.*, 2005) e à reclassificação de *D. dieffenbachiae* como subespécie de *D. dadantii* (Brady *et al.*, 2012), este isolado foi determinado como sendo *D. dadantii*. A confirmação da subespécie depende da análise de um maior número de testes incluída a análise de outros genes.

Os 18 isolados restantes agruparam junto com *D. dadantii* e mostraram heterogeneidade de sequência para os genes analisados. Nabhan *et al.* (2012), mediante MLSA com oito genes, incluído *mdh*, encontraram igualmente uma grande diversidade entre estirpes desta espécie.

Das 207 amostras coletadas, *D. dadantii* foi encontrada em nove de 85 amostras de batata-consumo e *D. solani* em cinco de 74 amostras de batata-semente nacional (Tabela 8).

Os genes *dnaX* e *mdh* foram escolhidos nesta pesquisa para a determinação dos isolados, pois tinham sido previamente utilizados com bons resultados para análises filogenéticas de enterobactérias, por encontrarem-se presentes na maioria destas e seus produtos estarem envolvidos em diversos aspectos do metabolismo bacteriano (Ma *et al.*, 2007; Slaviak *et al.*, 2009; Palacio-Bielsa *et al.*, 2010).

Análises filogenéticas com genes "housekeeping" em Enterobacteriaceae tem mostrado ser mais confiáveis que análises com rDNA 16S (Ma *et al.*, 2007; Slaviak *et al.*, 2009a). Com base na análise de sequência deste gene, Slaviak *et al.* (2009a) não conseguiram diferenciar as espécies de *Dickeya* entre 19 estirpes de referência que utilizaram. Além disso, tem sido observado que no genoma de *D. dadantii* 3937 existem ao menos sete cópias de rDNA 16S (<http://asap.ahabs.wisc.edu/asap/home.php>) com variabilidade de sequência entre eles o que poderia levar a erros nas análises (Palacio-Bielsa *et al.*, 2010). Um estudo realizado por Zeigler (2003) mostrou que o gene rDNA 16S tem pouca habilidade para predizer a relação entre genomas abaixo do nível de gênero e que o gene *dnaX* foi o melhor candidato para este fim.

TABELA 8. Amostras processadas e isolados de *Dickeya dadantii* e *D. solani* obtidos em meio CPG. Porto Alegre, RS, 2015.

| País | Estado | Procedência | Tipo de batata* | Total amostras | Nº amostras positivas | Nº de isolados | |
|--------------|-------------|------------------------|-----------------|----------------|-----------------------|--------------------|------------------|
| | | | | | | <i>D. dadantii</i> | <i>D. solani</i> |
| Brasil | RS | Ibiraiaras | S | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | | “ | C | 4 | 1 | 1 | 0 |
| | | Porto Alegre | C | 16 | 1 | 1 | 0 |
| | | São Francisco de Paula | C | 8 | 3 | 9 | 0 |
| | | Bom Jesus | C | 9 | 1 | 1 | 0 |
| | MG | Pouso Alegre | S | 26 | 0 | 0 | 0 |
| | | Várzea da Palma | S | 5** | 5** | 0 | 5 |
| | | Paracatu | C | 2** | 0 | 0 | 0 |
| | | Belo-Horizonte | C | 3 | 2 | 6 | 0 |
| | GO | Cristalina | C | 12(5**) | 1** | 1 | 0 |
| | BA | Mucugé | C | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | | Ibicoara | C | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | SP | NI | C | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | | Itapetininga | C | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | | Paranapanema | C | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | Tacuarivai | C | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | Vargem Grande do Sul | C | 3** | 0 | 0 | 0 |
| | PR | NI | C | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | | Contenda | C | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | | Guarapuava | C | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Ponta Grossa | | C | 2 | 0 | 0 | 0 | |
| SC | São Joaquim | S | 30 | 0 | 0 | 0 | |
| DF | PAD-DF | S | 10** | 0 | 0 | 0 | |
| Chile | NI | NI | S | 48 | 0 | 0 | 0 |
| Total | | | - | 207 | 14 | 19 | 5 |

*C: batata-consumo, S: batata-semente; **amostras de plantas com canela-preta; NI: não identificado; PAD-DF: Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal.

4.3 Virulência de *Dickeya dadantii* e *D. solani*

Quando tubérculos das cultivares Ágata e Asterix foram inoculados, não houve diferença significativa na virulência entre *D. dadantii* e *D. solani*, mas maceraram mais a 35 do que a 28 °C, sendo a cv. Ágata mais suscetível (Fig. 7).

Dickeya dadantii macerou 7,7 g de tecido na cv. Ágata a 28 °C quando comparada a *D. solani* que macerou 9,3 g. A 35 °C, *D. dadantii* e *D. solani* maceraram 23,2 e 23,5 g, respectivamente. Na cv. Asterix, a 28 °C *D. dadantii* macerou em média 5,9 g e *D. solani* 5,6 g. Estes valores foram superiores a 35 °C, 17,4 e 16,1 g para *D. dadantii* e *D. solani* respectivamente. Não houve maceração nos tubérculos controle.

De acordo com Toth *et al.* (2011) existe grande variabilidade na virulência entre *Dickeya* spp. Neste sentido, estudos realizados em casa de vegetação e em regiões de altas temperaturas em Israel demonstraram que *D. solani* é mais virulenta que *D. dianthicola* nessas condições (Laurila *et al.*, 2008; Tsrer *et al.*, 2009).

Neste estudo, *D. dadantii* e *D. solani* não mostraram diferença significativa na virulência. Até o momento, tem escassos trabalhos onde a virulência destas duas espécies seja comparada. A maioria das pesquisas compara a virulência de *D. solani*, *D. dianthicola* e *P. atrosepticum*, isto porque a emergência de *D. solani* foi relatada na Europa e até o ano 2000, *D. dianthicola* e *P. atrosepticum* eram os patógenos responsáveis pela maioria dos surtos de canela-preta naquele continente (Lojkowska *et al.*, 2010).

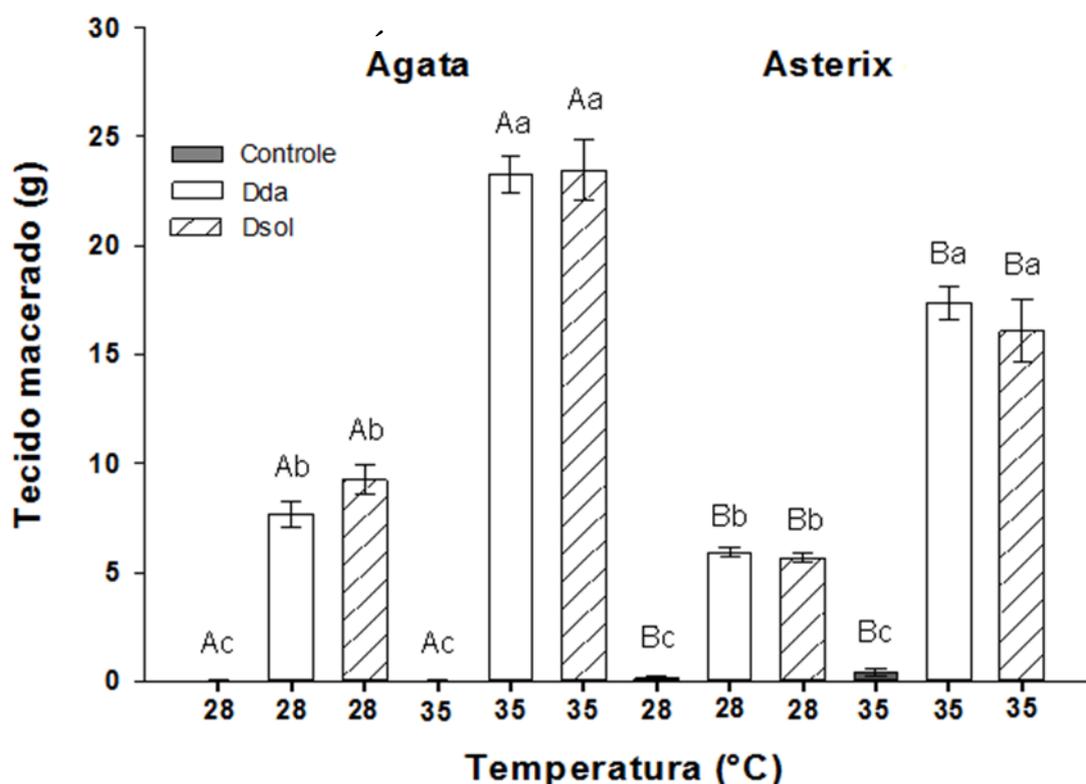


FIGURA 7. Virulência de isolados de *Dickeya dadantii* (Dda) e de *D. solani* (Dsol) em tubérculos das cultivares Ágata e Asterix a 28 e 35 °C. As colunas representam a média do peso de tecido macerado. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), letras maiúsculas entre variedades e minúsculas entre temperaturas. As barras de erro indicam o erro padrão. O controle negativo consistiu de tubérculos inoculados com água destilada esterilizada. Porto Alegre, RS, 2015.

Nesta pesquisa, observou-se que a maior maceração dos tecidos ocorreu a 35 °C para ambas as espécies nas duas cultivares. Segundo diferentes autores, a virulência de estirpes de *Dickeya* parece ter relação com a temperatura (Toth *et al.*, 2011). Isto porque a virulência destas bactérias tem sido associada com a produção de grandes quantidades de enzimas pectolíticas e a temperatura é um dos fatores que podem afetar a produção das mesmas (Pérombelon & Kelman, 1980).

As cultivares Ágata e Asterix estão entre as mais plantadas no Brasil, representando 55 e 12% do total. Assim, faz-se importante conhecer seu comportamento frente à infecção por *Dickeya* spp. Os resultados obtidos nesta

pesquisa são consistentes com o relatado na literatura que classificam a cv. Ágata como altamente suscetível à podridão-mole e canela-preta e à cv. Asterix como menos suscetível (Benelli *et al.*, 2004; Siqueira, 2012).

4.4 Detecção de *Dickeya* spp. em amostras de batata armazenadas em cartões FTA

A detecção de *D. zea* e *D. dadantii* nas amostras coletadas e armazenadas em cartões FTA não foi possível, pois as sondas disponíveis (Van der Wolf *et al.*, 2014b) não foram específicas.

4.4.1 Construção das curvas-padrão da qPCR

As curvas-padrão foram obtidas representando o logaritmo da concentração de DNA das diluições seriadas em relação aos respectivos valores de Ct (Anexos IV-VI).

A eficiência da qPCR para a detecção de *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani* em amostras armazenadas em FTA foi 110, 100 e 98%, respectivamente. Estes valores encontram-se dentro do intervalo recomendável (90 - 110%), confirmando que na fase exponencial da reação ocorre a duplicação, a cada ciclo, dos produtos de PCR formados (Applied Biosystems, 2014).

A eficiência calculada pelo método da curva padrão assume que eficiências de amplificação entre diluições de DNA com concentrações conhecidas e amostras com concentrações desconhecidas sejam as mesmas (Raymaekers *et al.*, 2009). Este resultado indicou que as reações com os oligonucleotídeos e sondas (SOL-D e SOL-D-P; DIA-C e DIA-C-P e DCH e DCH-P) são eficientes na detecção da sequência alvo a partir das amostras coletadas.

O valor obtido para o coeficiente de determinação em todos os casos encontrou-se dentro do intervalo $0,99 \leq R^2 \leq 0,999$ (Raymaekers *et al.*, 2009) o que

confere uma boa confiabilidade na correlação entre os valores de Ct e a concentração de DNA nas amostras.

4.4.2 Detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani* por qPCR com sonda TaqMan®

A especificidade dos oligonucleotídeos e sondas para a detecção de *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani* (Pritchard *et al.*, 2012; Van der Wolf *et al.*, 2014b) foi verificada com estirpes tipo e de referência de todas as espécies de *Dickeya* e com estirpes de *Pectobacterium spp.*, *Ralstonia solanacearum* e *Bacillus subtilis*. Amplificação foi observada somente com a bactéria alvo confirmando sua especificidade (Tabela 9).

TABELA 9. Espécies e estirpes utilizadas para avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos/sondas para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Espécies/Estirpes | qPCR | qPCR | qPCR |
|---|------|------|------|
| | Dch | Ddia | Dsol |
| <i>D. chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i> NCPPB 402 * ^T | + | - | - |
| <i>D. chrysanthemi</i> bv. <i>parthenii</i> NCPPB 516 ^T | + | - | - |
| <i>D. dadantii</i> NCPPB 898 * ^T | - | - | - |
| <i>D. dianthicola</i> NCPPB 453 * ^T | - | + | - |
| <i>D. dianthicola</i> NCPPB 3534 * | - | + | - |
| <i>D. dieffenbachiae</i> NCPPB 2976 * ^T | - | - | - |
| <i>D. paradisiaca</i> NCPPB 2511 * ^T | - | - | - |
| <i>D. zea</i> NCPPB 2538 * ^T | - | - | - |
| <i>D. solani</i> 2222 * ^T | - | - | + |
| <i>D. chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i> IBSBF 231 ^T | - | - | - |
| <i>Pectobacterium atrosepticum</i> IBSBF 790 ^T | - | - | - |
| <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> IBSBF 791 ^T | - | - | - |
| <i>P. brasiliensis</i> IBSBF 1692 ^T | - | - | - |
| <i>P. brasiliensis</i> IBSBF 1697 | - | - | - |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> 93 (bv 1) | - | - | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> IBSBF 760 | - | - | - |

* -DNAg; ^T estirpe tipo; Dsol: *D. solani*; Ddia: *D. dianthicola*; Dch: *D. chrysanthemi*

Para *D. chrysanthemi* o desvio padrão de três replicatas de reação por amostra, variou de 0,05 a 0,42 para o DNA padrão, com limite de detecção de 24 células bacterianas com $C_t > 31,64$ (Tabela 10). A bactéria não foi detectada nas amostras analisadas.

O desvio padrão da qPCR, para a detecção de *D. dianthicola*, variou de 0,05 a 0,27 para o DNA padrão e as amostras coletadas (Tabelas 11 e 12). O limite de detecção foi 245 células bacterianas com $C_t = 37,81$ (Tabela 11). As amostras coletadas que tiveram valor de $C_t > 37,81$ não foram consideradas positivas.

TABELA 10. Quantidade de DNA de *Dickeya chrysanthemi* empregada na curva de calibração e número de células detectadas por qPCR. Porto Alegre, RS, 2015.

| Quantidade DNA (ng/ μ l) | Média C_T | Desvio Padrão C_T | N ^o células detectadas |
|------------------------------|-------------|---------------------|-----------------------------------|
| 125 | 13,17 | 0,06 | 24461 839 |
| 12,5 | 15,98 | 0,05 | 2446183 |
| 1,25 | 18,28 | 0,07 | 244618 |
| 0,125 | 21,97 | 0,06 | 24461 |
| 0,0125 | 25,14 | 0,27 | 2446 |
| 0,00125 | 28,38 | 0,32 | 244 |
| 0,000125 | 31,64 | 0,42 | 24 |

De 386 amostras analisadas, *D. dianthicola* foi detectada em nove amostras (2,33%) coletadas entre 2010 e 2013, sete de batata-consumo e duas de batata-semente nacional (Tabela 11). As mesmas apresentaram de 704 até 141.533 células e procederam de vários estados: Bahia (2), Goiás (2), Minas Gerais (1), Paraná (1), Rio Grande do Sul (2) e Santa Catarina (1).

TABELA 11. Quantidade de DNA de *Dickeya dianthicola* empregada na curva de calibração e número de células detectadas por qPCR. Porto Alegre, RS, 2015.

| Quantidade DNA (ng/μl) | Média C _T | Desvio Padrão C _T | Nº células detectadas |
|------------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|
| 125 | 21,71 | 0,07 | 24557956 |
| 12,5 | 24,34 | 0,18 | 2455795 |
| 1,25 | 27,64 | 0,12 | 245579 |
| 0,125 | 31,75 | 0,16 | 24557 |
| 0,0125 | 34,70 | 0,18 | 2455 |
| 0,00125 | 37,81 | 0,22 | 245 |

TABELA 12. Detecção de *Dickeya dianthicola* por qPCR com os oligonucleotídeos DIA-C e a sonda DIA-C-P. Porto Alegre, RS, 2015.

| Amostra | Média C _T | Desvio Padrão C _T | Nº células | qPCR <i>D. dianthicola</i> |
|------------|----------------------|------------------------------|---------------|----------------------------|
| 1 MG-122 | 36,39 | 0,25 | 704 | + |
| 2 7611 | 34,46 | 0,27 | 2708 | + |
| 3 G-3 | 32,93 | 0,18 | 7876 | + |
| 4 CEASA 23 | 28,79 | 0,07 | 141533 | + |
| 5 CEASA36 | 35,2 | 0,20 | 1615 | + |
| 6 BA-2 | 34,59 | 0,19 | 2473 | + |
| 7 H-4 | 31,24 | 0,10 | 25611 | + |
| 8 Cris-2 | 29,81 | 0,05 | 69465 | + |
| 9 Cris-3 | 34,45 | 0,19 | 2727 | + |

A precisão da qPCR para *D. solani* variou de 0,04 a 0,66 para o DNA padrão e as amostras coletadas (Tabelas 13 e 14). O limite de detecção foi 23 células bacterianas com um Ct de 32,42 (Tabela 13). As amostras que apresentaram valor de Ct > 32,42 não foram consideradas positivas.

TABELA 13. Quantidade de DNA de *Dickeya solani* empregada na curva de calibração e número de células detectadas por qPCR. Porto Alegre, RS, 2015.

| Quantidade DNA (ng/μl) | Média C _T | Desvio Padrão C _T | Nº células detectadas |
|------------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|
| 125 | 11,67 | 0,14 | 23452157 |
| 12,5 | 15,45 | 0,08 | 2345215 |
| 1,25 | 18,28 | 0,14 | 234521 |
| 0,125 | 21,64 | 0,20 | 23452 |
| 0,0125 | 24,22 | 0,24 | 2345 |
| 0,00125 | 28,38 | 0,26 | 234 |
| 0,000125 | 32,42 | 0,20 | 23 |

Das 386 amostras, 45 (11,7%) resultaram positivas para *D. solani* e possuíam entre 24 e 4014 células nos tecidos dos tubérculos (Tabela 14), sendo quatro amostras do Chile e 41 nacionais. Dentre as nacionais, 16 foram coletadas nos anos de 2007 a 2009 (nove batata-semente e sete consumo) e 25 foram coletadas de 2010 a 2013 (15 batata-semente e 10 consumo). O patógeno foi detectado em amostras procedentes de Goiás (1), Minas Gerais (23), Paraná (3), Rio Grande do Sul (10), Santa Catarina (3) e São Paulo (1). Na maioria desses Estados a presença da bactéria foi verificada desde o período 2007-2009. Em Goiás e São Paulo não foi verificada a presença da bactéria nesses anos devido a que não foram coletadas amostras desses locais.

Na batata-semente importada *D. solani* foi detectada apenas em quatro de 52 amostras do Chile, mas não nas duas da Holanda ou nas três da Bolívia. Este fato mostra que o Brasil tem importado batata-semente com *D. solani*, mas não há garantia que esta praga não esteja presente no país antes de seu registro na Europa.

Pesquisas permitiram comprovar que 40 células de *Dickeya* sp. por grama de casca de batata, inoculadas a vácuo em tubérculos foram suficientes para ocasionar 30 e 15% de plantas doentes na Holanda em 2005 e 2006, respectivamente (Van der Wolf *et al.*, 2007 a). Por outro lado, foi verificado que *D. solani* pode iniciar a doença a partir de níveis tão baixos como 10 células por tubérculo (Czajkowski *et al.*, 2010; Toth *et al.*, 2011). O número de células de *D. dianthicola* (entre 704 e 141.533) e *D. solani* (entre 24 e 4014) encontrado nas amostras analisadas é muito superior.

Apesar do número de células de *D. dianthicola* e *D. solani* detectado por qPCR ser elevado em algumas das amostras de tubérculos, somente *D. dadantii* foi isolada em meio de cultura a partir deste tipo de amostra. As estirpes de *D. solani* obtidas no estudo foram isoladas de amostras de plantas com sintoma de canela-preta. Uma possível explicação pode ser a existência de competição entre estes patógenos, fato

TABELA 14. Amostras positivas para *Dickeya solani* por qPCR com os oligonucleotídeos SOL-D e a sonda SOL-D-P, procedentes do Brasil e do Chile. Porto Alegre, RS, 2015.

| | Amostra | Média C _T | Desvio Padrão C _T | Nº células | qPCR <i>solani</i> | D. |
|----|---------|----------------------|---------------------------------|------------|-----------------------|----|
| 1 | MG-15 | 26,63 | 0,46 | 813 | + | |
| 2 | MG-34 | 31,04 | 0,24 | 39 | + | |
| 3 | MG-38 | 31,48 | 0,52 | 29 | + | |
| 4 | MG-39 | 31,52 | 0,55 | 28 | + | |
| 5 | MG-42 | 30,86 | 0,22 | 44 | + | |
| 6 | MG-47 | 24,30 | 0,49 | 4014 | + | |
| 7 | MG-58 | 30,74 | 0,16 | 48 | + | |
| 8 | MG-74 | 30,02 | 0,39 | 79 | + | |
| 9 | MG-113 | 28,62 | 0,08 | 207 | + | |
| 10 | MG-114 | 25,33 | 0,49 | 1981 | + | |
| 11 | MG-117 | 27,32 | 0,04 | 506 | + | |
| 12 | MG-118 | 28,64 | 0,64 | 205 | + | |
| 13 | MG-119 | 28,03 | 0,46 | 311 | + | |
| 14 | MG-120 | 31,34 | 0,37 | 32 | + | |
| 15 | MG-125 | 31,55 | 0,33 | 27 | + | |
| 16 | MG-126 | 30,87 | 0,53 | 44 | + | |
| 17 | MG-128 | 27,57 | 0,44 | 426 | + | |
| 18 | MG-130 | 30,64 | 0,25 | 52 | + | |
| 19 | MG-131 | 30,34 | 0,65 | 63 | + | |
| 20 | MG-132 | 31,65 | 0,16 | 26 | + | |
| 21 | MG-134 | 30,59 | 0,42 | 53 | + | |
| 22 | CEASA39 | 30,41 | 0,22 | 60 | + | |
| 23 | CEASA41 | 24,59 | 0,08 | 3290 | + | |
| 24 | 4642 | 26,65 | 0,49 | 802 | + | |
| 25 | 9171 | 29,40 | 0,33 | 121 | + | |
| 26 | 7611 | 24,56 | 0,25 | 3359 | + | |
| 27 | CEASA4 | 29,48 | 0,23 | 115 | + | |
| 28 | 1013 | 30,13 | 0,16 | 73 | + | |
| 29 | 1014 | 29,78 | 0,34 | 93 | + | |
| 30 | CEASA33 | 24,47 | 0,14 | 3573 | + | |
| 31 | 1012 | 27,44 | 0,40 | 466 | + | |
| 32 | 1016 | 27,69 | 0,13 | 393 | + | |
| 33 | 1006 | 28,84 | 0,56 | 178 | + | |
| 34 | 1011 | 31,76 | 0,23 | 24 | + | |
| 35 | 1019 | 26,19 | 0,28 | 1099 | + | |
| 36 | CEASA27 | 30,18 | 0,13 | 71 | + | |
| 37 | CEASA28 | 26,96 | 0,07 | 648 | + | |
| 38 | CEASA30 | 30,94 | 0,12 | 42 | + | |
| 39 | CEASA34 | 28,60 | 0,66 | 210 | + | |
| 40 | CEASA36 | 30,68 | 0,33 | 50 | + | |
| 41 | Is-1 | 31,58 | 0,23 | 27 | + | |
| 42 | 2987* | 30,18 | 0,43 | 71 | + | |
| 43 | 3509* | 27,39 | 0,52 | 483 | + | |
| 44 | 10457* | 30,88 | 0,26 | 44 | + | |
| 45 | 8382* | 30,00 | 0,05 | 80 | + | |

*procedentes do Chile

que tem sido comprovado para *D. dianthicola* e *D. solani* embora não estejam esclarecidos os fatores envolvidos. Em tubérculos inoculados com ambas as espécies, *D. solani* foi mais virulenta e na maioria dos casos resultou em maior incidência da doença e densidade populacional do que *D. dianthicola* (Czajkowski *et al.*, 2012).

Outra possível explicação para a dificuldade no isolamento pode ser a sensibilidade diferenciada destas bactérias a metabolitos antimicrobianos produzidos por bactérias antagonistas associadas aos tubérculos de batata. Czajkowski *et al.* (2011) comprovaram que *D. solani* é menos sensível que *D. dianthicola* a antagonistas isolados do estolão de tubérculos de batata o qual poderia resultar em maior competitividade e sobrevivência.

A co-infecção dos tubérculos com *Pectobacterium* spp. também pode interferir no isolamento de *Dickeya* spp. (Potrykus *et al.*, 2016). Estes autores detectaram *Dickeya* spp. em 39 amostras de plantas de batata por PCR, porém não tiveram sucesso no isolamento em meio de cultura a partir de 20 delas.

A associação de *Dickeya* spp. com outras espécies bacterianas nos tubérculos de batata tem sido relatada por diversos autores (Carvalho, 2009; Czajkowski *et al.*, 2009). Porém, segundo Czajkowski *et al.* (2012) não têm sido encontrados relatos de tubérculos naturalmente infectados com *D. solani* e *D. dianthicola*. Nesta pesquisa verificou-se que ambas as espécies podem se encontrar de forma natural infectando tubérculos (Anexo VII).

A bactéria *D. solani* é considerada uma praga capaz de causar grande prejuízo, e nos últimos anos passou a ser a causa predominante de canela-preta, murcha e podridão-mole da batata em vários países da Europa. No Brasil, até o momento, *D. solani* e *D. dianthicola* não tem registro oficial de ocorrência, mas nada garante que não estivessem presentes. A ausência de análises da batata-semente e de ferramentas

sensíveis para a detecção de populações bacterianas em baixos níveis pode ter contribuído para que essas espécies não tenham sido detectadas.

O insucesso no isolamento de estirpes de *D. dianthicola* impossibilitou sua caracterização e descredencia o registro de sua ocorrência no país, mas a detecção por qPCR é um indicativo que esta hipótese seja verdadeira.

A obtenção e caracterização de isolados de *D. solani* a partir de amostras de plantas com sintomas de canela-preta e a detecção por qPCR em batata-consumo e semente de diferentes regiões produtoras do Brasil permitem afirmar que esta praga, com restrição fitossanitária, ocorre no país há pelo menos seis anos.

A maioria dos estudos realizados no Brasil são anteriores à mudança taxonômica sofrida pela espécie *Erwinia chrysanthemi* sendo este o primeiro trabalho que objetiva discriminar as espécies de *Dickeya* que ocorrem no país.

Carvalho (2009) demonstrou que o método de qPCR aliado ao método de coleta de 10 tubérculos e de extração de DNA através dos cartões FTA, por pressão direta nos tecidos dos tubérculos, foi eficiente na detecção de *Dickeya* sp. Neste estudo, o uso de qPCR com sonda TaqMan[®] juntamente com esse método de coleta e de extração de DNA mostrou-se eficiente na detecção de *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*.

5 CONCLUSÕES

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

1. Este é o primeiro registro de *Dickeya solani* na cultura de batata no Brasil; apesar de que dados obtidos neste trabalho revelam que a bactéria está presente há pelo menos seis anos;
2. A detecção de *D. dianthicola* por qPCR indica a necessidade de novos levantamentos para confirmação de sua presença no Brasil.
3. A espécie *D. dadantii* predomina em batata, mas a *D. chrysanthemi* está ausente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAENSSENS E. M. et al. T4-Related Bacteriophage LIMEstone Isolates for the Control of Soft Rot on Potato Caused by ‘*Dickeya solani*’. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n.3, e33227, 2012.

ALICEWEB. [Base de Dados]. [Culturas]. [2015]. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em: jan. 2015.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Real-time PCR**: entendendo o Ct. Disponível em< http://www.appliedbiosystems.com.br/site/suporte_documentoção.jsp> Acesso em: jan. 2014.

BENELLI, A.I. H. et al. Reação de cultivares de batata à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.155-159, 2004.

BIOLOG. [Informações obtidas no site]. Disponível em: <<http://www.biolog.com>>. Acesso: jan. 2014.

BRADY, C. L. et al. Proposal to reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand and Schroth 1967) Hauben et al. 1999 into a new genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* comb. nov., descriptions of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* subsp. *iberica* subsp. nov. and *Lonsdalea quercina* subsp. *britannica* subsp. nov., emendation of Burkholder et al. 1953 the description of the genus *Brenneria*, reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* comb. nov., and emendation of the description of *Dickeya dadantii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.62, p.1592-1602, 2012.

BURKHOLDER W.D; MCFADDEN L.A.; DIMOCK A.W. A bacterial blight of chrysanthemums. **Phytopathology**, Saint Paul, v.43, p.522–526,1953.

CAHILL, G. et al. Recent findings from the *Dickeya* survey and monitoring programme. **Proceedings Crop Protection in Northern Britain**, Dundee, UK, p.171–176, 2010.

CARVALHO, J. **Desenvolvimento e validação de qPCR para detecção de pectobactérias e Ralstonia solanacearum em tubérculos de batata**. 2010. 168 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

CIP. **Potato facts and figures**. Disponível em:< www.cipotato.org/potato-2/>. Acesso em: 20 maio 2010.

COTHER, E. J.; SIVASITHAMPARAM, K. Erwinia: the “carotovora” group. In: PLANT bacterial diseases: a diagnostic guide. Sydney: Academic, 1983. p. 87–101

COUTO, A; GONÇALVES, R. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 382 p.

CZAJKOWSKI, R; GRABE, G.; VAN DER WOLF, J. M. Distribution of Dickeya spp. and Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum in tubers of naturally infected seed potatoes. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.125, p.263-75, 2009.

CZAJKOWSKI, R. et al. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by Pectobacterium and Dickeya species: a review. **Plant Pathology**, Oxford, v.60, n.6, p.999-1013 2011.

CZAJKOWSKI, R. et al. Virulence of ‘Dickeya solani’ and Dickeya dianthicola biovar-1 and -7 strains on potato (Solanum tuberosum). **Plant Pathology**, Oxford, 2012. (publicado on-line)

CZAJKOWSKI, R. et al. Detection, identification and differentiation of Pectobacterium and Dickeya species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. **Annals of Applied Biology**, London, v.166, n.1, p.18–38, 2015.

DE BOER S.H.; KELMAN A. Erwinia soft rot group. In: LABORATORY Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society. 2001. p. 56–57.

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

DE OLIVEIRA, C. **Avaliação agronômica e reação de clones de batata à canela-preta e podridão-mole**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2011.

DUARTE, V. et al. Characterization of atypical Erwinia carotovora strains causing blackleg of potato in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96, p. 535-545, 2004.

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

FAOSTAT: Statistical Databases. [Base de Dados]. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

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

FIGUEIRÓ, A. **Detecção de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata através de PCR qualitativa e quantitativa**. 72 f. 2008. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

GARLANT, L. **Ecology and genomics of *Dickeya solani*, a new soft rot bacterium infecting potatoes**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Helsinki, Finlândia, 2015.

GE HEALTHCARE. **FTA Cards**. 2011. Disponível em: <http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1357903115683/litdoc28984354_20130114101035.pdf>. Acesso em: Jul. 2015.

HALL, T. **BioEdit v7.0.9** [Software]. [S.l.: S.n], c1997-2007, 1999.

HUGH, R.; LEIFSON E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.66, n.1, p. 24-26, 1953.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Agrícola**. [Brasília], Jan 2015.

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

JANSE, J. Bacterial diseases that may or do emerge, with (possible) economic damage for Europe and the Mediterranean basin: notes on epidemiology, risks, prevention and management on first occurrence. **Journal of Plant Pathology**, Piza, v.94, n.4, Supplement, S4.5- S4.29, 2012.

KANDIL, A. et al. Influence of water stress and organic and inorganic fertilization on quality, storability and chemical analysis of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Journal of Applied Science Research**, Punjab, v.7, n.3, p.187-199, 2011.

KIM, H. S. et al. Phylogeny and Virulence of Naturally Occurring Type III Secretion System-Deficient Pectobacterium Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.75, n.13, p.4539-4549, 2009.

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

LAURILA, J. et al. **Characterization** of Dickeya strains isolated from potato and river water samples in Finland. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.122, p.213-225, 2008.

LAURILA, J. et al. Symptoms and yield reduction caused by Dickeya spp. strains isolated from potato and river water in Finland. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.126, p.249-262, 2010.

LEE, Y.; YU, C. A differential medium for the isolation and rapid identification of a plant soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi*. **Journal of Microbiological Methods** Amsterdam, v.64, n.2, p. 200-206, 2006.

LOJKOWSKA, E.; POTRYKUS, M.; SŁAWIAK, M. Molecular characterization and pathogenicity of Dickeya strains isolated recently from potato plants in Poland. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 12., 2010, 7–11 June, St Denis. **Proceedings of the...** St Denis, 2010.

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

MA, B. et al. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 1150-1163, 2007.

MANSFIELD J. et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.13, p.614–629, 2012.

MANTSEBO, C. et al. The epidemiology of *Pectobacterium* and *Dickeya* species and the role of calcium in postharvest soft rot infection of potato (*Solanum tuberosum*) caused by the pathogens: A review. **African Journal of Agricultural Research**, Kenia, 9 (19): 1509-1515. 2014.

MOLE, B. et al. Gluconate Metabolism Is Required for Virulence of the Soft-Rot Pathogen *Pectobacterium carotovorum*. **Molecular Plant- Microbe Interactions**, Saint Paul, v.23, n.10, p. 1335-1344, 2010.

MUTHUKRISHNAM, M. et al. Evaluation of FTA[®] cards as a laboratory and field sampling device for the detection of foot-and-mouth disease virus and serotyping by RT-PCR and realtime RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.151, p. 311-216, 2008.

NABHAN, S. et al. The use of two complementary DNA assays, AFLP and MLSA, for epidemic and phylogenetic studies of pectolytic enterobacterial strains with focus on the heterogeneous species *Pectobacterium carotovorum*. **Plant Pathology**, Oxford, 61: 498–508. 2012.

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.

NECHVATAL, J. M. et al. Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of 155 bacterial and human markers from human feces. **Journal of Microbiological Methods**, v.72, p.124-132, 2008.

OLEGÁRIO, G. Qualidade da batata-semente. **Batata Show**, Itapetininga, ano 11, n. 32, p. 52-53, 2011.

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, v. 49-53, 2003.

PALACIO-BIELSA, A.; CAMBRA, M.; LÓPEZ, M. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). **Journal of Plant Pathology**, Piza, v.91, n.2, p.249-297, 2009.

PALACIO-BIELSA, A. et al. Phenotypic diversity, host range and molecular phylogeny of *Dickeya* isolates from Spain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.127, p.311-324, 2010.

PARKINSON, N. et al. *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.64, p.2264-2266, 2014.

PARKINSON, N. et al. *Dickeya* species relatedness and clade structure determined by comparison of *recA* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.59, p. 2388-2393, 2009.

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

PEREIRA, A. S. A evolução da batata no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. 2011, Viçosa. [Anais]. Viçosa: ABH, 2011. S5701-S5710.

PÉROMBELON, 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.; VAN DER WOLF, J.M. **Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual**. 2002. (Scottish Crop Research Institute Annual Report, 10)

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

POTRYKUS, M. et al. Biodiversity of *Dickeya* spp. isolated from potato plants and water sources in temperate climate. **Plant Disease**, v.100, p. 408-417, 2016.

POWERS, E. Efficacy of the Ryu Nonstaining KOH Technique for Rapidly Determining Gram Reactions of Food-Borne and Waterborne Bacteria and Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.10, p.3756-3758, 1995.

PRITCHARD, L. et al. Detection of phytopathogens of the genus *Dickeya* using a PCR primer prediction pipeline for draft bacterial genome sequences. **Plant Pathology**, Oxford, v.62, p.587-596, 2012.

RAJENDRAM, D. et al. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v. 67, p. 582-592, 2006.

RAYMAEKERS, M. et al. Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v.23, p.145-151, 2009.

REIS, F. ¿Batata inglesa ou andina? **Batata Show**, Itapetininga, ano 5, n.13, dez., 2005.

RIBAS, A. D. **Detecção de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* em plantas de batata através de PCR com oligonucleotídeos iniciadores a partir das seqüências dos genes *pnl* e *rdg***. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ROMMEL, C. C. **Etiologia e epidemiologia de morte de flores de pereiras européias (*Pyrus communis* L.) no estado do Rio Grande do Sul**. 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

SADDLER, G. "***Dickeya solani***": a new threat to GB potato production. Disponível em:<www.potato.org.uk/media_files/events/bp2009_saddler_dickeya_final.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2010

SAMSON, R. et al. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species: *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.55, p.1415-1427, 2005.

SAS. [Software]. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc., [c2008].

SCHAAD, N.; JONES, J.B.; CHUN W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3rd ed. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society Press, 2001. 373 p.

SIQUEIRA, A. **Percloroato de ferro como sinalizador de injúrias em tubérculos de batata e caracterização de isolados de *Pectobacterium* spp.** 2012. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2012.

SLAWIAK, M.; LOJKOWSKA, E.; VAN DER WOLF, J. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. **Plant Pathology**, Oxford, v.58, p.794, 2009a.

SLAWIAK, M. et al. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.125, p.245-261, 2009.

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

TAMURA, K. et al. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Rochester, v. 30, p.2725-2729, 2013.

TOTH, I. et al. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. **Plant Pathology**, Oxford, v.60, p.385-399, 2011.

TOTH, I.; ELPHINSTONE, J.; SADDLER, G. **Onward into battle**: *Dickeya* (*Erwinia chrysanthemi*): gets the upper hand. Disponível em: <www.scri.ac.uk/scri/file/PiP/pip09_Dickeya_Toht.pdf>. Acesso em: 20 outubro 2010.

TSROR, L. et al. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.123, p.311-20, 2009.

TSROR, L. et al. First report of potato blackleg caused by a biovar 3 *Dickeya* sp. in Georgia. **New Disease Reports**, [S.l.], v.23, n.1, 2011.

TSROR, L. et al. Detection of *Dickeya* spp. latent infection in potato seed tubers using PCR or ELISA and correlation with disease incidence in commercial field crops under hotclimate conditions. **Plant Pathology**, Oxford, v.61, p.161-168, 2012.

VAN DER WOLF, J.M. et al. Serological characterization of fluorescent *Pseudomonas* strains cross-reacting with antibodies against *Erwinia chrysanthemi*. Netherlands **Journal of Plant Pathology**, v.99, p.51-60, 1993.

VAN DER WOLF, J.M. et al., Polymerase chain reaction for verification of fluorescent colonies of *Erwinia chrysanthemi* and *Pseudomonas putida* WCS358 in immunofluorescence colony staining. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.79, p.569-77, 1995.

VAN DER WOLF, J. et al. Why is *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* sp.) taking over? – the ecology of a blackleg pathogen. In: NEW and Old Pathogens of Potato in

Changing Climate. Jokionen, Finland: MTT Agrifood Research, 2007a. (Agrifood Research Working Papers no.142)

VAN DER WOLF, J.M; DE BOER, S. H. Bacterial pathogens of potato. In: VREUGDENHIL, D. (Ed.) **Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives**. Oxford, UK: Elsevier, 2007b. p.595 - 617

VAN DER WOLF, J. M. et al. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 64, p. 768-774, 2014a.

VAN DER WOLF, J. M. et al. Development and evaluation of Taqman assays for the differentiation of *Dickeya* (sub) species. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.138, p.695–709, 2014b.

VAN VAERENBERGH, J. et al. Sequence Diversity in the *Dickeya* *fliC* Gene: Phylogeny of the *Dickeya* Genus and TaqMan PCR for 'D. solani', New Biovar 3 Variant on Potato in Europe. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n.5, e35738, 2012.

WALERON, M. et al. Restriction fragment length polymorphism-based identification of '*Dickeya solani*', a new genetic clade of *Dickeya* spp. **Journal of Plant Pathology** **95**, v.3, p.609-613, 2013.

WOLF, J. B. **Applied molecular biology, beginning laboratory manual**. Disponível em: <<http://www.research.umbe.edu/~jwolf/method1.html>> Acesso em: 10 mar. 2011.

ZEIGLER, D. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.53, p.1893-1900, 2003.

7 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Amostras de tubérculos de batata-consumo e batata-semente nacional e importada, coletadas de 2007 a 2009 e de 2010 a 2013 e armazenadas em cartões FTA. Porto Alegre, RS, 2015.

| Origem | Nº amostras | | | | | | Total |
|--------------------------|----------------|-----------|-------------------------|-----------|--------------------------|-----------|------------|
| | Batata-consumo | | Batata-semente nacional | | Batata-semente importada | | |
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | |
| Minas Gerais | | | | | | | 143 |
| Bueno Brandão | - | - | 20 | - | - | - | 20 |
| Pouso Alegre | - | - | 90 | 26 | - | - | 116 |
| Serra do Salitre | - | - | 4 | - | - | - | 4 |
| Belo-Horizonte | - | 3 | - | - | - | - | 3 |
| Paraná | | | | | | | 14 |
| Contenda | 3 | 3 | - | - | - | - | 6 |
| Ponta Grossa | - | 2 | - | - | - | - | 2 |
| Guarapuava | - | 3 | - | - | - | - | 3 |
| NI | - | 3 | - | - | - | - | 3 |
| Santa Catarina | | | | | | | 55 |
| Capão Alto | - | - | 12 | - | - | - | 12 |
| Criciúma | - | - | 9 | - | - | - | 9 |
| São Joaquim | - | - | 2 | 30 | - | - | 32 |
| NI | - | - | 2 | - | - | - | 2 |
| Rio Grande do Sul | | | | | | | 93 |
| Ibiraiaras | 13 | 4 | 3 | 3 | - | - | 23 |
| São Francisco de Paula | 7 | 8 | - | - | - | - | 15 |
| São Jose dos Ausentes | 1 | - | - | - | - | - | 1 |
| Tainhas | 29 | - | - | - | - | - | 29 |
| Bom Jesus | - | 9 | - | - | - | - | 9 |
| Porto Alegre | - | 16 | - | - | - | - | 16 |
| São Paulo | | | | | | | 9 |
| Paranapanema | - | 2 | - | - | - | - | 2 |
| Itapetininga | - | 1 | - | - | - | - | 1 |
| Tacuarivai | - | 2 | - | - | - | - | 2 |
| NI | - | 4 | - | - | - | - | 4 |
| Bahia | | | | | | | 8 |
| Mucugé | - | 4 | - | - | - | - | 4 |
| Ibicoara | - | 4 | - | - | - | - | 4 |
| Goiás | | | | | | | 7 |
| Cristalina | - | 7 | - | - | - | - | 7 |
| Outros países | | | | | | | |
| Bolívia | - | - | - | - | 3 | - | 3 |
| Chile | - | - | - | - | 4 | 48 | 52 |
| Holanda | - | - | - | - | 2 | - | 2 |
| Subtotal | 53 | 75 | 142 | 59 | 9 | 48 | |
| Total | 128 | | 201 | | 57 | | 386 |

1: 2007-2009; 2: 2010-2013; NI: não identificado

APÊNDICE 2. Produção de pigmento em meio NGM e cor das colônias de *Dickeya* sp. em meio BDA. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Isolados | Pigmento em NGM | Coloração em BDA |
|-----------|-----------------|------------------------|-------------------------|
| 1 | B22 | M | Creme |
| 2 | C70 | M | Creme |
| 3 | C83 | M | Creme |
| 4 | C84 | M | Creme |
| 5 | C86 | M | Creme |
| 6 | C87 | M | Creme |
| 7 | C103 | A | Creme |
| 8 | C104 | A | Creme |
| 9 | C105 | A | Creme |
| 10 | C106 | A | Creme |
| 11 | C107 | A | Creme |
| 12 | C111 | M | Creme |
| 13 | C116 | A | Creme |
| 14 | C117 | A | Creme |
| 15 | C118 | A | Creme |
| 16 | C119 | A | Creme |
| 17 | C120 | A | Creme |
| 18 | C121 | A | Creme |
| 19 | CL138 | M | Amarela |
| 20 | CL139 | M | Amarela |
| 21 | CL140 | M | Amarela |
| 22 | CL141 | M | Amarela |
| 23 | CL142 | M | Amarela |
| 24 | CL149 | M | Creme |

M: marrom; A: azul

APÊNDICE 3. Perfil metabólico de isolados de *Dickeya* spp. avaliado em microplacas BIOLOG GN2. Porto Alegre, RS, 2015.

| Fonte de carbono | Isolados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | % | Ech |
|------------------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|-----|-----|
| | C70 | C83 | C84 | C86 | C87 | C103 | C104 | C105 | C106 | C107 | C111 | B22 | C116 | C117 | C118 | C119 | C120 | C121 | CL138 | CL139 | CL140 | CL141 | CL142 | CL149 | | | |
| A2 | α -Cyclodextrin | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| A3 | Dextrin | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | 71 | 4 |
| A4 | Glycogen | - | + | + | - | + | - | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 38 | 0 |
| A5 | Tween 40 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 33 | 0 |
| A6 | Tween 80 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 42 | 2 |
| A7 | N-Acetyl-D-galactosamine | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 4 | 0 |
| A8 | N-Acetyl-D-glucosamine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 78 |
| A9 | Adonitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| A10 | L-Arabinose | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 96 | 44 |
| A11 | D-Arabitol | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 8 | 0 |
| A12 | Celobiose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 8 |
| B1 | meso-Erythritol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| B2 | D-Fructose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 94 |
| B3 | L-Fucose | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 17 | 0 |
| B4 | D-Galactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 66 |
| B5 | Gentiobiose | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | 71 | 9 |
| B6 | α -D-Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 90 |
| B7 | meso-Inositol | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | 96 | 35 |
| B8 | α -D-Lactose | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | 83 | 4 |
| B9 | Lactulose | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | 29 | 0 |
| B10 | Maltose | - | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 29 | 0 |
| B11 | D-Manitol | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 92 |
| B12 | D-Manose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 97 |

continuação APÊNDICE 3. Perfil metabólico de isolados de *Dickeya* spp. avaliado em microplacas BIOLOG GN2. Porto Alegre, RS,2015.

| Fonte de carbono | Isolados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | % | Ech |
|------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|
| | C70 | C83 | C84 | C86 | C87 | C103 | C104 | C105 | C106 | C107 | C111 | B22 | C116 | C117 | C118 | C119 | C120 | C121 | CL138 | CL139 | CL140 | CL141 | CL142 | CL149 | | |
| C1 | D-Melibiose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | 96 | 76 |
| C2 | β -Methyl-D-glucoside | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 72 |
| C3 | D-Psicose | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 96 | 56 | |
| C4 | D-Raffinose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 96 | 41 | |
| C5 | L-Rhamnose | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | 50 | 2 | |
| C6 | D-Sorbitol | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | + | 46 | 0 | |
| C7 | Sucrose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | 96 | 88 | |
| C8 | D-Trehalose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 42 | 0 | |
| C9 | Turanose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 4 | |
| C10 | Xylitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 | |
| C11 | Methyl-pyruvate | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 81 | |
| C12 | Mono-methyl-succinate | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 17 | |
| D1 | Acetic acid | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | 75 | 4 | |
| D2 | cis-Aconitic acid | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | 71 | 11 | |
| D3 | Citric acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 96 | 47 | |
| D4 | Formic acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 30 | |
| D5 | D-Galactonic acid lactone | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | 33 | 1 | |
| D6 | D-Galacturonic acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 54 | |
| D7 | D-Gluconic acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 39 | |
| D8 | D-Glucosaminic acid | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 17 | 2 | |
| D9 | D-Glucuronic acid | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 75 | 4 | |
| D10 | α -Hydroxybutyric acid | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 29 | 2 | |
| D11 | β -Hydroxybutyric acid | - | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 21 | 0 | |
| D12 | γ -Hydroxybutyric acid | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 | |

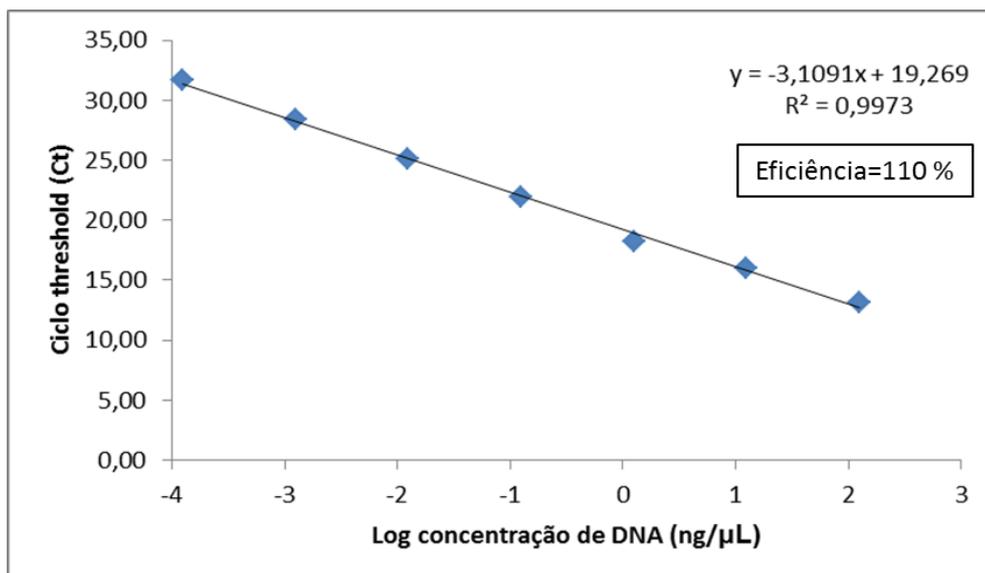
continuação APÊNDICE 3. Perfil metabólico de isolados de *Dickeya* spp. avaliado em microplacas BIOLOG GN2. Porto Alegre, RS, 2015.

| Fonte de carbono | Isolados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | % | Ech |
|------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|
| | C70 | C83 | C84 | C86 | C87 | C103 | C104 | C105 | C106 | C107 | C111 | B22 | C116 | C117 | C118 | C119 | C120 | C121 | CL138 | CL139 | CL140 | CL141 | CL142 | CL149 | | |
| E1 | p-Hydroxyphenylacetic acid | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| E2 | Itaconic acid | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 1 |
| E3 | α-Ketobutyric acid | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 21 | 1 |
| E4 | α-Ketoglutaric acid | - | + | + | - | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 21 | 0 |
| E5 | α-Ketovaleric acid | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| E6 | DL-Lactic acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | + | + | 71 | 9 |
| E7 | Malonic acid | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | 75 | 3 |
| E8 | Propionic acid | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 17 | 0 |
| E9 | Quinic acid | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| E10 | D-Saccharic acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 32 |
| E11 | Sebacic acid | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| E12 | Succinic acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 44 |
| F1 | Bromosuccinic acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 95 |
| F2 | Succinamic acid | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | 79 | 9 |
| F3 | Glucuronamide | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | 42 | 2 |
| F4 | Alaninamide | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | 63 | 0 |
| F5 | D-Alanine | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 17 | 0 |
| F6 | L-Alanine | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 17 | 0 |
| F7 | L-Alanylglycine | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 17 | 0 |
| F8 | L-Asparagine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 55 |
| F9 | L-aspartic acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 59 |
| F10 | L-Glutamic acid | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | 50 | 2 |
| F11 | Glycyl-L-aspartic acid | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | 42 | 0 |
| F12 | Glycyl-L-glutamic acid | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 17 | 0 |

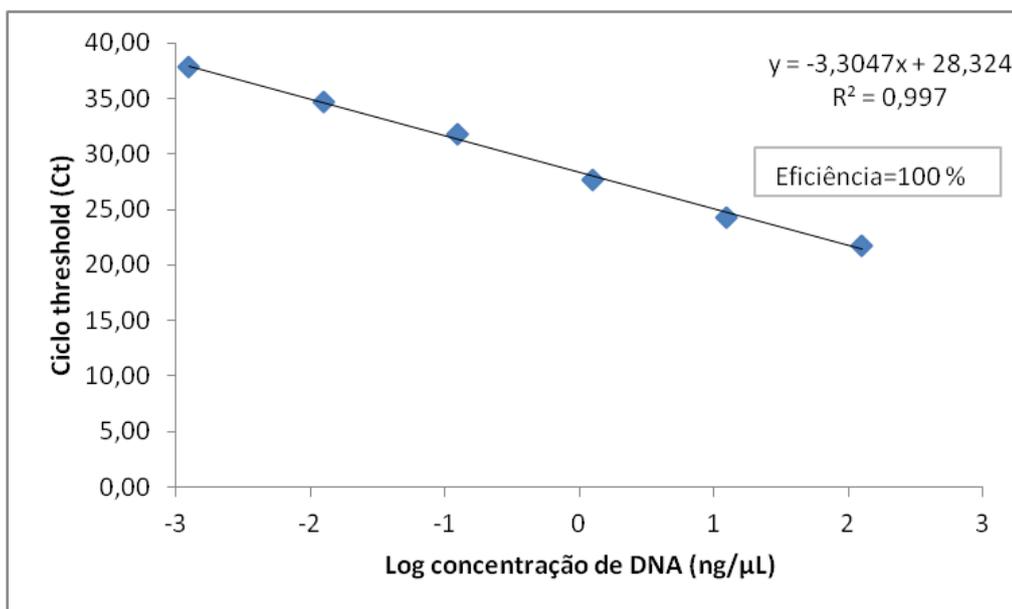
continuação APÊNDICE 3. Perfil metabólico de isolados de *Dickeya* spp. avaliado em microplacas BIOLOG GN2. Porto Alegre, RS, 2015.

| Fonte de carbono | Isolados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | % | Ech |
|------------------|-------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|
| | C70 | C83 | C84 | C86 | C87 | C103 | C104 | C105 | C106 | C107 | C111 | B22 | C116 | C117 | C118 | C119 | C120 | C121 | Cl138 | Cl139 | Cl140 | Cl141 | Cl142 | Cl149 | | |
| G1 | L-Histidine | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 17 | 0 |
| G2 | Hydroxy-L-proline | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| G3 | L-Leucine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| G4 | L-Ornithine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 4 | 0 |
| G5 | L-Phenylalanine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| G6 | L-Proline | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 4 | 0 |
| G7 | L-Pyrogutamic acid | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| G8 | D-Serine | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 17 | 0 |
| G9 | L-Serine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 36 |
| G10 | L-Threonine | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 17 | 0 |
| G11 | DL-Carnitine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | + | - | 17 | 0 |
| G12 | γ-Aminobutyric acid | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 4 | 0 |
| H1 | Urocanic acid | - | - | - | + | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | 50 | 0 |
| H2 | Inosine | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 88 | 0 |
| H3 | Uridine | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 88 | 5 |
| H4 | Thymidine | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | 63 | 5 |
| H5 | Phenyl ethylamine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| H6 | Putrescine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| H7 | 2-Aminoethan | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | - | + | 29 | 0 |
| H8 | 2,3-Butanediol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| H9 | Glycerol | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 83 | 90 |
| H10 | D,L-α-Glycerolphosphate | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 73 |
| H11 | Glucose 1-phosphate | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 23 |
| H12 | Glucose 6-phosphate | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 81 |

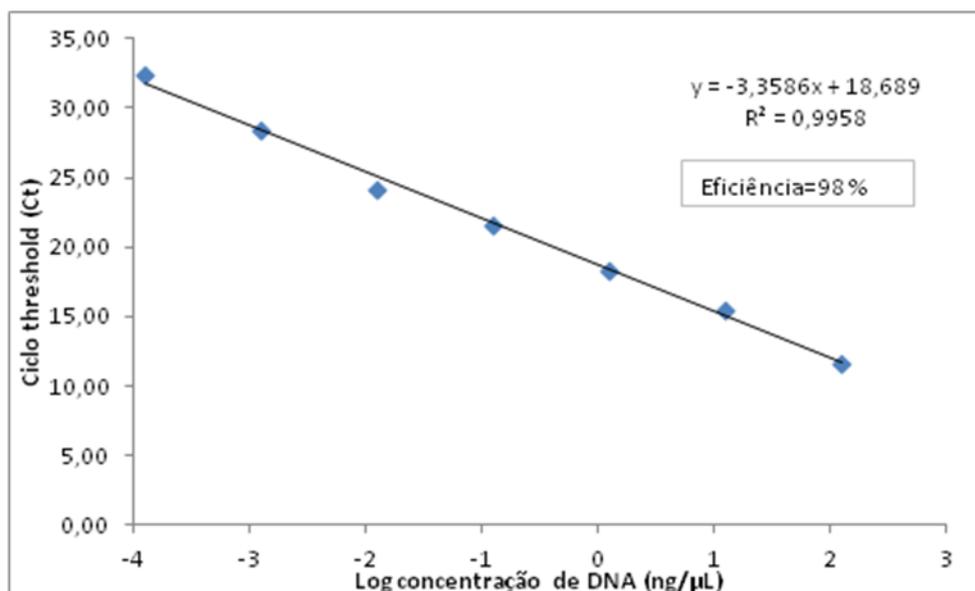
%- Porcentagem de isolados positivos. Ech- Porcentagem de estirpes de *Erwinia chrysanthemi* positivos segundo base de dados do sistema BIOLOG



APÊNDICE 4. Curva-padrão da concentração de DNA (ng/μL) de *Dickeya chrysanthemi* vs. ciclo threshold (Ct). Os valores de Ct em cada ponto correspondem à média dos valores obtidos em triplicatas das reações. A equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) são apresentados assim como a eficiência da reação. Porto Alegre, RS, 2015.



APÊNDICE 5. Curva-padrão da concentração de DNA (ng/μL) de *Dickeya dianthicola* vs. ciclo threshold (Ct). Os valores de Ct em cada ponto correspondem à média dos valores obtidos em triplicatas das reações. A equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) são apresentados assim como a eficiência da reação. Porto Alegre, RS, 2015.



APÊNDICE 6. Curva-padrão da concentração de DNA (ng/μL) de *Dickeya solani* vs. ciclo threshold (Ct). Os valores de Ct em cada ponto correspondem à média dos valores obtidos em triplicatas das reações. A equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) são apresentados assim como a eficiência da reação. Porto Alegre, RS, 2015.

APÊNDICE 7. Amostras de batata positivas para *Dickeya dianthicola* e/ou *D. solani*.
Porto Alegre, RS, 2015.

| | Amostra | <i>D. dianthicola</i> | <i>D. solani</i> |
|----|----------------|-----------------------|------------------|
| 1 | MG-15 | - | + |
| 2 | MG-34 | - | + |
| 3 | MG-38 | - | + |
| 4 | MG-39 | - | + |
| 5 | MG-42 | - | + |
| 6 | MG-47 | - | + |
| 7 | MG-58 | - | + |
| 8 | MG-74 | - | + |
| 9 | MG-113 | - | + |
| 10 | MG-114 | - | + |
| 11 | MG-117 | - | + |
| 12 | MG-118 | - | + |
| 13 | MG-119 | - | + |
| 14 | MG-120 | - | + |
| 15 | MG-122 | + | - |
| 16 | MG-125 | - | + |
| 17 | MG-126 | - | + |
| 18 | MG-128 | - | + |
| 19 | MG-130 | - | + |
| 20 | MG-131 | - | + |
| 21 | MG-132 | - | + |
| 22 | MG-134 | - | + |
| 23 | CEASA39 | - | + |
| 24 | CEASA40 | - | - |
| 25 | CEASA41 | - | + |
| 26 | 4642 | - | + |
| 27 | 9171 | - | + |
| 28 | 7611 | + | + |
| 29 | CEASA4 | - | + |
| 30 | 1013 | - | + |
| 31 | 1014 | - | + |
| 32 | CEASA23 | + | - |
| 33 | CEASA33 | - | + |
| 34 | 1012 | - | + |
| 35 | 1016 | - | + |
| 36 | 1006 | - | + |
| 37 | 1011 | - | + |
| 38 | 1019 | - | + |
| 39 | CEASA27 | - | + |
| 40 | CEASA28 | - | + |
| 41 | CEASA30 | - | + |
| 42 | CEASA34 | - | + |
| 43 | CEASA35 | - | - |
| 44 | CEASA36 | + | + |
| 45 | CEASA37 | - | - |
| 46 | G-3 | + | - |
| 47 | BA-2 | + | - |
| 48 | H-4 | + | - |
| 49 | Cris-2 | + | - |
| 50 | Cris-3 | + | - |
| 51 | Is-1 | - | + |
| 52 | 2987* | - | + |
| 53 | 3509* | - | + |
| 54 | 10457* | - | + |
| 55 | 8382* | - | + |

*Amostras do Chile

APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|----|---------|--------|--------|---------------|----------|---------------|-----|------|------|
| 1 | MG-1 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | 2007-2009 | - | - | - |
| 2 | MG-2 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 3 | MG-3 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 4 | MG-4 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 5 | MG-5 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Voyager | ” | - | - | - |
| 6 | MG-6 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 7 | MG-7 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 8 | MG-8 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Baraka | ” | - | - | - |
| 9 | MG-9 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 10 | MG-10 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 11 | MG-11 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 12 | MG-12 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 13 | MG-13 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 14 | MG-14 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 15 | MG-15 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | + |
| 16 | MG-16 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Naturela | ” | - | - | - |
| 17 | MG-17 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Opaline | ” | - | - | - |
| 18 | MG-18 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Chipie | ” | - | - | - |
| 19 | MG-19 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Zafira | ” | - | - | - |
| 20 | MG-20 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Emeraude | ” | - | - | - |
| 21 | MG-21 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Ágata | ” | - | - | - |
| 22 | MG-22 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Ambition | ” | - | - | - |
| 23 | MG-23 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Armada | ” | - | - | - |
| 24 | MG-24 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Almera | ” | - | - | - |
| 25 | MG-25 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Sinora | ” | - | - | - |
| 26 | MG-26 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Eole | ” | - | - | - |
| 27 | MG-27 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Manitou | ” | - | - | - |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|----|---------|--------|--------|---------------|-------------|---------------|-----|------|------|
| 28 | MG-28 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Fontane | ” | - | - | - |
| 29 | MG-29 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Mustang | ” | - | - | - |
| 30 | MG-30 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Rudolf | ” | - | - | - |
| 31 | MG-31 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Faluka | ” | - | - | - |
| 32 | MG-32 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Soléia | ” | - | - | - |
| 33 | MG-33 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Colorado | ” | - | - | - |
| 34 | MG-34 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Gourmandine | ” | - | - | + |
| 35 | MG-35 | Brasil | MG | Bueno Brandão | Monalisa | ” | - | - | - |
| 36 | MG-36 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 37 | MG-37 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 38 | MG-38 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Voyager | ” | - | - | + |
| 39 | MG-39 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Baraka | ” | - | - | + |
| 40 | MG-40 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Markies | ” | - | - | - |
| 41 | MG-41 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Voyager | ” | - | - | - |
| 42 | MG-42 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | + |
| 43 | MG-43 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 44 | MG-44 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 45 | MG-45 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 46 | MG-46 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 47 | MG-47 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | + |
| 48 | MG-48 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 49 | MG-49 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 50 | MG-50 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 51 | MG-51 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 52 | MG-52 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Monalisa | ” | - | - | - |
| 53 | MG-53 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Voyager | ” | - | - | - |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|----|---------|--------|--------|--------------|----------|---------------|-----|------|------|
| 54 | MG-54 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Markies | ” | - | - | - |
| 55 | MG-55 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 56 | MG-56 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 57 | MG-57 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 58 | MG-58 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | + |
| 59 | MG-59 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 60 | MG-60 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 61 | MG-61 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 62 | MG-62 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 63 | MG-63 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 64 | MG-64 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 65 | MG-65 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 66 | MG-66 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 67 | MG-67 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Baraka | ” | - | - | - |
| 68 | MG-68 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 69 | MG-69 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 70 | MG-70 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 71 | MG-71 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 72 | MG-72 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 73 | MG-73 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 74 | MG-74 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Voyager | ” | - | - | + |
| 75 | MG-75 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 76 | MG-76 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 77 | MG-77 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 78 | MG-78 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Voyager | ” | - | - | - |
| 79 | MG-79 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|-----|---------|--------|--------|--------------|----------|---------------|-----|------|------|
| 80 | MG-80 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Monalisa | ” | - | - | - |
| 81 | MG-81 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 82 | MG-82 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 83 | MG-83 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 84 | MG-84 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Rodeo | ” | - | - | - |
| 85 | MG-85 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 86 | MG-86 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 87 | MG-87 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 88 | MG-88 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 89 | MG-89 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 90 | MG-90 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Monalisa | ” | - | - | - |
| 91 | MG-91 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 92 | MG-92 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 93 | MG-93 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 94 | MG-94 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 95 | MG-95 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 96 | MG-96 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Monalisa | ” | - | - | - |
| 97 | MG-98 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Markies | ” | - | - | - |
| 98 | MG-99 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 99 | MG-100 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 100 | MG-101 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 101 | MG-102 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | - |
| 102 | MG-103 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 103 | MG-104 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 104 | 3760 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Monalisa | ” | - | - | - |
| 105 | 3761 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|-----|---------|--------|--------|--------------|----------|---------------|-----|------|------|
| 106 | 3762 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Baraka | ” | - | - | - |
| 107 | 3763 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 108 | 3764 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Monalisa | ” | - | - | - |
| 109 | 3765 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | - |
| 110 | 3766 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 111 | MG-110 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | 2013 | - | - | - |
| 112 | MG-111 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 113 | MG-112 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Atlantic | ” | - | - | - |
| 114 | MG-113 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | + |
| 115 | MG-114 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Markies | ” | - | - | + |
| 116 | MG-115 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Monalisa | ” | - | - | - |
| 117 | MG-116 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | - |
| 118 | MG-117 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | + |
| 119 | MG-118 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | + |
| 120 | MG-119 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | + |
| 121 | MG-120 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | + |
| 122 | MG-121 | Brasil | MG | Pouso Alegre | - | ” | - | - | - |
| 123 | MG-122 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | + | + |
| 124 | MG-123 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 125 | MG-124 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 126 | MG-125 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | + |
| 127 | MG-126 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | + |
| 128 | MG-127 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 129 | MG-128 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Cupido | ” | - | - | + |
| 130 | MG-129 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 131 | MG-130 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | + |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|-----|---------|--------|--------|------------------|----------|---------------|-----|------|------|
| 132 | MG-131 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Caesar | ” | - | - | + |
| 133 | MG-132 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Asterix | ” | - | - | + |
| 134 | MG-133 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 135 | MG-134 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Ágata | ” | - | - | + |
| 136 | MG-135 | Brasil | MG | Pouso Alegre | Atlantic | ” | - | - | - |
| 137 | 4598 | Brasil | MG | Serra do Salitre | Atlantic | 2007-2009 | - | - | - |
| 138 | 4599 | Brasil | MG | Serra do Salitre | Atlantic | ” | - | - | - |
| 139 | 4600 | Brasil | MG | Serra do Salitre | Atlantic | ” | - | - | - |
| 140 | 4601 | Brasil | MG | Serra do Salitre | Atlantic | ” | - | - | - |
| 141 | CEASA39 | Brasil | MG | NI | Ágata | 2013 | - | - | + |
| 142 | CEASA40 | Brasil | MG | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 143 | CEASA41 | Brasil | MG | NI | Asterix | ” | - | - | + |
| 144 | 4632 | Brasil | SC | Capão Alto | Ágata | 2007-2009 | - | - | - |
| 145 | 4633 | Brasil | SC | Capão Alto | Asterix | ” | - | - | - |
| 146 | 4634 | Brasil | SC | Capão Alto | Monalisa | ” | - | - | - |
| 147 | 4635 | Brasil | SC | Capão Alto | Cupido | ” | - | - | - |
| 148 | 4636 | Brasil | SC | Capão Alto | Rodeo | ” | - | - | - |
| 149 | 4639 | Brasil | SC | Capão Alto | Monalisa | ” | - | - | - |
| 150 | 4640 | Brasil | SC | Capão Alto | Ágata | ” | - | - | - |
| 151 | 4641 | Brasil | SC | Capão Alto | Asterix | ” | - | - | - |
| 152 | 6255 | Brasil | SC | Capão Alto | Caesar | ” | - | - | - |
| 153 | 6256 | Brasil | SC | Capão Alto | Asterix | ” | - | - | - |
| 154 | 6257 | Brasil | SC | Capão Alto | Ágata | ” | - | - | - |
| 155 | 6258 | Brasil | SC | Capão Alto | Cupido | ” | - | - | - |
| 156 | SC1 | Brasil | SC | Criciúma | Ágata | ” | - | - | - |
| 157 | SC2 | Brasil | SC | Criciúma | Ágata | ” | - | - | - |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|-----|---------|--------|--------|-------------|----------|---------------|-----|------|------|
| 158 | SC3 | Brasil | SC | Criciúma | Ágata | ” | - | - | - |
| 159 | SC4 | Brasil | SC | Criciúma | Ágata | ” | - | - | - |
| 160 | SC5 | Brasil | SC | Criciúma | Ágata | ” | - | - | - |
| 161 | SC6 | Brasil | SC | Criciúma | Ágata | ” | - | - | - |
| 162 | SC7 | Brasil | SC | Criciúma | Ágata | ” | - | - | - |
| 163 | SC8 | Brasil | SC | Criciúma | Ágata | ” | - | - | - |
| 164 | SC9 | Brasil | SC | Criciúma | Ágata | ” | - | - | - |
| 165 | 4642 | Brasil | SC | São Joaquim | Ágata | ” | - | - | + |
| 166 | 4643 | Brasil | SC | São Joaquim | Ágata | ” | - | - | - |
| 167 | 4644 | Brasil | SC | São Joaquim | Caesar | ” | - | - | - |
| 168 | 4645 | Brasil | SC | São Joaquim | Asterix | ” | - | - | - |
| 169 | 8826 | Brasil | SC | São Joaquim | Monalisa | 2012 | - | - | - |
| 170 | 8827 | Brasil | SC | São Joaquim | Monalisa | ” | - | - | - |
| 171 | 8828 | Brasil | SC | São Joaquim | Ágata | ” | - | - | - |
| 172 | 8829 | Brasil | SC | São Joaquim | Ágata | ” | - | - | - |
| 173 | 8830 | Brasil | SC | São Joaquim | Asterix | ” | - | - | - |
| 174 | 8831 | Brasil | SC | São Joaquim | Asterix | ” | - | - | - |
| 175 | 9169 | Brasil | SC | São Joaquim | - | ” | - | - | - |
| 176 | 9170 | Brasil | SC | São Joaquim | - | ” | - | - | - |
| 177 | 9171 | Brasil | SC | São Joaquim | - | ” | - | - | + |
| 178 | 9172 | Brasil | SC | São Joaquim | - | ” | - | - | - |
| 179 | 9325 | Brasil | SC | São Joaquim | - | ” | - | - | - |
| 180 | 9326 | Brasil | SC | São Joaquim | - | ” | - | - | - |
| 181 | 11964 | Brasil | SC | São Joaquim | Asterix | ” | - | - | - |
| 182 | 11965 | Brasil | SC | São Joaquim | Ágata | ” | - | - | - |
| 183 | 321 | Brasil | SC | São Joaquim | Ágata | 2013 | - | - | - |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|-----|---------|--------|--------|--------------|----------|---------------|-----|------|------|
| 184 | 322 | Brasil | SC | São Joaquim | Asterix | ” | - | - | - |
| 185 | 323 | Brasil | SC | São Joaquim | Cupido | ” | - | - | - |
| 186 | 6253 | Brasil | SC | São Joaquim | Asterix | ” | - | - | - |
| 187 | 6254 | Brasil | SC | São Joaquim | Ágata | ” | - | - | - |
| 188 | 6255 | Brasil | SC | São Joaquim | Monalisa | ” | - | - | - |
| 189 | 7610 | Brasil | SC | São Joaquim | Ágata | ” | - | - | - |
| 190 | 7611 | Brasil | SC | São Joaquim | Monalisa | ” | - | + | + |
| 191 | 17017 | Brasil | SC | São Joaquim | Ágata | ” | - | - | - |
| 192 | 17018 | Brasil | SC | São Joaquim | Asterix | ” | - | - | - |
| 193 | 17019 | Brasil | SC | São Joaquim | Asterix | ” | - | - | - |
| 194 | 17020 | Brasil | SC | São Joaquim | Ágata | ” | - | - | - |
| 195 | 17021 | Brasil | SC | São Joaquim | Asterix | ” | - | - | - |
| 196 | 17022 | Brasil | SC | São Joaquim | Ágata | ” | - | - | - |
| 197 | 17023 | Brasil | SC | São Joaquim | Asterix | ” | - | - | - |
| 198 | 17024 | Brasil | SC | São Joaquim | Ágata | ” | - | - | - |
| 199 | CEASA1 | Brasil | SP | Tacuarivai | Ágata | 2012 | - | - | - |
| 200 | CEASA2 | Brasil | SP | Tacuarivai | Ágata | ” | - | - | - |
| 201 | CEASA3 | Brasil | SP | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 202 | CEASA4 | Brasil | SP | NI | Ágata | ” | - | - | + |
| 203 | CEASA5 | Brasil | SP | Paranapanema | Ágata | ” | - | - | - |
| 204 | CEASA6 | Brasil | SP | Paranapanema | Ágata | ” | - | - | - |
| 205 | CEASA7 | Brasil | SP | Itapetininga | Ágata | ” | - | - | - |
| 206 | CEASA8 | Brasil | SP | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 207 | CEASA13 | Brasil | SP | NI | Asterix | ” | - | - | - |
| 208 | 1013 | Brasil | PR | Contenda | Ágata | 2007-2009 | - | - | + |
| 209 | 1014 | Brasil | PR | Contenda | Asterix | ” | - | - | + |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|-----|----------|--------|--------|-----------------------|----------|---------------|-----|------|------|
| 210 | 1015 | Brasil | PR | Contenda | Ágata | ” | - | - | - |
| 211 | CEASA9 | Brasil | PR | Contenda | Ágata | 2012 | - | - | - |
| 212 | CEASA 15 | Brasil | PR | Contenda | Ágata | ” | - | - | - |
| 213 | CEASA 17 | Brasil | PR | Contenda | Ágata | ” | - | - | - |
| 214 | CEASA10 | Brasil | PR | Ponta Grossa | Ágata | ” | - | - | - |
| 215 | CEASA 16 | Brasil | PR | Ponta Grossa | Ágata | ” | - | - | - |
| 216 | CEASA11 | Brasil | PR | NI | Asterix | ” | - | - | - |
| 217 | CEASA12 | Brasil | PR | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 218 | CEASA33 | Brasil | PR | NI | Asterix | 2013 | - | - | + |
| 219 | G-1 | Brasil | PR | Guarapuava | Cupido | 2010 | - | - | - |
| 220 | G-2 | Brasil | PR | Guarapuava | Cupido | ” | - | - | - |
| 221 | G-3 | Brasil | PR | Guarapuava | Cupido | ” | - | + | - |
| 222 | 1016 | Brasil | RS | São José dos Ausentes | Ágata | 2007-2009 | - | - | + |
| 223 | 1002 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Vivaldi | ” | - | - | - |
| 224 | 1005 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Asterix | ” | - | - | - |
| 225 | 1006 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Asterix | ” | - | - | + |
| 226 | 1010 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Ágata | ” | - | - | - |
| 227 | 1011 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Asterix | ” | - | - | + |
| 228 | BOS1 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Ágata | ” | - | - | - |
| 229 | BOS2 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Ágata | ” | - | - | - |
| 230 | IBI1 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Asterix | ” | - | - | - |
| 231 | IBI2 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Asterix | ” | - | - | - |
| 232 | IBI3 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Asterix | ” | - | - | - |
| 233 | IBI4 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Ágata | ” | - | - | - |
| 234 | IBI5 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Asterix | ” | - | - | - |
| 235 | IBI6 | Brasil | RS | Ibiraíaras | Asterix | ” | - | - | - |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|-----|----------|--------|--------|------------|----------|---------------|-----|------|------|
| 236 | IBI7 | Brasil | RS | Ibiraiaras | Ágata | ” | - | - | - |
| 237 | IBI8 | Brasil | RS | Ibiraiaras | Asterix | ” | - | - | - |
| 238 | IBI9 | Brasil | RS | Ibiraiaras | Ágata | ” | - | - | - |
| 239 | CEASA14 | Brasil | RS | Ibiraiaras | Asterix | 2012 | - | - | - |
| 240 | CEASA 18 | Brasil | RS | Ibiraiaras | Asterix | ” | - | - | - |
| 241 | CEASA 21 | Brasil | RS | Ibiraiaras | Asterix | 2013 | - | - | - |
| 242 | CEASA 35 | Brasil | RS | Ibiraiaras | Ágata | ” | - | - | - |
| 243 | A104 | Brasil | RS | Ibiraiaras | Markies | ” | - | - | - |
| 244 | A105 | Brasil | RS | Ibiraiaras | Atlantic | ” | - | - | - |
| 245 | A106 | Brasil | RS | Ibiraiaras | Asterix | ” | - | - | - |
| 246 | 1004 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | 2007-2009 | - | - | - |
| 247 | 1008 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 248 | 1009 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 249 | 1017 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 250 | 1018 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 251 | 1019 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | + |
| 252 | 1020 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 253 | 1021 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 254 | 1022 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 255 | 1023 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 256 | 1024 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 257 | 1025 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 258 | 1026 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 259 | 1027 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 260 | 1028 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 261 | 1029 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|-----|----------|--------|--------|------------------------|----------|---------------|-----|------|------|
| 262 | 1030 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 263 | 1031 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 264 | 1032 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 265 | 1033 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 266 | 1034 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 267 | 1035 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 268 | 1036 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 269 | 1037 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 270 | 1038 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 271 | 1039 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 272 | 1040 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 273 | 1041 | Brasil | RS | Tainhas | Ágata | ” | - | - | - |
| 274 | 1042 | Brasil | RS | Tainhas | Asterix | ” | - | - | - |
| 275 | CEASA 20 | Brasil | RS | Bom Jesus | Ágata | 2013 | - | - | - |
| 276 | CEASA 22 | Brasil | RS | Bom Jesus | Ágata | ” | - | - | - |
| 277 | CEASA 24 | Brasil | RS | Bom Jesus | Ágata | ” | - | - | - |
| 278 | CEASA25 | Brasil | RS | Bom Jesus | Ágata | ” | - | - | - |
| 279 | CEASA26 | Brasil | RS | Bom Jesus | Ágata | ” | - | - | - |
| 280 | CEASA27 | Brasil | RS | Bom Jesus | Ágata | ” | - | - | + |
| 281 | CEASA29 | Brasil | RS | Bom Jesus | Asterix | ” | - | - | - |
| 282 | CEASA37 | Brasil | RS | Bom Jesus | Ágata | ” | - | - | - |
| 283 | CEASA38 | Brasil | RS | Bom Jesus | Asterix | ” | - | - | - |
| 284 | CEASA 19 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Ágata | ” | - | - | - |
| 285 | CEASA 23 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Ágata | ” | - | + | - |
| 286 | CEASA28 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Ágata | ” | - | - | + |
| 287 | CEASA30 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Asterix | ” | - | - | + |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|-----|---------|--------|--------|------------------------|----------|---------------|-----|------|------|
| 288 | CEASA31 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Ágata | ” | - | - | - |
| 289 | CEASA32 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Asterix | ” | - | - | - |
| 290 | CEASA34 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Ágata | ” | - | - | + |
| 291 | CEASA36 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Asterix | ” | - | + | + |
| 292 | RS1 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Ágata | 2007-2009 | - | - | - |
| 293 | RS2 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Asterix | ” | - | - | - |
| 294 | RS3 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Vivaldi | ” | - | - | - |
| 295 | RS4 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Vivaldi | ” | - | - | - |
| 296 | 1003 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Asterix | ” | - | - | - |
| 297 | 1007 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Ágata | ” | - | - | - |
| 298 | 1012 | Brasil | RS | São Francisco de Paula | Ágata | ” | - | - | + |
| 299 | POA1 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | 2011 | - | - | - |
| 300 | POA2 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 301 | POA3 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 302 | POA4 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | 2012 | - | - | - |
| 303 | POA5 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 304 | POA6 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 305 | POA7 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 306 | POA8 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 307 | POA9 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 308 | POA10 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 309 | POA11 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 310 | POA12 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 311 | POA13 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 312 | POA14 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 313 | POA15 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|-----|---------|---------|--------|--------------|----------|---------------|-----|------|------|
| 314 | POA16 | Brasil | RS | Porto Alegre | Ágata | ” | - | - | - |
| 315 | BA-1 | Brasil | BA | Ibicoara | Ágata | 2011 | - | - | - |
| 316 | BA-2 | Brasil | BA | Ibicoara | Ágata | ” | - | + | - |
| 317 | BA-3 | Brasil | BA | Ibicoara | Ágata | ” | - | - | - |
| 318 | BA-4 | Brasil | BA | Ibicoara | Ágata | ” | - | - | - |
| 319 | H-1 | Brasil | BA | Mucugê | Ágata | ” | - | - | - |
| 320 | H-2 | Brasil | BA | Mucugê | Ágata | ” | - | - | - |
| 321 | H-3 | Brasil | BA | Mucugê | Ágata | ” | - | - | - |
| 322 | H-4 | Brasil | BA | Mucugê | Ágata | ” | - | + | - |
| 323 | Cris-1 | Brasil | GO | Cristalina | Ágata | 2010 | - | - | - |
| 324 | Cris-2 | Brasil | GO | Cristalina | Ágata | ” | - | + | - |
| 325 | Cris-3 | Brasil | GO | Cristalina | Ágata | ” | - | + | - |
| 326 | Is-1 | Brasil | GO | Cristalina | Ágata | 2011 | - | - | + |
| 327 | Is-2 | Brasil | GO | Cristalina | Ágata | ” | - | - | - |
| 328 | Is-3 | Brasil | GO | Cristalina | Ágata | ” | - | - | - |
| 329 | Is-4 | Brasil | GO | Cristalina | Ágata | ” | - | - | - |
| 330 | 3918 | Bolívia | NI | NI | Cupido | 2007-2009 | - | - | - |
| 331 | 3919 | Bolívia | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 332 | 3920 | Bolívia | NI | NI | Asterix | ” | - | - | - |
| 333 | 1146 | Holanda | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 334 | 1147 | Holanda | NI | NI | Markies | ” | - | - | - |
| 335 | MG-89 | Chile | NI | NI | Asterix | ” | - | - | - |
| 336 | 2985 | Chile | NI | NI | - | 2010 | - | - | - |
| 337 | 2986 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 338 | 2987 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | + |
| 339 | 2988 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|-----|---------|-------|--------|-----------|----------|---------------|-----|------|------|
| 340 | 2990 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 341 | 3026 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 342 | 3027 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 343 | 3028 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 344 | 3029 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 345 | 3030 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 346 | 3507 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 347 | 3509 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | + |
| 348 | 3510 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 349 | 3511 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 350 | 3515 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 351 | 4104 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 352 | 4411 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 353 | 4671 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 354 | 10457 | Chile | NI | NI | - | 2011 | - | - | + |
| 355 | 10458 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 356 | 10459 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 357 | 5897 | Chile | NI | NI | Asterix | 2007-2009 | - | - | - |
| 358 | 5898 | Chile | NI | NI | Vivaldi | ” | - | - | - |
| 359 | 5899 | Chile | NI | NI | Caesar | ” | - | - | - |
| 360 | 9743 | Chile | NI | NI | - | 2011 | - | - | - |
| 361 | 9744 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 362 | 9745 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 363 | 13325 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 364 | 13326 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 365 | 13327 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |

continuação APÊNDICE 8. Amostras analisadas por qPCR para detecção de *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola* e *D. solani*. Porto Alegre, RS, 2015.

| Nº | Amostra | País | Estado | Município | Cultivar | Ano de coleta | Dch | Ddia | Dsol |
|-----|---------|-------|--------|-----------|----------|---------------|-----|------|------|
| 366 | 13328 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 367 | 8380 | Chile | NI | NI | - | 2012 | - | - | - |
| 368 | 8381 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 369 | 8382 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | + |
| 370 | 8383 | Chile | NI | NI | - | ” | - | - | - |
| 371 | 8484 | Chile | NI | NI | Atlantic | ” | - | - | - |
| 372 | 8385 | Chile | NI | NI | Atlantic | ” | - | - | - |
| 373 | 8419 | Chile | NI | NI | Atlantic | ” | - | - | - |
| 374 | 11647 | Chile | NI | NI | Caesar | ” | - | - | - |
| 375 | 11648 | Chile | NI | NI | Asterix | ” | - | - | - |
| 376 | 11649 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 377 | 11650 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 378 | 11651 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 379 | 11652 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 380 | 11653 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 381 | 12063 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 382 | 12037 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 383 | 13038 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 384 | 13039 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 385 | 13040 | Chile | NI | NI | Ágata | ” | - | - | - |
| 386 | 6752 | Chile | NI | NI | Ágata | 2013 | - | - | - |

Dch-*D. chrysanthemi*; Ddia-*D. dianthicola*; Dsol-*D. solani*; NI: não identificado.