

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

DETECÇÃO DE *Ralstonia solanacearum* EM TUBÉRCULOS DE BATATA ATRAVÉS
DE PCR QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Adriana de Andrade Figueiró
Bióloga/ PUCRS

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

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2008

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser. Mas, graças a Deus, não somos mais o que éramos”.

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus, pela presença constante de luz em minha vida.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Valmir Duarte e Dra. Andréia Mara Rotta de Oliveira, pela oportunidade de progredir e pelos ensinamentos transmitidos.

À UFRGS e aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de aprimoramento intelectual.

À Dra. Melissa Medeiros Markoski, que além de amiga, teve importante participação no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos que aqui conquistei e que, com carinho, compreensão e amizade, contribuíram para a realização desta etapa de minha vida: Aícha Daniela Ribas, Cátia Romel, Giovana Finger, Joseane Biso de Carvalho e demais colegas, pela boa convivência durante estes anos.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais e ao meu filho faço da minha conquista o instrumento de gratidão, respeito, amor, carinho e reconhecimento.

DETECÇÃO DE *Ralstonia solanacearum* EM TUBÉRCULOS DE BATATA ATRAVÉS DE PCR QUALITATIVA E QUANTITATIVA¹

Autor: Adriana de Andrade Figueiró

Orientador: Valmir Duarte

Co-orientador: Andréia Mara Rotta de Oliveira

RESUMO

Ralstonia solanacearum é uma bactéria transmitida por tubérculos-semente. As biovars 1 (raça 1) e 2 (raça 3) estão associadas à batata (*Solanum tuberosum*) e apresentam características epidemiológicas diferentes. A certificação de tubérculos-semente constitui-se num processo essencial para o manejo da murcha bacteriana, mas depende de métodos específicos e sensíveis de detecção deste patógeno. Este trabalho objetivou (i) projetar oligonucleotídeos iniciadores para diferenciação das biovars de *R. solanacearum* e (ii) estabelecer método de extração de DNA total de tubérculos de batata para detecção de *R. solanacearum* através de PCR qualitativa e quantitativa. Os oligos projetados para a biovar 1, baseados no gene *pehS*, não geraram o fragmento esperado de 500 pb, mas produtos inespecíficos. A PCR com os oligos projetados para a biovar 2, a partir do gene UDP-N-acetilglucosamina 4,6-dehidratase, amplificaram o DNA de ambas as biovars (354 pb). O método FTA foi mais sensível (um infectado/ 100 tubérculos) na obtenção de DNA de tecidos de batata, coletados com auxílio de seringas descartáveis, do que por lise celular por aquecimento ou bio-PCR. A presença de *R. solanacearum* em tubérculos coletados em São Francisco de Paula e Ibiraiaras, RS, não foi detectada através de PCR (OLI1/Y2), em amostras retiradas com seringas e submetidas à extração do DNA através do método FTA, lise celular por aquecimento, bio-PCR e lise celular por aquecimento, e kit *GenSpinTM Plant DNA Purification*. Entretanto, a detecção nos cartões FTA foi possível quando se utilizou os oligos RS-I/RS-II; a sensibilidade da PCR aumentou de 10⁶ para 1 UFC.mL⁻¹. Os resultados da PCR com o DNA eluído dos cartões FTA não se alteraram, viabilizando o uso do DNA do cartão FTA em PCR quantitativa. A PCR quantitativa, usando SYBR Green e os oligos RS-I/RS-II, confirmou a presença de *R. solanacearum* nas 13 amostras coletadas nos dois municípios.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (72 p.) Março, 2008.

DETECTION OF *Ralstonia solanacearum* IN POTATO TUBERS THROUGH QUALITATIVE AND REAL-TIME PCR¹

Author: Adriana de Andrade Figueiró

Adviser: Valmir Duarte

Co-adviser: Andréia Mara Rotta de Oliveira

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum is a seedborne potato tuber bacterium. Biovars 1 (race 1) and 2 (race 3) are associated to potato (*Solanum tuberosum*) and present different epidemiological features. Certification of seed potato tubers is the essential step toward the bacterial wilt management, but depends on specific and sensitive methods of detection of this pathogen. This research aimed (i) to design primers to differentiate these biovars of *R. solanacearum* and (ii) to establish a method of total DNA extraction of potato tubers to detect *R. solanacearum* through qualitative and real-time PCR. Designed primers to biovar 1, based on the gene *pehS*, did not produce the expected fragment (500 bp), but unespecific bands. PCR with primers designed to biovar 2, based in the gene UDP-N-acetilglucosamina 4,6-dehidratase, amplified DNA from both biovars (354 bp). The FTA card method was more sensitive (one infected/ 100 tubers) to obtain DNA from potato tissue, collected using a dischargeable syringe, than by heating cellular lyse or bio-PCR plus heating cellular lyse. The presence of *R. solanacearum* in tubers collected in São Francisco de Paula and Ibiraiaras, RS, was not detected by PCR (OLI1/Y2), on samples extracted using syringes and submitted to DNA extraction through FTA card method, heating cellular lyse, bio-PCR plus heating cellular lyse, and GenSpinTM Plant DNA Purification kit. However, the detection in the FTA cards was possible when RS-I/RS-II was used; the PCR sensitivity increased from 10⁶ to 1 CFU.mL⁻¹. The PCR results with DNA eluted from FTA cards were the same, allowing the use of the DNA from the FTA card in real-time PCR. Real-time PCR, using SYBR Green and RS-I/RS-II primers, confirmed the presence of *R. solanacearum* in the 13 symptomless potato tuber samples collected in the two counties.

¹Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (72 p.) March, 2008.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Variabilidade genética.....	5
2.2 Disseminação.....	12
2.3 Métodos de extração de DNA.....	14
2.4 Métodos de detecção.....	17
2.5 Projeção de oligonucleotídeos iniciadores.....	22
CAPÍTULO II.....	27
3. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA DETECÇÃO DE BIOVARES 1 E 2 DE <i>Ralstonia solanacearum</i> EM BATATA.....	27
3.1 INTRODUÇÃO.....	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.2.1 Estirpes de <i>Ralstonia solanacearum</i>	29
3.2.2 Análise <i>in silico</i> e projeção de oligonucleotídeos iniciadores.....	30
3.2.3 PCR com os oligonucleotídeos iniciadores projetados para detecção das biovares 1 ou 2.....	31
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.3.1 Análise <i>in silico</i> e projeção de oligonucleotídeos iniciadores.....	32
3.3.2 PCR com os oligonucleotídeos iniciadores projetados para detecção das biovares 1 ou 2.....	34
CAPÍTULO III.....	36
4. MÉTODOS DE DETECÇÃO.....	36
4.1 INTRODUÇÃO.....	36
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.2.1 Estirpes de <i>Ralstonia solanacearum</i>	38
4.2.2 Obtenção das amostras de tubérculos de batata.....	39
4.2.3 Amostras compostas.....	39
4.2.4 Extração do DNA.....	40
4.2.4.1 Lise alcalina.....	40
4.2.4.2 Lise celular por aquecimento.....	40
4.2.4.3 Bio-PCR e lise celular por aquecimento.....	40
4.2.4.4 <i>FTA® Cards Whatman</i>	41

	Página
4.2.4.5 Eluição do DNA retido no <i>FTA</i> [®] <i>Cards Whatman</i>	42
4.2.4.6 Kit para isolamento de DNA genômico.....	42
4.2.5 Determinação do limite de detecção do método <i>FTA</i> [®] <i>Cards Whatman</i>	43
4.2.6 Eletroforese do DNA.....	43
4.2.7 Métodos moleculares.....	44
4.2.7.1 PCR qualitativa.....	44
4.2.7.2 PCR quantitativa.....	45
4.2.8 Purificação dos produtos de amplificação para o seqüenciamento.....	46
4.2.9 Seqüenciamento e análise <i>in silico</i> dos produtos amplificados.....	46
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.3.1 Sensibilidade da PCR na detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> com diferentes métodos de extração de DNA de tecidos com diferentes níveis de infecção.....	48
4.3.2 Métodos de extração de DNA e PCR qualitativa.....	51
4.3.3 Determinação do limite de detecção do método <i>FTA</i> [®] <i>Cards Whatman</i>	53
4.3.4 Eluição do DNA retido no <i>FTA</i> [®] <i>Cards Whatman</i>	55
4.3.5 PCR quantitativa.....	57
4.3.6 Análise <i>in silico</i> das amostras seqüenciadas.....	59
5. CONCLUSÕES.....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Sensibilidade de métodos de detecção bacteriana. Porto Alegre, RS, 2008.....	18
2. DNA das estirpes de <i>Ralstonia solanacearum</i> utilizadas para a padronização dos oligonucleotídeos iniciadores PehS F/ PehS R e UDP1 F/ UDP R. Porto Alegre, RS, 2007.....	29
3. Estirpes de <i>Ralstonia solanacearum</i> utilizadas para a padronização dos métodos de extração de DNA bacteriano. Porto Alegre, RS, 2007.....	38
4. Detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> por PCR utilizando diferentes métodos de extração do DNA em amostras coletadas com auxílio de seringa, de tubérculos de batata com três níveis de infecção. Porto Alegre, RS, 2008.....	49
5. Detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> em tubérculos de batata através de PCR qualitativa com os oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2, utilizando diferentes métodos de extração do DNA e FTA para os oligonucleotídeos RS-I/RS/II. Porto Alegre, RS, 2008.....	51

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Alinhamento múltiplo das seqüências parciais correspondentes ao gene UDP-N-acetilglucosamina 4,6-dehidratase para as linhagens UW551 (RSB2_UDP) e GM1000 (RSB2_UDP), com os oligos UDP1 F (PrimerUDPFor) e UDP1 R (PrimerUDPRev). Porto Alegre, RS, 2006.....	33
2. Amplificação de fragmentos de DNA com os oligonucleotídeos iniciadores PehS F/PehS R para o gene <i>peh</i> , regulador da produção de poligalactorulase. M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder; 1-14, DNA genômico de <i>Ralstonia solanacearum</i> ; 1, estirpe 1 (biovar 1); 2, estirpe 3 (biovar 1); 3, estirpe 4 (biovar 1); 4, estirpe 5 (biovar 1); 5, estirpe 6 (biovar 1); 6, estirpe 7 (biovar 1); 7 estirpe 8 (biovar 1); 8, estirpe 9 (biovar 1); 9, estirpe 11 (biovar 1); 10, estirpe 13 (biovar 1); 11, estirpe 45 (biovar 2); 12, estirpe 47 (biovar 2); 13, estirpe R56 (biovar 2); 14, estirpe R530 (biovar 2); 15, água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2007.....	34
3. Amplificação de fragmentos de DNA com os oligonucleotídeos iniciadores UDP1F/UDP1R baseados no gene de UDP-N-acetilglucosamina 4,6-dehidratase, cujo produto está envolvido no controle da síntese de dissacarídeos. M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder; 1-14, DNA genômico de <i>Ralstonia solanacearum</i> ; 1, estirpe 1 (biovar 1); 2, estirpe 3 (biovar 1); 3, estirpe 4 (biovar 1); 4, estirpe 5 (biovar 1); 5, estirpe 6 (biovar 1); 6, estirpe 7 (biovar 1); 7 estirpe 8 (biovar 1); 8, estirpe 9 (biovar 1); 9, estirpe 11 (biovar 1); 10, estirpe 13 (biovar 1); 11, estirpe 47 (biovar 2); 12, estirpe R56 (biovar 2); 13, estirpe R530 (biovar 2); 14, água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2007.....	34
4. Representação indicando o pareamento dos oligos OLI1 e Y2, obtida com o programa <i>Oligo Analyser</i> Porto Alegre, RS, 2008.....	52
5. Amplificação do DNA, em suspensões de células de <i>Ralstonia solanacearum</i> , por PCR com os oligos OLI1 e Y2: Método (1-14) <i>FTA</i> [®] <i>Cards Whatman</i> ; (15-28) Lise celular por aquecimento; M, marcador de peso molecular 1 Kb <i>Plus DNA ladder</i> ; C, controle positivo de <i>FTA</i> ; absorbâncias (1 e 15) 1,00; (2 e 16) 0,50; (3 e 17) 0,25 e (4 e 18) 0,10; Diluições (5 e 19) 10-1; (6 e 20) 10-2; (7 e 21) 10-3; (8 e 22) 10-4; (9 e 23) 10-5; (10 e 24) 10-6; (11 e 25) 10-7; (12 e 26) 10-8; (13 e 27) 10-9 e (14 e 28) 10-10; (29) controle negativo (água). Porto Alegre, RS, 2007.....	53

6. Amplificação do DNA, em suspensões de células de *Ralstonia solanacearum*, por PCR com os oligos RS-I e RS-II através do método *FTA® Cards Whatman*; M, marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA ladder*; C, controle positivo de FTA; absorvâncias (1) 1,00; (2) 0,50; (3) 0,25 e (4) 0,10; Diluições (5) 10-1; (6) 10-2; (7) 10-3; (8) 10-4; (9) 10-5; (10) 10-6; (11) 10-7; (12) 10-8; (13) 10-9 e (14) 10-10. Porto Alegre, RS, 2008..... 54
7. Amplificação do DNA, em suspensões de células de *Ralstonia solanacearum*, por PCR com os oligos OLI1 e Y2, através do método de eluição do DNA retido no cartão *FTA® Cards Whatman*; M, marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA ladder*; C, controle positivo de FTA; absorvâncias (1 e 15) 1,00; (2 e 16) 0,50; (3 e 17) 0,25 e (4 e 18) 0,10; Diluições (5 e 19) 10-1; (6 e 20) 10-2; (7 e 21) 10-3; (8 e 22) 10-4; (9 e 23) 10-5; (10 e 24) 10-6; (11 e 25) 10-7; (12 e 26) 10-8; (13 e 27) 10-9 e (14 e 28) 10-10; (29) controle negativo (água). Porto Alegre, RS, 2008..... 56
8. Amplificação do DNA, em suspensões de células de *Ralstonia solanacearum*, por PCR com os oligos RS-I e RS-II através do método de eluição do DNA retido no cartão *FTA® Cards Whatman*; M, marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA ladder*; C, controle positivo de FTA; absorvâncias (1) 1,00; (2) 0,50; (3) 0,25 e (4) 0,10; Diluições (5) 10-1; (6) 10-2; (7) 10-3; (8) 10-4; (9) 10-5; (10) 10-6; (11) 10-7; (12) 10-8; (13) 10-9 e (14) 10-10; (15) controle negativo (água). Porto Alegre, RS, 2008..... 56
9. Perfil eletroforético dos produtos de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores OLI1 e Y2, utilizando os métodos *FTA® Cards Whatman* (1 a 3) e eluição do DNA retido no cartão *FTA® Cards Whatman* (4 a 6), em amostras de batata infectadas com *Ralstonia solanacearum* oriundas de Criciúma, SC; M, marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA ladder*; 1-4, amostra 1; 2-5, amostra 2; 3-6, amostra; 7, água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2007..... 56
10. Detecção de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata através de PCR quantitativa com os oligonucleotídeos iniciadores RS-I/RS-II. Porto Alegre, RS, 2008.... 58
11. Curva padrão obtida através da análise de suspensões de células de *Ralstonia solanacearum* extraídas pelo método FTA e analisadas por PCR qualitativa com os oligos RS-I/RS-II usando o corante *SYBR Green* Porto Alegre, RS, 2008..... 58
12. Detecção de *Ralstonia solanacearum* através de PCR quantitativa com os oligos RS-I/RS-II, usando estirpes padrão de biovars 1 e 2. Porto Alegre, RS, 2008..... 58
13. Alinhamento múltiplo resultante da edição das seqüências parciais, geradas com os oligos OLI1 e Y2 para as biovars 1 e 2 de *Ralstonia solanacearum*. Porto Alegre, RS, 2008..... 60

1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.), espécie pertencente à família Solanaceae, é considerada a quarta cultura em ordem de importância no mundo, sendo cultivada em mais de 125 países. Esta cultura ocupa no Brasil uma área de 182 mil ha, com uma produção de 2,7 milhões de toneladas e rendimento médio de 15 t.ha⁻¹. A produtividade média varia entre regiões e estados, chegando a 22 t.ha⁻¹ em Minas Gerais, 20 t.ha⁻¹ em São Paulo, 14 t.ha⁻¹ no Paraná, 10 t.ha⁻¹ em Santa Catarina e 8 t.ha⁻¹ no Rio grande do Sul.

Cerca de 15% da produção mundial de batata é destinada à produção de batata-semente, sendo este percentual menor em países com alta produtividade. No Brasil, aproximadamente 13% da produção destina-se à batata-semente, mas apenas 20 a 30% deste total representam sementes com a qualidade certificada. A produção de batata-semente no Brasil tem-se mantido entre 60 e 90 mil toneladas/ano. Esta quantidade, somada às importações de 4 a 6 mil toneladas, mostra que o consumo anual de semente melhorada varia entre 64 e 96 mil toneladas, para uma demanda potencial de 42 a 460 mil toneladas ao ano.

Ralstonia solanacearum (Smith) (Yabuuchi *et al.*, 1995) é uma β -proteobactéria, Gram-negativa, cosmopolita, responsável pela murcha bacteriana (MB) em mais de 450 espécies de plantas. A doença é considerada como uma das maiores limitações em muitas culturas importantes, além da batata, em regiões de clima tropical, subtropical e zonas mais quentes de regiões de clima temperado no mundo. *R. solanacearum* possui a

capacidade de sobreviver por longos períodos em solo, água e rizosfera de plantas não suscetíveis. A infecção ocorre pela entrada da bactéria nos tecidos da planta via ferimentos ou aberturas naturais nas raízes secundárias. Após a invasão, as células bacterianas primeiramente se proliferam e colonizam os espaços intercelulares e posteriormente invadem os vasos do xilema, estabelecendo uma relação parasítica estável. Evidências sugerem que ocorra uma fase epifítica no ciclo de vida da bactéria, contribuindo para a sua sobrevivência e provendo uma fonte de inóculo para o incremento da população no solo.

Ralstonia solanacearum é uma espécie heterogênea classificada em cinco raças de acordo com a espécie hospedeira, e em seis biovars com base na versatilidade em oxidar determinados tipos de açúcares e álcoois. Dois grupos de estirpes são capazes de infectar culturas de batata, o pertencente à biovar 1, que corresponde à raça 1 e o grupo pertencente à biovar 2, que corresponde à raça 3. Biovar 1 (raça 1) possui um grande número de espécies hospedeiras e maior capacidade de persistir no solo, predominando em regiões de clima quente. Já a biovar 2 (raça 3) é composta por estirpes que infectam basicamente cultivos de batata em regiões de clima temperado e apresentam maior capacidade de produzir infecções latentes. Outra diferença importante é a capacidade da biovar 2 em metabolizar os açúcares celobiose, lactose, e maltose, assim como os álcoois dulcitol, manitol e sorbitol, o que não se verifica na biovar 1.

No Brasil, *R. solanacearum* é considerada endêmica. A presença das biovars 1 e 2 tem sido registrada nas Regiões Sul e Sudeste do país. No entanto, por influência das condições climáticas há uma predominância de estirpes da biovar 2, apesar das estirpes desta biovar serem mais factíveis de erradicação que as estirpes da biovar 1, elas são mais facilmente disseminadas, devido a sua maior capacidade de estabelecer infecções latentes em tubérculos.

Infecções latentes são de particular importância na cultura de batata, já que permitem a colonização de tecidos vasculares sem manifestação dos sintomas da doença. Tubérculos-semente infectados constituem uma fonte relevante de disseminação do patógeno e a principal forma de disseminação do biovar 2 de *R. solanacearum* para diferentes regiões do mundo, o que facilita sua introdução em regiões livres do patógeno.

As medidas mais eficientes no controle da MB são ações preventivas, como o uso de tubérculos-semente livres do patógeno e o plantio em áreas não infestadas. O manejo integrado da doença abrange o uso de cultivares resistentes e de modelos apropriados de práticas culturais que levam em consideração a biovar que está presente no local infectado. Desta forma torna-se essencial o conhecimento das populações locais de *R. solanacearum*, afim de proporcionar uma melhor compreensão a respeito do seu mecanismo de resistência.

Técnicas moleculares são sensíveis e altamente específicas, capazes de detectar pequenas quantidades de bactérias tornando mais fácil e ágil o estudo de doenças em plantas. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR qualitativa) possibilita uma amplificação seletiva e específica de seqüências de ácidos nucleicos propiciando a identificação qualitativa de bactérias fitopatogênicas. Já, a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR quantitativa) pode ser utilizada quando se visa uma determinação quantitativa. Dentro deste contexto, a projeção de oligonucleotídeos iniciadores (oligos) específicos que permitam a detecção e diferenciação das biovars 1 e 2 é de suma importância, para que medidas específicas sejam tomadas para um controle mais eficiente da MB.

Este trabalho teve como objetivo projetar oligonucleotídeos iniciadores capazes de detectarem especificamente as biovars 1 e 2 e estabelecer método de extração de

DNA total a partir de tubérculos de batata para detecção de *R. solanacearum* através de PCR qualitativa e quantitativa.

CAPÍTULO I

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Variabilidade genética

Ralstonia solanacearum é considerada uma das mais importantes bactérias fitopatogênicas, causando grandes perdas na produção em todo o mundo (Hayward, 1991). As perdas resultam não somente de sua ampla distribuição geográfica e gama de hospedeiros, mas também da falta de medidas apropriadas de proteção (Genin & Boucher, 2002). Devido tanto a sua complexidade fenotípica como genotípica, *R. solanacearum* pode ser encontrada associada a mais de 450 espécies de plantas, pertencentes a pelo menos 50 famílias de plantas cultivadas e silvestres (Hayward, 1991; Kelman, 1998). Estirpes de *R. solanacearum* diferem quanto as espécies hospedeiras, distribuição geográfica, patogenicidade, relacionamento epidemiológico e propriedades fisiológicas (Buddenhagem & Kelman, 1964; Hayward, 1991; Gillings *et al.*, 1993; Silveira *et al.*, 2002). No entanto, as biovars 1 e 2 que infectam batata, são bastante distintas das demais biovars em todos os aspectos citados (Hayward, 1995; Silveira, 2002).

Ralstonia solanacearum é considerada uma espécie complexa, um grupo heterogêneo relacionado, mas de estirpes geneticamente distintas. Entretanto, a base desta variabilidade genética é desconhecida (Fegan & Prior, 2005; Gabriel *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, *R. solanacearum* vem sendo classificada em raças com base na espécie hospedeira e em biovars de acordo com a capacidade de metabolizar dissacarídeos (celobiose, lactose e maltose) e álcoois hexose (manitol, sorbitol e dulcitol) (Hayward, 1964; Hayward, 1994). Entretanto, esta classificação não faz parte dos critérios do Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias e carece de exata concordância com a ampla variabilidade genética das estirpes da bactéria (Hayward, 1991; Silveira, 2002).

O conhecimento da estrutura genética populacional de *R. solanacearum* é fundamental para estudos epidemiológicos e o controle efetivo da doença, principalmente para o desenvolvimento de genótipos resistentes (Van Der Wolf *et al.*, 1998). A ampla diversidade genética encontrada em bactérias de solo e a diferenciação genética destas populações podem chegar ao nível microgeográfico, dependendo do tipo de solo e propriedades da rizosfera do hospedeiro (McArthur *et al.*, 1988; Dii Cello *et al.*, 1997; Silveira, 2002).

Técnicas moleculares têm permitido o estudo do relacionamento filogenético e evolutivo de *R. solanacearum*, bem como o de variabilidade genômica em nível intra-específico (Silveira *et al.*, 2005). A utilização de técnicas de análise de DNA como RFLP, AFLP, RAPD e rep-PCR tem se mostrado relevante na caracterização da variabilidade de *R. solanacearum* (Van Der Wolf *et al.*, 1998; Seal *et al.*, 1999). Análises de RFLP baseadas em genes de virulência e hipersensibilidade têm separado *R. solanacearum* em duas divisões importantes, uma originária da Ásia e outra da América, sugerindo uma distante dicotomia evolutiva (Cook *et al.*, 1989). A divisão I com 78% de similaridade, contém as estirpes da raça 1, relacionadas às biovars 3, 4 e 5, já a divisão II com 62% de similaridade, contém as estirpes das raças 1 e 2 relacionadas às biovars 1 e da raça 3 relacionada à biovar 2. Estes resultados

corroboram com a conclusão de que as biovars 1 e 2 são membros de um grupo homogêneo relacionado (Cook *et al.*, 1989). Posteriormente, estudos confirmaram as duas divisões, com inclusão das estirpes da biovar 2T (N2) relacionadas à raça 1 (Gillings & Fahy, 1993). Recentemente, um terceiro grupo de estirpes originárias da África também foi identificado (Poussier *et al.*, 2000). Sendo que a característica mais fortemente correlacionada aos grupos RFLP foi a origem geográfica das estirpes, visto que as estirpes da divisão I são originárias da Ásia e Austrália e da divisão II originárias das Américas (Gillings & Fahy, 1993).

As estirpes da biovar 2 compõem apenas dois grupos de RFLP bastante homogêneos e próximos, com origem na região Andina Ocidental (Silveira, 2002). No Brasil, a biovar 2 é limitada às regiões de clima ameno do Centro e Sul do país (Takatsu, 1997). Esta biovar vem sendo amplamente distribuída devido à entrada de tubérculos de batata com infecções latentes em regiões livres do patógeno (Gillings & Fahy, 1993). No entanto, a biovar 2T é composta por grupos de RFLP geneticamente bastante heterogêneos, com origem na região Amazônica. Esta biovar está relacionada a regiões de clima tropical de baixa altitude, sendo que no Brasil, além da região Amazônica é encontrada no Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo. Em países de outros continentes esta biovar não foi encontrada (French, 1993).

As estirpes da raça 1 sobrepõem as classificações de divisão e biovar e não apresentam relação filogenética ou evolutiva (Gillings & Fahy, 1993). Além disso, as estirpes da biovar 1, raça 1 apresentam grande variabilidade genética e no Brasil, predominam na região Central, mas também são encontradas desde o Rio Grande do Sul até o Amazonas (Takatsu, 1997).

A amplificação do DNA de 112 estirpes de *R. solanacearum* com os oligos consenso T3A e T5A, projetados a partir de seqüências de tRNA, agruparam as estirpes

desta bactéria em três diferentes perfis de amplificação. Esta divisão foi derivada da visualização de uma banda de 100 pb para todas as estirpes, enquanto as estirpes do tipo I apresentam somente esta banda, estirpes do tipo II apresentam uma banda adicional de 200 pb, e as estirpes do tipo III apresentam uma banda adicional de 450 pb (Seal *et al.*, 1992). Sendo que as estirpes do tipo III representam as biovares 3, 4 e 5 e correspondem à divisão I (Cook *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 1991). As estirpes dos tipos I e II correspondem a divisão II e representam as biovares 2 e 1, respectivamente (Cook *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 1991).

Isolados da biovar 2 de *R. solanacearum* obtidos de plantas de batata do Rio Grande do Sul, avaliados com os oligos T3A e T5A (Silveira, 2002), revelaram uma banda de 100 pb, esperada para estirpes desta biovar (Seal *et al.*, 1992). No entanto, isolados da biovar 1, obtidos de plantas de tomate, berinjela e fumo na mesma região, não apresentaram o perfil correspondente descrito para este patógeno, apresentando uma banda adicional de 650 pb. Estes resultados demonstram uma maior variabilidade para as estirpes da biovar 1 de *R. solanacearum*, corroborando com a afirmativa de que as estirpes deste grupo possuem maior variabilidade genética do que as estirpes da biovar 2 (Silveira *et al.*, 2006).

Estirpes de *R. solanacearum* de diferentes áreas produtoras do Rio Grande do Sul, quando analisadas utilizando oligos para as seqüências ERIC e BOX, geraram múltiplos produtos de tamanhos variados 200 pb a 3 Kb. Através destas análises foi possível diferenciar as biovares 1 e 2. Porém, estirpes da biovar 2 mostraram menor variação devido ao menor número de fragmentos gerados (Silveira, 2002). A presença de um padrão de amplificação característico através de análise de RAPD foi verificado, relacionado com a região da qual os isolados foram obtidos, mostrando a existência de pouca variabilidade local (Silveira, 2002).

Resultados semelhantes foram obtidos utilizando o conjunto de oligos ERIC e BOX (Van Der Wolf *et al.*, 1998), já que foi possível diferenciar isolados de diferentes biovars, porém não houve variação entre os isolados de biovar 2. A variabilidade entre isolados de biovar 2 tem sido melhor determinada utilizando a técnica *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), pois foram encontradas 10 distintas linhagens clonais entre 45 isolados de biovar 2, obtidos em áreas produtoras de batata no Quênia (Smith *et al.*, 1995).

Através da análise de seqüências do rRNA 16S, assim como, dos genes *mutS*, *hrpB* e *egl* e regiões ITS, por RFLP, estabeleceu-se uma nova classificação de *R. solanacearum*, baseada em quatro filotipos, ou grupos genéticos, cada qual subdividido em pequenos grupos denominados *sequevar* (Fegan & Prior, 2005). Cada filotipo reflete a origem geográfica da estirpe: filotipo I e II são compostos pelas estirpes da Ásia e América, respectivamente, enquanto que os membros da África pertencem ao filotipo III; já o filotipo IV agrupa isolados de *Ralstonia syzygii* e BDB (*Blood Disease Bacterium*), da Indonésia, Japão e Austrália (Fegan & Prior, 2005; Prior & Fegan, 2005).

Estirpes de cada filotipo parecem ter evoluído separadamente devido ao isolamento geográfico. Entretanto, quase independente de sua origem geográfica, estirpes de *R. solanacearum* são adaptadas a viver e causar doenças tanto em ambientes de clima tropical, como de clima temperado (Gabriel *et al.*, 2006).

Estudos comparativos com base em características fenotípicas mostraram as diferenças existentes entre estirpes da biovar 2T da Ásia e do Sul da América, além das diferenças entre as estirpes da biovar 2T (Ásia) e estirpes da biovar 2, sugerindo uma divisão das estirpes da biovar 2T em sub-fenótipos. Além disso, com base em análise de rep-PCR foi possível dividir as estirpes da biovar 2T em três grupos. As estirpes

asiáticas foram divididas em dois distintos grupos, onde o grupo I abrange estirpes do Japão e o grupo II contém estirpes da Indonésia e Filipinas (Horita *et al.*, 2005). Análises dos genes rRNA 16S de estirpes da biovar 2T de batata do Japão e Filipinas mostraram que estas estirpes estão estritamente relacionadas a biovar 2T da Indonésia, sugerindo que as estirpes originadas na Indonésia se disseminaram para o Japão e Filipinas através de tubérculos-semente de batata (Horita & Tsuchiya, 2000; Villa *et al.*, 2005). Entretanto, a suposição da origem da biovar 2T da Ásia na Indonésia ainda é incerta (Horita *et al.*, 2005).

As análises fenotípica e genotípica de isolados de *R. solanacearum* de diferentes regiões geográficas também evidenciam a considerável heterogeneidade da bactéria (Timms-Wilson *et al.*, 2001). Estes estudos também confirmam a maior homogeneidade existente entre isolados pertencentes a biovar 2 (raça 3) (Cook *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1995). Além disso, isolados da Europa se mostraram essencialmente homogêneos, provavelmente devido a recente invasão e adaptação ao clima europeu, pressupondo sua radiação de um simples foco original (Timms-Wilson *et al.*, 2001).

O seqüenciamento da estirpe GMI1000 (raça 1, biovar 3) revelou que o genoma de *R. solanacearum* se encontra estruturado em dois *replicons*: o DNA cromossomal de 3,7 Mb e o megaplastímico de 2,1 MB. O megaplastímico contém numerosos genes envolvidos na adaptação ambiental. Além disso, este *replicon* também possui duplicações de alguns genes do DNA cromossomal de funções indispensáveis, como os para rDNA, subunidade α da DNA polimerase, e outros. Interessantemente, algumas enzimas envolvidas no metabolismo de pequenas moléculas, também se encontram neste *replicon*, mas não no cromossomal. Estas observações sugerem que o megaplastímico sofre processos de aquisição de novas funções por duplicação ou translocação de genes essenciais, presentes no DNA cromossomal (Genin & Boucher,

2002; Salanoubat *et al.*, 2002; Castillo & Greenberg, 2007). Sendo a instabilidade um fenômeno bem conhecido para esta bactéria, tal flexibilidade pode ser responsável pela diversidade genômica da espécie, exemplificada em termos de gama de hospedeiro ou existência de biovars (Genin & Boucher, 2002).

Através da análise da seqüência codificadora (CDS) da estirpe UW551 (raça 3, biovar 2) em comparação com o genoma completo da estirpe GMI1000 (raça 1, biovar 3) foi possível verificar que pelo menos parte do fenótipo que determina as biovars resulta da transferência horizontal de genes que codificam enzimas responsáveis pela oxidação de álcoois, assim como os genes *avrA*, responsáveis pela reação de hipersensibilidade em tabaco e que podem determinar a raça (Gabriel *et al.*, 2006). Além disso, foi possível assumir que o tamanho do genoma da estirpe UW551 (5.9 Mb) é similar ao da estirpe GMI1000 (5.8 Mb) e com um conteúdo similar de G+C (cerca de 65%). No entanto, através de estatística de Poisson (Lander & Waterman, 1988) foi estimado que o genoma da estirpe UW551 teria 1.9 kb a mais do que o encontrado (Gabriel *et al.*, 2006). O genoma da estirpe UW551 também mostrou um inesperado nível de sintenia (71%) se comparado à estirpe GMI1000. Todos os genes mais importantes, envolvidos na virulência de *R. solanacearum* se mostraram altamente conservados entre as estirpes. Porém, foram encontrados 402 genes presentes na estirpe UW551 que estão ausentes na GMI1000, sendo que alguns parecem estar envolvidos na virulência, mas não à tolerância a frio. Portanto, a variabilidade de virulência e a adaptação ao frio pode ser determinada pela regulação de genes de funções desconhecidas, ou pela variação genética encontrada entre genes conservados (Gabriel *et al.*, 2006).

Estes estudos mostraram que as populações bacterianas podem sofrer diferentes processos seletivos, dando origem a diversos padrões de diversidade genética. Além

disso, a distância geográfica também pode ser responsável por influenciar a variação e a estrutura genética da população devido a diminuição do fluxo gênico, induzindo a divergência (Castillo & Greenberg, 2007). Desta forma, a forte correlação existente entre a variabilidade genética de *R. solanacearum* e o número de espécies hospedeiras gera problemas no manejo da doença, assim como, dificuldades na produção de linhagens de plantas que sejam universalmente resistentes (Smith *et al.*, 1998; Genin & Boucher, 2002).

2.2 Disseminação

Ralstonia solanacearum possui a capacidade de sobreviver por longos períodos em determinados tipos de solo, água e rizosfera de plantas não suscetíveis. A infecção ocorre pela entrada da bactéria nos tecidos da planta via ferimentos ou aberturas naturais nas raízes secundárias, embora a transmissão aérea por insetos também tenha sido relatada por certas estirpes que infectam banana (Genin & Boucher, 2002). Após a invasão, as células bacterianas primeiramente se proliferam e colonizam os espaços intercelulares e posteriormente invadem os vasos do xilema, estabelecendo uma relação parasítica estável (Shinohara *et al.*, 2005; Gotz *et al.*, 2006). Evidências sugerem que ocorra uma fase epifítica no ciclo de vida da bactéria, contribuindo para a sua sobrevivência e provendo uma fonte de inóculo para o incremento da população no solo (Hayward, 1991).

Ralstonia solanacearum é um patógeno vascular que pode causar a MB em plantas de batata e o apodrecimento de tubérculos, entretanto, também pode sobreviver formando grandes populações bacterianas em tubérculos sem causar o aparecimento de sintomas, na forma de infecções latentes (Ciampi *et al.*, 1980). Infecções latentes também podem ser relatadas em plantas cultivadas resistentes (Grimault *et al.*, 1994), plantas invasoras como *Solanum dulcamara* (Elphinstone, 1996; Elphinstone *et al.*,

1998; Salanoubat *et al.*, 2006), e ornamentais, sobretudo em gerânio (*Pelargonium x hortorum*) (Swanson *et al.*, 2007). Estudos mostram que cerca de 12 a 26% dos solos inoculados com *R. solanacearum*, geram plantas de gerânio com infecções latentes. Sendo que a população de *R. solanacearum* em infecções latentes pode chegar a 10^9 UFC.g⁻¹ de tecido do hospedeiro, embora a bactéria não se distribua uniformemente nos tecidos da planta (Swanson *et al.*, 2005).

Na maioria das regiões de clima tropical e subtropical do mundo, incluindo o Brasil, *R. solanacearum* é uma espécie endêmica. Estirpes da bactéria pertencentes a biovar 2 (raça 3) têm se adaptado a regiões de clima temperado, embora a biovar 1 (raça 1) também possa infectar batata, a biovar 2 é mais destrutiva em áreas que apresentam este tipo de clima (Schaad *et al.*, 2007).

Os mecanismos de patogenicidade e tolerância ao frio de estirpes de *R. solanacearum* da biovar 2 ainda não são bem conhecidos. Na falta de dados se torna impossível afirmar que a ampla distribuição do genótipo de biovar 2 se deva a tolerância ao frio, ou a específica adaptação dos mecanismos de patogenicidade à batata, ou até mesmos a adaptação dos mecanismos de patogenicidade a plantas invasoras, ou a novos mecanismos de patogenicidade ou efetores, ou ainda a combinação de todos estes fatores (Gabriel *et al.*, 2006).

Na Europa, Estados Unidos e Canadá *R. solanacearum* é considerado um microrganismo quarentenário de tolerância zero. Apesar disso, na década de 90, estirpes da biovar 2 adaptadas ao clima temperado foram introduzidas no Oeste da Europa através de tubérculos de batata com infecções latentes (Janse, 1996). Esta bactéria tem sido relatada também na Turquia, entretanto não tem sido observada em batatas do continente Asiático, onde não existem normas de regulação de batata. Além disso, *R. solanacearum* vem sendo encontrada em plantas de gerânio infectadas cultivadas em

Wisconsin e na Pensilvânia, podendo resultar no movimento para outras regiões livres da doença (Williamson *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003).

A disseminação da biovar 2 de *R. solanacearum* para regiões livres do patógeno pode ser atribuída à entrada de tubérculos-semente com infecções latentes, nas quais o microrganismo apresenta-se viável e patogênico, podendo causar a doença quando em condições favoráveis de plantio (Ciampi *et al.*, 1980; Janse, 1988). Além disso, a maioria dos surtos de *R. solanacearum* na Europa parecem estar relacionados à irrigação de lavouras de batata com águas contaminadas (Elphinstone, 1996; Caruso *et al.*, 2003). Devido aos diversos surtos de MB na cultura da batata detectados em diferentes países da União Européia (Elphinstone *et al.*, 1998), métodos mais sensíveis que sejam capazes de detectar o patógeno em infecções latentes têm sido aprimorados para que possam assegurar medidas quarentenárias eficientes (Martins, 2000).

2.3 Métodos de extração de DNA

Uma eficiente extração de DNA pode aumentar o desempenho das técnicas moleculares de detecção, como PCR e seqüenciamento. Dentro deste contexto, vários métodos de extração do DNA vêm sendo publicados, incluindo os protocolos de extração com CTAB, SDS (Rogers & Bendich, 1985; Edwards *et al.*, 1991), fenol e fenol clorofórmio (Roe *et al.*, 1996; Wolf, 2001), aplicação de kits comerciais, liberação do DNA por NaOH (Wang *et al.*, 1993) e lise celular por aquecimento (Thomson & Henry, 1995). A maioria destes métodos se baseia na ruptura das células e/ou tecidos na presença de nitrogênio líquido e uma centrifugação para a separação dos debris celulares do DNA, implicando muito tempo e equipamentos de laboratório (Drescher & Graner, 2002). Além disso, métodos de extração de DNA bacteriano que dependem de aquecimento ou desnaturação são mais eficientes para a extração de DNA plasmideal,

mas não para DNA genômico, sendo que para este fim, métodos mais apropriados são os que retêm o DNA em uma superfície (Rogers & Burgoyne, 1997).

Um método alternativo para coleta de DNA e estocagem de material biológico foi originalmente desenvolvido para amostras de sangue em diagnóstico neonatal (Guthrie & Susi, 1963) e posteriormente utilizado em PCR para análise médica e forense (Nelson *et al.*, 1990; Carducci *et al.*, 1992). Este método consiste em passar uma pequena gota de sangue em um cartão que posteriormente é tratado com reagentes químicos que induzem a lise celular, além de inibir o crescimento de microrganismos e proteger os ácidos nucleicos da degradação (Drescher & Graner, 2002). Existe uma ampla gama deste tipo de cartão disponível, incluindo *IsoCode Card* (distribuído por Schleicher and Schuell, Diagnostik, Alemanha), *Generation Capture System* (Biozym Diagnostik GmbH, Heissisch-Oldendorf, Alemanha) e *FTA-cards* (*Flinders Technology Associates*) (Whatman, Kent, UK). Para a realização da PCR, um pequeno disco contendo a amostra a ser analisada é cortado e os inibidores são removidos através de uma série de lavagens com reagentes. O disco com o DNA-alvo retido é posto diretamente na mix de reação. 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 (Orlandi & Lampel, 2000; Mbogori *et al.*, 2006).

Estes métodos adaptados, atualmente são utilizados para outros materiais biológicos. Através das técnicas de RAPD e microssatélite o DNA de amostras de soja foi amplificado com sucesso (Lange *et al.*, 1998). Além de seqüências de 16 espécies diferentes de plantas, tais como, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Nicotiana tabacum* (Lin *et al.*, 2000). O método FTA também tem sido utilizado com sucesso como meio de coleta, transporte e para análise genética de corais, localizados em

ambientes distantes (Crabble, 2003). Também pode ser utilizado para identificação de animais, fungos, vírus e parasitas, biologia molecular (conservação, genotipagem e diversidade), transgênicos, diagnósticos, farmacogenômica e genômica. Entretanto, sua utilização em bacteriologia tem sido restrita e cautelosa (Hsiao *et al.*, 1999; Drescher & Graner, 2002; Becker *et al.*, 2004; Halbert *et al.*, 2004; Fegan & Prior, 2005; Prior & Fegan, 2005; Rajendram *et al.*, 2006; Moscoso *et al.*, 2007).

O cartão FTA é uma matriz fibrosa, a qual os ácidos nucleicos ficam aderidos, reduzindo os passos de coleta de DNA, transporte, purificação e estocagem e, conseqüentemente, reduz o custo e tempo requerido para o processamento do DNA. Esta matriz fibrosa está impregnada com agentes quelantes e desnaturantes que retêm e lisam os microrganismos em contato (Belgrader *et al.*, 1995). O DNA liberado é retido e preservado intacto na membrana por cerca de 14 anos à temperatura ambiente (Mbogori *et al.*, 2006). No entanto, DNA extraído através de outros métodos e estocado a temperatura ambiente, não duram mais de seis meses (Mbogori *et al.*, 2006).

Seguindo uma série de curtas lavagens para remover debris celulares e outros contaminantes não aderidos, o cartão pode ser diretamente utilizado como molde de PCR ou como um meio sólido para estocagem da amostra para posterior uso (Lampel *et al.*, 2000). Como as lavagens também removem os agentes estabilizadores de DNA presentes no FTA, as amostras devem ser submetidas à PCR logo após as lavagens. Amostras purificadas e estocadas por quatro meses apresentam uma significativa baixa na efetividade se comparadas com amostras recém tratadas (Drescher & Graner, 2002).

Quando o FTA foi utilizado para a amplificação de DNA de cevada, melhores resultados foram obtidos para amostras retidas de regiões verdes mais escuras, devido ao maior número de células aderida ao cartão (Drescher & Graner, 2002). Entretanto, quando utilizado mais de um disco do cartão, de 1,2 mm de diâmetro, houve inibição da

PCR, provavelmente devido a um desajuste na concentração da mix de reação e quantidade de DNA-alvo (Drescher & Graner, 2002).

Além do menor custo do FTA, por não necessitar da utilização de equipamentos sofisticados, como ultra freezer e centrífuga, este processo é bastante rápido e eficiente. Não incluindo os ciclos da PCR, o processo geral não leva mais de 2 h, sendo quase que independente do número de amostras. O método FTA pode armazenar mais de 200 amostras e cada amostra pode ser usada como molde de no mínimo 20 a 30 PCRs (Tsukaya *et al.*, 2005).

2.4 Métodos de detecção

Como para outras bactérias de solo fitopatogênicas os métodos de controle de *R. solanacearum* são limitados e não são muito eficientes. Técnicas convencionais de identificação e confirmação bacteriana são laboriosas e consomem muito tempo, em geral, maiores que duas semanas, além de não serem suficientemente sensíveis e específicas (Wullings *et al.*, 1998; Poussier & Luisetti, 2000).

O controle efetivo da MB depende da confiabilidade de detecção no estágio latente do patógeno. Portanto, se faz necessária a utilização de métodos rápidos, específicos e sensíveis que possam detectar baixos níveis que o patógeno pode ocorrer em tubérculos infectados naturalmente (Seal & Elphinstone, 1994). Análises convencionais se baseiam na detecção de extratos de amostras de tecido vascular de 200 tubérculos por lote de 25 toneladas de batata, através de testes de imunofluorescência (IF) (Janse, 1988) e/ou isolamento seletivo (Elphinstone, 1996). Para confirmar a presença do patógeno, as colônias isoladas em meio semi-seletivo são identificadas através de testes bioquímicos e submetidas a teste de patogenicidade em tomate (Janse, 1988; Wullings *et al.*, 1998)

A detecção de populações baixas do patógeno é extremamente difícil, e o erro amostral aumenta com o aumento populacional do hospedeiro ou partes do mesmo. Na prática, protocolos adotados pela União Européia (EU) para *R. solanacearum* assumem 95% de probabilidade de boa proteção (COUNCIL directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, 1998).

Neste contexto, a especificidade é definida como a capacidade de detectar o organismo de interesse na ausência de falsos positivos e negativos. No entanto, sensibilidade relaciona-se ao baixo número confiável do patógeno detectado por análise ou amostra. No caso de bactérias, o nível de sensibilidade de diferentes técnicas para detecção em tecido vegetal é dado em unidades formadoras de colônias (UFC).mL⁻¹. A Tabela 1 mostra a sensibilidade de alguns métodos de detecção, dada em UFC.mL⁻¹ (López *et al.*, 2003).

TABELA 1. Sensibilidade de métodos de detecção bacteriana*. Porto Alegre, RS, 2008.

Método de detecção	Sensibilidade (UFC.mL ⁻¹)
Isolamento em meio de cultivo	10-10 ²
IF	10 ³
PCR	10 ³ -10 ⁴
ELISA	10 ⁵ -10 ⁶

*Fonte: López *et al.*, 2003.

Técnicas sorológicas oferecem uma alternativa sensível para detecção de *R. solanacearum* e envolvem métodos como DAS-ELISA, NCM-ELISA e microscopia de IF (Robinson-Smith *et al.*, 1995). ELISA permite o processamento de um grande número de amostras de forma rápida e econômica. Entretanto, estas técnicas possuem sensibilidade e especificidade limitadas, podendo ocasionar reações cruzadas com outras bactérias quando anticorpos policlonais são utilizados (Janse, 1988; Elphinstone *et al.*, 1998). Entretanto, o problema de especificidade pode ser diminuído com o uso de

anticorpos monoclonais (Griep *et al.*, 1998; López *et al.*, 2003). Além disso, a sensibilidade pode ser aumentada com o uso de enriquecimento prévio a análise, podendo chegar a 10^2 UFC.mL⁻¹ (López *et al.*, 2001).

Anticorpos monoclonais foram desenvolvidos com sucesso para detecção de *R. solanacearum* tanto quando foram analisados tubérculos inoculados com sintoma de MB, como com tubérculos assintomáticos. A sensibilidade obtida através de ELISA foi de 10^6 UFC.mL⁻¹ e através de IF foi de 10^5 UFC.mL⁻¹. Entretanto, quando as mesmas amostras foram submetidas a PCR houve uma maior sensibilidade de detecção, já que foi possível obter resultado positivo para *R. solanacearum* em um maior número de amostras infectadas (Singh & Trevors, 2001).

Com o advento da biologia molecular, nova abordagem no diagnóstico de doenças bacterianas tornou-se possível (Martins, 2000). A PCR surge então como uma alternativa para a detecção de bactérias fitopatogênicas devido sua alta sensibilidade e especificidade (Seal *et al.*, 1993; Pstrik & Maiss, 2000). Porém, a sensibilidade da PCR pode ser limitada pela sensibilidade e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, os quais devem reconhecer a seqüência-alvo em questão. Além disso, a *Taq* DNA polimerase é sensível a inibidores, fatores presentes nas amostras e a algumas substâncias químicas utilizadas na extração do DNA que podem interferir na amplificação do DNA-alvo (Pstrik & Maiss, 2000).

A confiabilidade dos métodos de detecção por PCR depende, em certo grau, da pureza e do número de seqüências-alvo. Frequentemente é requerido um enriquecimento para aumentar a sensibilidade da PCR e superar os problemas do baixo número de patógenos nas amostras a serem analisadas (Lampel *et al.*, 2000). Entretanto, bactérias, e o meio de cultivo onde são postas a crescer, contêm muitas substâncias que

podem interferir na PCR. Além disso, bactérias intactas podem sofrer autólise e destruir seu próprio DNA (Rogers & Burgoyne, 1997).

Além do enriquecimento, outros métodos podem ser empregados, como separação imunomagnética e filtros, como o *FTA[®] Cards Whatman*, onde ambos os métodos visam o aumento da concentração do microrganismo e a remoção de potenciais inibidores da PCR (Lampel *et al.*, 2000). Conseqüentemente, protocolos eficientes de extração de DNA, enriquecimento, *nested*-PCR e PCR quantitativo são aconselháveis (López *et al.*, 2001)

Mais recentemente, alguns protocolos de detecção de bactérias fitopatogênicas através de PCR quantitativa têm sido desenvolvidos (Schaad *et al.*, 2007). Com este novo método, a quantificação da fluorescência durante toda a reação, prove uma análise em “tempo-real” da reação cinética, permitindo a quantificação do DNA-alvo. A medição da fluorescência durante toda a PCR, elimina os processos necessários após a reação, tal como, eletroforese em gel e o uso de brometo de etídeo para corar o DNA-alvo, reduzindo prováveis contaminações. Esta automatização da técnica permite o processamento de amostras em larga escala e a interpretação dos dados pode ser apresentada como uma conclusão qualitativa, como presença ou ausência do DNA amplificado. Alternativamente, a análise em tempo real pode quantificar o DNA presente na amostra. Além disso, quatro diferentes corantes fluorescentes podem ser adicionados a uma simples reação, permitindo múltiplas reações, usando diferentes sondas para o mesmo patógeno ou para patógenos diferentes (Weller *et al.*, 2000; Weller *et al.*, 2001).

Através de PCR quantitativa baseada no método de *Molecular Beacons* foi possível a detecção de 10^3 - 10^4 UFC.mL⁻¹ em extrato de tubérculos batata (Van Der

Wolf *et al.*, 2001). Também foram testados isolados de outras bactérias fitopatogênicas para verificar a presença de falso-positivos, comprovando a efetividade do método.

A sensibilidade de vários métodos de detecção de *R. solanacearum* em tubérculos de batata foi testada por Elphinstone, (1996), sendo possível detectar o patógeno através de todos os métodos, incluindo o cultivo em meio semi-seletivo, ELISA, IFI, PCR com os oligos OLI1 e Y2, e ensaio com sementes de tomateiro. Com este trabalho através de *nested*-PCR foi possível detectar 10 células.mL⁻¹ em plantas homogeneizadas, enquanto que com os outros métodos foi possível detectar 10^4 células.mL⁻¹.

Muitas vezes, para que haja um aumento na sensibilidade das técnicas de detecção bacteriana, um enriquecimento prévio em meio líquido ou sólido, é aconselhável (López, 2003). A combinação de crescimento bacteriano em meio semi-seletivo unido à detecção por PCR, vem sendo denominada de bio-PCR (Schaad *et al.*, 1995). Com este método há a minimização de possíveis substâncias inibidoras da PCR, além de reduzir o número de falso-positivos e aumentar significativamente a sensibilidade de detecção. A sensibilidade da bio-PCR quando suspensões ou homogeneizados de tomate contendo *R. solanacearum* foram crescidos em meio semi-seletivo SMSA foi de 10^2 UFC.mL⁻¹ e de 10^3 UFC.mL⁻¹ para homogeneizados de batata (Seal *et al.*, 1993; Martins, 2000), demonstrando que a sensibilidade da PCR pode ser aumentada 10 vezes quando há um enriquecimento em meio SMSA. A sensibilidade do método de lise celular por aquecimento também foi aumentada quando tubérculos de batata foram homogeneizados com 0,05 M NaOH antes da PCR.

Através da técnica de bio-PCR, utilizando o meio de enriquecimento PCCG para amostras de solos infectados artificialmente com *R. solanacearum*, foi obtida uma sensibilidade de 10^2 células.g⁻¹ de solo seco. Com este enriquecimento prévio, o DNA

fica livre de partículas de solo que poderiam inibir a efetividade da *Taq* DNA polimerase, tornando possível a detecção de células bacterianas viáveis presente no solo (Ito *et al.*, 1998). Já, através da técnica de imunocaptura, que consiste em aplicar anticorpos policlonais contra a bactéria-alvo para separá-la do meio, quando aliada à PCR foi possível detectar aproximadamente 10^5 UFC.mL⁻¹ de *R. solanacearum* em plantas de tomate inoculadas artificialmente (Dittapongpitch & Surat, 2003).

Análises por PCR convencional podem ser realizadas em menos de 12 h, entretanto sua sensibilidade pode ser consideravelmente inferior à obtida através de bio-PCR. O uso de meio modificado SMSA é altamente confiável. No entanto, são necessários de três a quatro dias para o isolamento do patógeno. Através de enriquecimento prévio ao PCR quantitativo foi possível detectar cerca de 20 células.mL⁻¹ da bactéria em extratos de batata diluídos (Schaad *et al.*, 2007).

Protocolos de *TaqMan*[™] PCR têm sido desenvolvidos para detecção de algumas bactérias fitopatogênicas, como *R. solanacearum*, *Agrobacterium* spp. e *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Estes protocolos têm sido equivalentes ou até mesmo melhores que os obtidos com PCR convencional. Entretanto, análises diretas de tubérculos de batata tanto de *R. solanacearum*, como de *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* são variáveis, devido ao baixo número populacional da bactéria nos tubérculos e a presença de inibidores de PCR nas amostras. O enriquecimento celular prévio, usando caldo SMSA durante 96 h, assim como de outros meios de cultivo antes do *TaqMan*[™] PCR tem se mostrado promissor, sendo possível a detecção de 10^1 células.mL⁻¹ de *R. solanacearum* (Weller *et al.*, 2001).

2.5 Projeção de oligonucleotídeos iniciadores

Um dos objetivos básicos da busca de estratégias para projeção de oligos específicos é a definição e separação de grupos taxonômicos com base nestas

seqüências, como espécie e biovar (Arahal *et al.*, 2004). Como a projeção de oligos se baseia na especificidade de algumas seqüências de DNA que diferenciam as categorias-alvo, torna-se possível a projeção de quaisquer oligos desde que sejam constatadas diferenças entre tais seqüências (Rosato *et al.*, 2002). Entretanto, a projeção pode ser dificultada devido a anotação de seqüências não estar completa ou possuir alguns erros (Arahal *et al.*, 2004). Vários programas de computador, muitos deles disponíveis *on-line* com o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), podem ser usados para testar a especificidade *in silico* de uma determinada seqüência.

Diferentes estratégias podem ser utilizadas para a projeção de oligos específicos, como utilização de genes ribossomais, de patogenicidade, proteínas, seqüências plasmideais, além do uso de técnicas como RAPD e de hibridização subtrativa (Rosato *et al.*, 2002). Um grande número de métodos baseados em diagnóstico molecular usando seqüências de DNA específicas tem sido desenvolvido para a detecção de *R. solanacearum*. Entretanto, análises *in silico* têm mostrado que nem todos estes oligos e sondas disponíveis são específicos. Várias razões para estas discrepâncias são apontadas, como erros nas seqüências publicadas, na suposta especificidade e até mesmo de digitação dos oligos (Arahal *et al.*, 2004).

Tanto para *R. solanacearum*, como para outros patógenos, o DNA ribossomal, e especialmente o rDNA 16S, é a seqüência-alvo mais comumente usada para a busca de seqüências específicas de DNA. Não é em vão que esta seqüência gênica tem sido obtida mais freqüentemente e de um grande número de estirpes, descrevendo com maior acurácia o grupo consenso e a variabilidade intra-específica (Arahal *et al.*, 2004). A alta variabilidade de seqüências entre lócos ribossomais repetidos tem sido identificada como fonte de variação com um grau apropriado de instabilidade genética (Rogers & Burgoyne, 1997). Entretanto, as diferenças em um grupo de seqüências não

necessariamente refletem a variabilidade verídica, já que estas diferenças podem ser erros previstos, gerados durante as reações de amplificação e seqüenciamento (Arahal *et al.*, 2004).

Algumas regiões do rDNA 16S têm sido utilizadas como molde para a projeção de oligos específicos para *R. solanacearum* (Martins, 2000), como o oligo específico OLI1, junto com o oligo não específico Y2, que detectam *R. solanacearum*, *R. syzygii* e BDB (Seal *et al.*, 1993), gerando um fragmento de 288 pb. Também foram identificados isolados europeus de *R. solanacearum* através de oligos projetados com base na seqüência rDNA 16S (Boudazin *et al.*, 1999). Os resultados de PCR não mostraram uma divisão clara dos isolados usando os oligos D1-B, projetados para detectar a divisão I e D2-B ou OLI1-Z, projetados para a divisão II. Dois dos isolados de biovar 1 testados não geraram produtos de amplificação com os oligos projetados para detectar a divisão 2, indicando que não há uma correspondência estrita entre biovar e divisão de isolados com base em análise de seqüências de rDNA 16S.

Além do rDNA 16S, outras seqüências têm sido utilizadas para a projeção de oligos para a detecção de *R. solanacearum*, como as regiões ITS e rDNA 23S. As seqüências ITS, conhecidas por sua alta variabilidade por serem elementos não funcionais, podem ser utilizadas para a caracterização intra-específica, além de identificação e caracterização em nível específico (Jensen *et al.*, 1993). Estudos mostram que os oligos RsolT2 e RsolT3, projetados a partir de seqüências de rDNA 23S, são específicos a estirpes não européias e européias, respectivamente (Timms-Wilson *et al.*, 2001). Entretanto, é incerto que estirpes de diferentes regiões geográficas possuam diferenças dentro da seqüência rDNA 23S (Arahal *et al.*, 2004).

Oligos também podem ser projetados a partir de seqüências de DNA que codificam proteínas que podem ser específicas para o microrganismo de interesse. Este

é o caso do gene *pehA* (poligalactorunase) (Huang & Schell, 1990), utilizado para a amplificação a partir do DNA de 57 isolados de todas as biovars de *R. solanacearum* (Gillings *et al.*, 1993).

Uma desvantagem do uso de genes que codificam um produto específico para a projeção de oligos é que normalmente estão presentes na forma de cópia simples na célula, o que pode acarretar numa diminuição considerável da sensibilidade se comparada com genes que possuem múltiplas cópias, tais como rDNA 16S (Pastrik & Maiss, 2000). Embora, a presença de múltiplas cópias de rDNA 16S em células bacterianas aumentarem a sensibilidade, os oligos projetados a partir destas seqüências não têm sido muito específicos (Seal *et al.*, 1993; Weller *et al.*, 2000).

Plasmídeos múltiplas-cópia também têm sido utilizados na projeção de oligos para detecção de bactérias fitopatogênicas (Dreier *et al.*, 1995; McManus *et al.*, 1995). Em geral, o uso de tal DNA extracromossomal não é indicado, pois são potencialmente transferidos para outras bactérias. Uma exceção pode ser o uso de genes presentes em megaplasmídeos, os quais possuem baixas chances de serem transferidos horizontalmente (Schaad & Frederick, 2002).

Vários são os oligos projetados a partir de RAPD. Os produtos de PCR gerados por RAPD do organismo-alvo e de outras bactérias são comparados, e uma única banda é removida do gel, clonada e posteriormente seqüenciada. Usando a seqüência de um único fragmento de DNA, novos oligos podem ser gerados (Schaad & Frederick, 2002).

Através de hibridização subtrativa foram projetados oligos específicos para biovar 2 (raça 3) de *R. solanacearum* (Fegan *et al.*, 1998). A projeção de oligos utilizando esta técnica, também possibilitou distinguir raças estritamente relacionadas de *R. solanacearum* (Cook & Sequeira, 1991).

Com a análise de seqüências de inserção foi possível estudar a diversidade genética de estirpes da raça 1 de *R. solanacearum*, além de projetar oligos específicos para sua detecção. O número de fragmentos gerados variou de quatro a quatorze, o que torna possível sua utilização na caracterização de estirpes da raça 2 de *R. solanacearum* (Lee *et al.*, 2001).

Desta forma, a projeção de oligos específicos permite segurança na detecção de fitopatógenos, obtendo-se melhor entendimento de um patossistema e, conseqüentemente, a obtenção de uma maior eficiência no controle de doenças economicamente importantes (Moura *et al.*, 2005; Santana *et al.*, 2006).

CAPÍTULO II

3 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA DETECÇÃO DE BIOVARES

1 E 2 DE *Ralstonia solanacearum* EM BATATA

3.1 INTRODUÇÃO

Ralstonia solanacearum vem sendo classificada em raças em relação à espécie hospedeira, e em biovares com base na versatilidade de metabolizar dissacarídeos (celobiose, lactose e maltose) e álcoois hexose (manitol, sorbitol e dulcitol) (Hayward, 1994). Dois grupos de estirpes são capazes de infectar a cultura da batata: as estirpes da biovar 1, que correspondem à raça 1, com grande número de hospedeiros, maior capacidade de persistir no solo e predominar em regiões de clima quente; e as estirpes da biovar 2, correspondentes à raça 3, que infectam basicamente a batata em regiões de clima temperado e apresentam maior capacidade de produzir infecções latentes. Nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil há uma predominância da biovar 2 em batata, embora a biovar 1 também possa ser encontrada (Hayward, 1991; Silveira *et al.*, 2002).

Medidas mais eficientes no controle da murcha bacteriana são ações preventivas, como o uso de tubérculos-semente livres do patógeno e o plantio em áreas não infestadas. O manejo integrado da doença abrange o uso de cultivares resistentes e de práticas culturais que levam em consideração a biovar que está presente no local infectado. Desta forma, torna-se essencial o conhecimento das populações locais de *R.*

solanacearum afim de proporcionar uma melhor compreensão a respeito do seu mecanismo de resistência.

Visando o conhecimento das populações do patógenos, várias estratégias podem ser utilizadas para a projeção de oligos específicos, como utilização de genes ribossomais, de patogenicidade, proteínas, seqüências plasmideais, além do uso de técnicas como RAPD e de hibridização subtrativa. Tanto para *R. solanacearum*, como para outros patógenos, o DNA ribossomal, e especialmente o rDNA 16 S, tem sido a seqüência-alvo mais utilizada para a busca de seqüências específicas de DNA, descrevendo com maior acurácia o grupo consenso e a variabilidade intra-específica (Arahal *et al.*, 2004).

Considerando a carência de oligonucleotídeos específicos para a detecção e diferenciação das biovars 1 e 2 de *R. solanacearum*, este trabalho objetivou projetar oligos para a biovar 1 baseados no gene *pehS* e para a biovar 2 a partir do gene UDP-N-acetilglucosamina 4,6-dehidratase. Os produtos destes genes regulam a produção de poligalacturonase (PG), envolvida na virulência deste patógeno e, controle da síntese de dissacarídeos, respectivamente.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Estirpes de *Ralstonia solanacearum* e extração do DNA

Estirpes das biovares 1 e 2 de *R. solanacearum* armazenadas em água destilada esterilizada (ADE) a 4 °C e glicerol 20% (glicerol-água) a -20 °C, fazem parte do banco de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Fitobacteriologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS (Tabela 2) e foram utilizadas para a padronização da PCR com os oligos PehS F/ PehS R e UDP1 F/ UDP R.

TABELA 2. DNA das estirpes de *Ralstonia solanacearum* utilizadas para a padronização dos oligonucleotídeos iniciadores PehS F/ PehS R e UDP1 F/ UDP R. Porto Alegre, RS, 2007.

Identificação	Hospedeiro	Origem	Fonte	Biovar
1, 3-15	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Rio Grande do Sul	Silveira, J.R.P. *	1
45-54	<i>Nicotiana tabacum</i>	Rio Grande do Sul	Silveira, J.R.P. *	2
R56, R530	<i>Solanum tuberosum</i>	Rio Grande do Sul	Silveira, J.R.P. *	2

* Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Rio Grande do Sul, BR.

Para recuperação de células viáveis de *R. solanacearum*, 10 µL das células bacterianas preservadas foram adicionadas a 1.000 µL de caldo nutriente (extrato de carne, 3 g.L⁻¹ e peptona bacteriológica, 5 g.L⁻¹) e submetidos a agitação durante 24-48 h a 28 °C. A seguir, 5 µL destas suspensões foram transferidos para o meio SPA (sacarose, 20 g.L⁻¹; peptona, 5 g.L⁻¹; K₂HPO₄, 0,5 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g.L⁻¹; agar, 15 g.L⁻¹), acrescido de 0,5% de 2,3,5 cloreto de trifetil tetrazólio (Hayward, 1960) e incubadas a 28 °C por 24 h. A extração do DNA de *R. solanacearum* foi realizada

através de lise alcalina, utilizando o protocolo adaptado por Duarte *et al.* (2004) de De Boer & Wattiez, (1995).

3.2.2 Análise *in silico* e projeção de oligonucleotídeos iniciadores

Para a projeção dos oligos as seqüências foram rastreadas a partir do Banco de genes ENTREZ do NCBI (2006) para os genomas das linhagens K60 (biovar 1) e UW551 (biovar 2). As seqüências foram editadas para o modo FASTA e submetidas a Plataforma BLAST (GenBank, 2006) para análise de similaridade das seqüências com outras seqüências genômicas depositadas no GenBank. Posteriormente, as linhagens foram submetidas à plataforma Multalin/INRA (Expasy, 2006) para o alinhamento múltiplo. Devido a falta do genoma completo seqüenciado da biovar 1, o alinhamento de seqüências para a projeção de oligos para a detecção da biovar 2 foi realizado com base na linhagem GM1000 (biovar 3) de *R. solanacearum*, cuja seqüência foi rastreada a partir do banco de dados do genoma desta estirpe (Salanoubat *et al.*, 2006). Após o alinhamento entre as seqüências, as diferenças genômicas foram utilizadas como molde para a projeção dos oligos específicos através do programa Oligo Perfect (Invitrogen, 2006). As temperaturas escolhidas foram em média de 57 °C para ambos pares de oligos. O conteúdo de GC ficou em torno de 50 %. Os oligos também foram submetidos à plataforma BLAST (GenBank, 2006) para verificar a especificidade.

Para a detecção da biovar 1, oligos foram projetados a partir do gene *pehS*, gerando um fragmento de 500 pb (PehS F: 5' GGCTGTATGGCTTGGTCTAC 3' / PehS R: 5' GACCAGGCTGTCCAGATAGA 3'). Para a biovar 2, oligos baseados no gene de UDP-N-acetilglucosamina 4,6-dehidratase foram utilizados, gerando fragmento de 354 pb (UDP1 F: 5' CACGTATTTTCGTCTCCCTCT 3' / UDP1 R: 5' ACGATCTCATTGATGCTCAG 3').

3.2.3 PCR com os oligonucleotídeos iniciadores projetados para detecção das biovares 1 ou 2

Diferentes temperaturas de pareamento e concentrações dos reagentes foram testadas para a otimização das reações. A PCR foi realizada em termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.). Após o ajuste da reação, a PCR foi executada com um volume final de 10 μ L, para ambos pares de oligos, composta por 1,0 μ M de oligos; 1 x tampão de reação (20 mM Tris pH 8,4; 50 mM KCl); 2,0 μ M MgCl₂; 0,2 μ M dNTP (Invitrogen); 1 U/R *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e aproximadamente 100 ng de DNA-molde. As seguintes condições de PCR foram utilizadas, onde foram realizados 20 ciclos com cada temperatura de pareamento: desnaturação inicial de 94 °C por 2 min; 20 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 s), pareamento (65 °C por 30 s), extensão (72 °C por 30 s); acrescido de 20 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 s), pareamento (55 °C por 30 s), extensão (72 °C por 30 s); com uma extensão final de 72 °C durante 10 min. A especificidade dos oligos projetados foi testada com as estirpes de referência, listadas na Tabela 2, usando água Mili-Q como controle negativo. Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1,5 % (Invitrogen), marcados com brometo de etídio e documentados através de câmera fotográfica (*Sony Cyber-Shot*).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análise *in silico* e projeção de oligonucleotídeos iniciadores

O genoma da linhagem UW551 (biovar 2) encontra-se completamente seqüenciado e disponível no Banco de genes ENTREZ do NCBI (2006). Entretanto, há poucas seqüências disponíveis para a linhagem K60 (biovar 1), dentre elas, a que apresentou maior possibilidade de projeção de oligos específicos para detecção da biovar 1 foi a seqüência do gene *pehS*, cujo produto está envolvido na produção de PG, proteína envolvida na virulência de *R. solanacearum*. Não foi encontrada similaridade representativa entre as seqüências dos genes *pehS* para os genomas das linhagens K60 (biovar 1) e UW551 (biovar 2), assim como para outras bactérias, quando submetidas à plataforma BLAST (GenBank, 2006), tornando possível a projeção de oligos específicos para a detecção de biovar 1 de *R. solanacearum*.

A projeção de oligos para a detecção de biovar 2 baseou-se no gene UDP-N-acetilglucosamina 4,6-dehidratase, envolvido no controle da síntese de dissacarídeos produzidos por *R. solanacearum*. A escolha deste gene se deve a sua provável ausência no genoma de estirpes de biovar 1, já que estirpes desta biovar não metabolizam os dissacarídeos celobiose, lactose e maltose. Esta idéia teve como base estudos comparativos das ORFs da estirpe UW551 (raça 3, biovar 2) com o genoma completo da estirpe GMI1000 (raça 1, biovar 3) onde foi possível verificar que pelo menos parte do fenótipo que determina as biovars resulta da transferência horizontal de genes

(Gabriel *et al.*, 2006). Portanto, devido a ausência desta seqüência em bancos de dados para a linhagem K60 e a necessidade de projeção de oligos específicos que detectem somente estirpes da biovar 2 de *R. solanacearum*, este gene foi submetido à comparação de seqüências disponíveis no GenBank por meio da Plataforma BLAST (GenBank, 2006), para as linhagens UW551 (biovar 2) e GM1000 (biovar 3), assim como para outras bactérias. Estas seqüências apresentaram regiões heterólogas o que possibilitou a projeção de oligos para detecção de biovar 2. O alinhamento das seqüências do gene UDP-N-acetilglucosamina 4,6-dehidratase para as linhagens UW551 (biovar 2) e GM1000 (biovar 3), com os oligos específicos projetados para a detecção de biovar 2 de *R. solanacearum*, são apresentados (Figura 1).

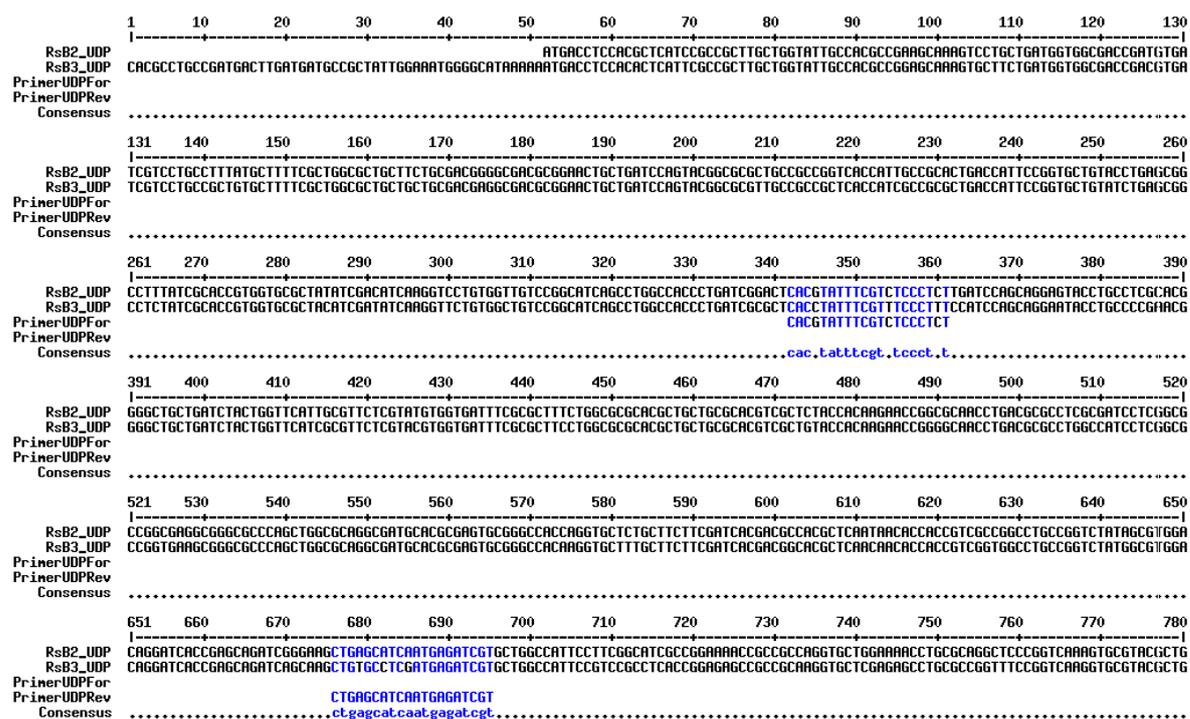


FIGURA 1. Alinhamento múltiplo das seqüências parciais correspondentes ao gene UDP-N-acetilglucosamina 4,6-dehidratase para as linhagens UW551 (RSB2_UDP) e GM1000 (RSB3_UDP), com os oligos UDP1 F (PrimerUDPFor) e UDP1 R (PrimerUDPRev). Porto Alegre, RS, 2006.

3.3.2 PCR com os oligonucleotídeos iniciadores projetados para detecção das biovares 1 ou 2

Amostras de DNA das biovares 1 e 2 de *R. solanacearum*, foram testadas com os oligos projetados para detectar as biovares 1 (PehS F/PehS R) ou 2 (UDP1 F/UDP1 R), em diferentes condições de reação. Os oligos projetados para detectar a biovar 1 amplificaram produtos inespecíficos e não o fragmento de DNA do tamanho esperado de 500 pb (Figura 2). Nas mesmas condições de reação, o DNA de todas as amostras testadas amplificaram com os oligos projetados para a detecção de biovar 2, a partir da seqüência do genoma da estirpe UW551 (biovar 2) de *R. solanacearum* (Figura 3), gerando um fragmento de 354 pb, conforme o esperado.

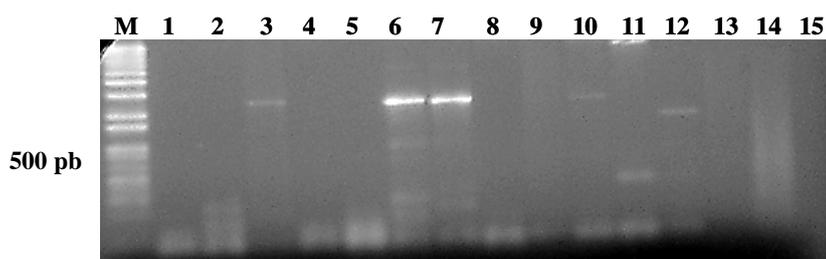


FIGURA 2. Amplificação de fragmentos de DNA com os oligonucleotídeos iniciadores PehS F/PehS R para o gene *peh*, regulador da produção de poligalactorulase. M, marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen); 1-14, DNA genômico de *Ralstonia solanacearum*; 1, estirpe 1 (biovar 1); 2, estirpe 3 (biovar 1); 3, estirpe 4 (biovar 1); 4, estirpe 5 (biovar 1); 5, estirpe 6 (biovar 1); 6, estirpe 7 (biovar 1); 7 estirpe 8 (biovar 1); 8, estirpe 9 (biovar 1); 9, estirpe 11 (biovar 1); 10, estirpe 13 (biovar 1); 11, estirpe 45 (biovar 2); 12, estirpe 47 (biovar 2); 13, estirpe R56 (biovar 2); 14, estirpe R530 (biovar 2); 15, água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2007.

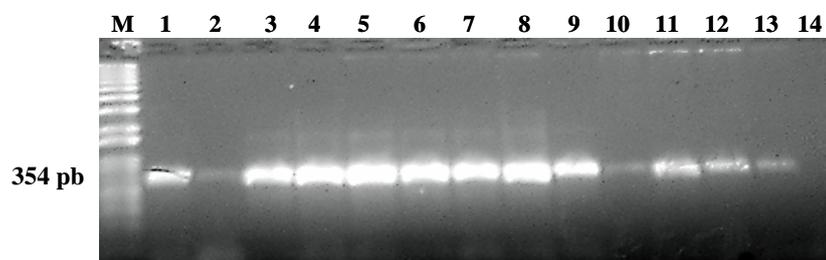


FIGURA 3. Amplificação de fragmentos de DNA com os oligonucleotídeos iniciadores UDP1F/UDP1R baseados no gene de UDP-N-acetilglucosamina 4,6-dehidratase, cujo produto está envolvido no controle da síntese de dissacarídeos. M, marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen); 1-14, DNA genômico de *Ralstonia solanacearum*; 1, estirpe 1 (biovar 1); 2, estirpe 3 (biovar 1); 3, estirpe 4 (biovar 1); 4, estirpe 5 (biovar 1); 5, estirpe 6 (biovar 1); 6, estirpe 7 (biovar 1); 7 estirpe 8 (biovar 1); 8, estirpe 9 (biovar 1); 9, estirpe 11 (biovar 1); 10, estirpe 13 (biovar 1); 11, estirpe 47 (biovar 2); 12, estirpe R56 (biovar 2); 13, estirpe R530 (biovar 2); 14, água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2007.

Estes resultados não foram os esperados, já que os oligos foram projetados a partir de seqüências específicas depositadas no Banco de Genes ENTREZ do NCBI (2006). Entretanto, mostraram a dificuldade de projeção de oligos para diferenciar as biovars 1 e 2 de *R. solanacearum*. Além disso, a falta de sensibilidade dos oligos também pode ser devido a anotação da seqüência não estar completa ou possuir algum tipo de erro, como foi encontrado para vários outros oligos usados para detecção de *R. solanacearum* (Arahal *et al.*, 2004).

Outro problema, que pode estar relacionado com a falta de especificidade dos oligos projetados para a detecção da biovar, 1 foi a utilização de um gene que codifica produto específico, presente na forma de cópia simples na célula. O que pode acarretar uma diminuição na eficiência de detecção se comparada com genes com múltiplas cópias (Pastrik & Maiss, 2000).

CAPÍTULO III

4 MÉTODOS DE DETECÇÃO

4.1 INTRODUÇÃO

Ralstonia solanacearum é um patógeno vascular que pode causar a MB em plantas de batata e o apodrecimento de tubérculos. Entretanto, também pode sobreviver formando grandes populações bacterianas em tubérculos sem causar o aparecimento de sintomas, na forma de infecções latentes (Ciampi *et al.*, 1980). A disseminação da biovar 2 de *R. solanacearum* para regiões livres do patógeno pode ser atribuída à entrada de tubérculos-semente com infecções latentes, nas quais o microrganismo apresenta-se viável e patogênico, podendo causar a doença quando em condições favoráveis durante o cultivo (Janse, 1988; Ciampi *et al.*, 1980).

Estudos epidemiológicos e ecológicos da distribuição do patógeno no ambiente são seriamente dificultados pela baixa eficiência dos métodos de detecção, especialmente quando a concentração do patógeno é baixa ou se apresenta na forma de infecções latentes. Devido aos diversos surtos de MB na cultura da batata detectados em diferentes países da União Européia, métodos mais sensíveis, que sejam capazes de detectar o patógeno em infecções latentes, têm sido aprimorados para que possam assegurar medidas quarentenárias eficientes. Portanto, um grande número de tubérculos deve ser amostrado, de forma rápida e eficaz. Dentro deste contexto, o cartão FTA surge como uma alternativa, já que reduz os passos de obtenção do DNA, transporte,

purificação e estocagem e, conseqüentemente, o custo e tempo requerido para o processamento do DNA. Esta tecnologia aliada tanto à PCR qualitativa, como à PCR quantitativa surge, então, como uma alternativa para a detecção de bactérias fitopatogênicas devido sua alta sensibilidade e especificidade.

Este trabalho teve como objetivo aperfeiçoar o método de detecção de *R. solanacearum* visando estudos epidemiológicos da MB. Tal método necessita ser rápido, reproduzível e aplicável a um grande número de amostras. Neste trabalho, a eficiência do método FTA foi avaliada em comparação com outros métodos de obtenção do DNA e posterior utilização em PCR qualitativa e quantitativa.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Estirpes de *Ralstonia solanacearum*

Estirpes das biovares 1, 2 e 3 de *R. solanacearum* armazenadas em água destilada esterilizada (ADE) a 4 °C e glicerol 20% (glicerol-água) a -20 °C, fazem parte do banco de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Fitobacteriologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS e foram utilizadas para a padronização dos métodos de extração de DNA bacteriano e como controle positivo de PCR (Tabela 3).

TABELA 3. Estirpes de *Ralstonia solanacearum* utilizadas para a padronização dos métodos de extração de DNA bacteriano. Porto Alegre, RS, 2007.

Identificação	Hospedeiro	Origem	Fonte	Biovar
216, 221, 256, 257	<i>Solanum tuberosum</i>	Distrito Federal	Lopes, C.A. ¹	1
213, 245, 253	<i>S. tuberosum</i>	Distrito Federal	Lopes, C.A. ¹	2
93	<i>S. tuberosum</i>	São Paulo	Rodrigues, J.N. ²	1
126	<i>S. tuberosum</i>	São Paulo	Rodrigues, J.N. ²	2
66	<i>Lycopersicon esculentum</i>	São Paulo	Takatsu, A. ²	3
1, 3-15	<i>L. esculentum</i>	Rio Grande do Sul	Silveira, J.R.P. ³	1
45-54	<i>Nicotiana tabacum</i>	Rio Grande do Sul	Silveira, J.R.P. ³	2
R56, R530	<i>S. tuberosum</i>	Rio Grande do Sul	Silveira, J.R.P. ³	2

¹Embrapa Hortaliças, Distrito Federal, BR.

²Instituto Biológico, São Paulo, BR.

³Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Rio Grande do Sul, BR.

Para recuperação de células viáveis de *R. solanacearum*, 10 µL das células bacterianas preservadas foram adicionadas a 1.000 µL de caldo nutriente (extrato de carne, 3 g.L⁻¹ e peptona bacteriológica, 5 g.L⁻¹) e submetidos a agitação durante 24-48 h a 28 °C. A seguir, 5 µL destas suspensões foram transferidos para o meio SPA

(sacarose, 20 g.L⁻¹; peptona, 5 g.L⁻¹; K₂HPO₄, 0,5 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g.L⁻¹; agar, 15 g.L⁻¹), acrescido de 0,5% de 2,3,5 cloreto de trifenil tetrazólio (Hayward, 1960) e incubadas a 28 °C por 24 h.

4.2.2 Obtenção das amostras de tubérculos de batata

Amostras de tubérculos-semente e consumo de batata foram coletadas nos municípios de São Francisco de Paula (SFP) e Ibiraiaras (IB), RS, em dezembro de 2007. Com o auxílio de seringas descartáveis de 1 mL/cc insulina U-100, sem agulha, amostras aleatórias de 100 tubérculos de cada variedade de batata foram coletadas por lavoura. Seringas foram fixadas na região do estolão, de cada tubérculo a ser amostrado, a cerca de 0,5 cm de profundidade e com auxílio do embolo as amostras foram succionadas e posteriormente, adicionadas a tubos de 15 mL (*Falcon*). O material coletado foi acrescido de ADE, na proporção 1:1, macerado e homogeneizado com um bastão de vidro. Este material foi utilizado na obtenção do DNA por *FTA® Cards Whatman*, bio-PCR, lise celular por aquecimento, e kit *GenSpin™ Plant DNA Purification- Whatman®*, para a detecção de *R. solanacearum* por PCR.

4.2.3 Amostras compostas

Três amostras compostas, obtidas conforme descrito no item 4.2.2., de 90, 99 e 100 tubérculos cv. Asterix, livres de *R. solanacearum*, acrescidas de 10, 1 e zero tubérculos infectados, respectivamente, foram homogeneizadas em ADE na proporção 1:1 e em solução tampão KH₂PO₄ 3 mM. Estas amostras, com zero, 1 e 10% de tecido infectado, foram submetidas ao método *FTA® Cards Whatman* (10 µL e 100 µL), bio-PCR (10 µL) e lise celular por aquecimento (100 µL). Este experimento foi conduzido por duas vezes.

4.2.4 Extração do DNA

A extração de DNA a partir de suspensões de células bacterianas de *R. solanacearum* e/ou tecido de tubérculos-semente e consumo de batata coletados nos municípios de SFP e IB, RS, em dezembro de 2007, foi feita pelos seguintes métodos:

4.2.4.1 Lise alcalina

Células bacterianas das estirpes (Tabela 3), cultivadas em caldo nutriente, sob agitação, durante 24-48 h a 28 °C, foram suspensas em 250 µL de tampão de extração de DNA (100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA; 1% SDS e 50 µg.mL⁻¹ de proteinase K) e incubadas por 3 h a 56 °C. As amostras foram acrescidas de 250 µL de acetato de amônio 7,5 M e centrifugadas (12.500 rpm, 15 min, 4 °C). O sobrenadante aquoso, contendo o DNA, foi coletado e precipitado com isopropanol (v/v). As amostras foram incubadas a -20 °C *overnight* e, então, centrifugadas (12.500 rpm, 25 min, 4 °C) e lavadas com etanol 70% (v/v). Posteriormente, as amostras foram secas, re-suspensas em 50 µL de água Mili-Q e 5 µL de RNase e armazenadas a -20 °C até o uso. A concentração de DNA foi estimada por visualização em eletroforese em gel de agarose 0,8% (Invitrogen).

4.2.4.2 Lise celular por aquecimento

Tecidos macerados de tubérculos-semente e consumo (100 µL) foram adicionados a tubos de 200 µL e colocados em bloco de aquecimento durante 4 min a 96 °C (Seal *et al.*, 1993). Após este período, as amostras foram submersas em gelo ou estocadas a -20 °C até a realização da PCR.

4.2.4.3 Bio-PCR e lise celular por aquecimento

Para realização da bio-PCR (Schaad *et al.*, 1995), tubérculos macerados (10 µL) foram adicionados a tubos de 1,5 mL, contendo 1 mL de meio semi-seletivo SMSA

(peptona, 10 g.L⁻¹; glicerol, 10 g.L⁻¹; casamino ácido, 1 g.L⁻¹), acrescido de bacitracina, 25 mg.L⁻¹; sulfato de polimixina B, 100 mg.L⁻¹; cloranfenicol, 5 mg.L⁻¹; penicilina-G, 0,5 mg.L⁻¹; cristal violeta, 5 mg.L⁻¹ e 2,3,5 cloreto de trifenil tetrazólio, 50 mg.L⁻¹ (Englebrecht, 1994; Elphinstone, 1996), submetidos à agitação por 24-48 h a 28 °C. Posteriormente, 100 µL foram transferidos para tubos de 200 µL e colocados em bloco de aquecimento durante 4 min a 96 °C. Após, as amostras foram submersas em gelo para a realização da PCR ou estocadas a -20 °C até o uso.

4.2.4.4 FTA[®] Cards Whatman

Cones da região do estolão do tubérculo, macerados com auxílio de um bisturi, assim como, 100 µL das amostras maceradas e homogeneizadas de tubérculos-semente e consumo de batata, foram aplicados sobre quadrados (2 X 2 cm), devidamente identificados, em cartão FTA. Depois de secar durante 3 h à temperatura ambiente (ou 1 h a 37 °C), discos de 1,2 mm de diâmetro foram retirados utilizando um cortador (*Harris*) e transferidos para microtubos de 200 µL. Entre as amostragens, o cortador foi desinfestado com álcool 70% (v/v). Os discos de papel foram lavados duas vezes, durante 5 min, com 200 µL do reagente FTA (*FTA Purification Reagent*), e, após, duas vezes, por 5 min, com 200 µL de tampão TE⁻¹ (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM, EDTA, pH 8,0). Posteriormente, as amostras foram secas durante 1 h a temperatura ambiente (ou 10 min a 56 °C), antes de proceder a PCR. O restante do cartão não utilizado foi armazenado dentro de sacos plásticos à temperatura ambiente. Tubérculos de batata infectados com *R. solanacearum*, oriundos de Criciúma, SC, foram utilizadas como controle positivo do método.

4.2.4.5 Eluição do DNA retido no *FTA*[®] *Cards Whatman*

Para eluição do DNA retido no cartão FTA, as amostras foram submetidas ao mesmo procedimento citado no item 4.2.4.4. Discos de FTA foram colocados em tubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 34 µL de solução alcalina (0,1 N NaOH; 0,3 M EDTA, pH 13,0) e mantidos a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, foram adicionados 66 µL de tampão Tris saturado com Cl (0,1 M, pH 7,0), durante 10 min. Após a adição do tampão Tris-Cl, o material foi vortexado durante 5 s, a cada 5 min até o término dos 10 min da reação. Posteriormente, os discos de 1,2 mm foram pressionados nos seus respectivos tubos e descartados. Para a realização da PCR qualitativa e PCR quantitativa, 1 µL da eluição foi adicionado a reação. Amostras de batata com presença de pus bacteriano, causado por *R. solanacearum* oriundas de Criciúma, SC, assim como as amostras de campo, foram utilizadas como controle positivo do FTA para verificar a efetividade do método e para determinação do limite de detecção do método *FTA*[®] *Cards Whatman*.

4.2.4.6 Kit para isolamento de DNA genômico

A extração de DNA genômico de *R. solanacearum* foi feita através do kit *GenSpin*TM *Plant DNA Purification* (Whatman), de acordo com as recomendações do fabricante. Tecido de tubérculos-semente e consumo de batata (20 mg) coletados nos municípios de SFP e IB, RS, foi macerado em 200 µL de tampão de homogeneização durante 1 min. Posteriormente, 25 µL do homogeneizado foram aplicados nos filtros *GenSpin Filter Basket* e centrifugados (14.000 rpm, 15 s). Para remover a água residual, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente nos tubos com as tampas abertas *overnight*. As amostras foram lavadas por duas vezes com 500 µL do *Wash Reagent* e centrifugadas (14.000 rpm, 1 min). O mesmo procedimento foi realizado com o *Rinse Reagent*. Após, o *GenSpin Filter Basket* foi colocado em um novo tubo, no qual foram

aplicados 150 μL de tampão TE para eluição do DNA (10 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH 8,0). As amostras foram incubadas durante 15 min a 70 °C, centrifugadas (14.000 rpm, 2 min). O material eluído foi armazenado a -20 °C até o uso e a concentração de DNA estimada por visualização em eletroforese em gel de agarose 0,8% (Invitrogen).

4.2.5 Determinação do limite de detecção do método *FTA*[®] *Cards Whatman*

Estirpes de *R. solanacearum* foram cultivadas em caldo nutritivo por 24 h a 28 °C. As concentrações de células no meio de cultura, de 1,00, 0,50, 0,25 e 0,10, foram determinada através de espectrofotometria (DO_{600}). Diluições sucessivas foram obtidas até 10^{-10} , a partir de $\text{DO}=0,1$. Dez microlitros de cada suspensão foram transferidos para placas contendo meio SPA, para contagem das células, ou cartões de FTA, além de serem submetidos à lise celular por aquecimento. Discos de 1,2 mm do FTA e 1 μL o DNA extraído por aquecimento foram utilizados em PCR qualitativa com os oligos OLI1 e Y2. As mesmas suspensões foram posteriormente testadas com os oligos RS-I e RS-II através de PCR qualitativa e quantitativa.

4.2.6 Eletroforese do DNA

A concentração dos géis de agarose (Invitrogen), relativa à separação e visualização dos fragmentos, foi de 0,8% (p/v) para DNA total, 1,5% (p/v) para os produtos de amplificação com os oligos OLI1 e Y2 e 2,0% (p/v) para os oligos RS-I e RS-II. As condições de eletroforese foram de 2 h e 30 min a 6 h, utilizando 30 a 50 V, dependendo das concentrações dos géis. O marcador de peso molecular 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen) foi usado como referência. Para posterior visualização, os géis foram marcados com brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), exposto a luz ultravioleta e documentado através de câmera fotográfica (*Sony Cyber-Shot*).

4.2.7 Métodos moleculares

4.2.7.1 PCR qualitativa

Os oligos OLI1 e Y2 (Seal *et al.*, 1993), projetados a partir da região do rDNA 16S, gerando um fragmento de amplificação de 288 pb, foram utilizados para todas as amostras testadas em PCR qualitativa. Além disso, foram utilizados os oligos RS-I e RS-II, que geram um fragmento de 93 pb, projetados a partir das regiões que flanqueiam a região do rDNA 16S para a seqüência do oligo OLI1 (Seal *et al.*, 1993; Weller *et al.*, 2000). Os oligos RS-I e RS-II foram utilizados para amostras obtidas por FTA e estirpes utilizadas como referência, extraídas pelo método de lise alcalina (Duarte *et al.*, 2004). Ambos os oligos foram submetidos ao programa *Oligo Analyser* para verificar possíveis problemas envolvendo pareamento errôneo. A PCR foi realizada em termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.), onde diferentes temperaturas de pareamento e concentrações de reagentes foram testadas para a padronização das reações, tomando como base a temperatura de fusão (TM) dos oligos usados. Após o ajuste da reação, para ambos pares de oligos, a PCR foi executada com um volume final de 10 ou 20 µL, composta por 1,0 µM de oligos; 1 x tampão de reação (20 mM Tris pH 8,4; 50 mM KCl); 2,0 µM MgCl₂; 0,2 µM dNTP (Invitrogen); 1 U/R *Taq* DNA polimerase ou *Platinum*[®] *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Os fragmentos gerados para estirpes-padrão das biovares 1 e 2 de *R. solanacearum* com oligos OLI1 e Y2 também foram submetidos à uma re-amplificação para aumentar a concentração de produtos para posterior seqüenciamento. Um microlitro do produto de amplificação destas reações foi utilizado em nova PCR com volume de 50 µL. Para esta reação, todos os reagentes foram utilizados na mesma concentração, exceto a concentração de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) que passou para 2 U/R.

As seguintes condições de PCR foram utilizadas para os oligos OL11 e Y2: desnaturação inicial de 94 °C por 2 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação (94 °C por 45 s), pareamento (68 °C por 20 s), extensão (72 °C por 20 s), com uma extensão final de 72 °C durante 10 min. Para os oligos RS-I e RS-II foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 15 s), pareamento (63 °C por 10 s) e extensão (72 °C por 15 s). Em todas as reações foi utilizada água Mili-Q como controle negativo.

4.2.7.2 PCR quantitativa

Os oligos RS-I e RS-II, após a padronização da PCR qualitativa, foram utilizados em PCR quantitativa, utilizando *SYBR*[®] *Green* como corante e *ROX Reference Dye* como normalizador da reação. A PCR quantitativa foi ajustada e executada com um volume final de 20 µL, composta por 1,0 µM de oligos; 1 x tampão de reação (20 mM Tris pH 8,4; 50 mM KCl); 2,0 µM MgCl₂; 0,2 µM dNTP (Invitrogen); 1 U/R *Platinum*[®] *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,1x de *SYBR*[®] *Green* e 0,0005x de *ROX Reference Dye*. Esta mix foi adicionada a microplacas PCR-96-HS-C (Axygen), usando 1 µL da suspensão do DNA eluído do cartão FTA como molde ou de estirpes utilizadas como referência, extraídas pelo método de lise alcalina.

As reações foram realizadas no Centro de Biotecnologia da UFRGS (Porto Alegre, RS) e no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia (UFRGS, Porto Alegre, RS), utilizando os equipamentos *Applied Biosystems*, modelo 7500 e 7300, respectivamente, para a quantificação absoluta das amostras. As seguintes condições de PCR foram utilizadas: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 15 s), pareamento (63 °C por 10 s) e extensão (72 °C por 15 s). A leitura da

fluorescência foi realizada a 60 °C por 35 s. Em todas as reações foi utilizada água Milli-Q como controle negativo.

4.2.8 Purificação dos produtos de amplificação para o seqüenciamento

Após a PCR com os oligos OLI1 e Y2 de volume final 50 µL, os produtos de DNA amplificados foram purificados em coluna QIAquick PCR (Quiagen). Seguindo as recomendações do fabricante do kit, o volume total dos produtos de amplificação de PCR foram aplicados no interior da coluna, acrescidos de 5 volumes de *Buffer PB*. As amostras foram centrifugadas (13.000 rpm, 60 s). A solução aquosa foi descartada do tubo coletor ao qual a coluna é fixada. A coluna foi então deslocada para remoção do volume a ser descartado e recolocada no tubo coletor, onde foram adicionados 0,75 ml de *Buffer PE*, e centrifugada (13.000 rpm, 60 s). O sobrenadante foi descartado e a coluna re-inserida no mesmo tubo e centrifugada (14.000 rpm, 60 s). Posteriormente, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml novo, acrescida de 30 µL do *Buffer EB* (10 mM Tris-Cl, pH 8,5), incubada durante 1 min a temperatura ambiente e centrifugada (13.000 rpm, 60 s). A coluna foi então descartada, permanecendo no tubo de 1,5 mL o DNA purificado. As amostras de DNA purificado foram, então, quantificadas em gel de agarose (Invitrogen).

4.2.9 Seqüenciamento e análise *in silico* dos produtos amplificados

Os fragmentos de DNA gerados pela amplificação das estirpes 216, 221 e 256 da biovar 1 e 213, 245 e 253 da biovar 2 de *R. solanacearum*, com os oligos OLI1 e Y2, após a purificação, foram enviados para seqüenciamento no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, RS. A reação foi realizada em um volume final de 6 µL, utilizando 30 a 50 ng de DNA molde e 2,5 pmol dos oligos OLI1 e Y2, em um seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare).

AS amostras foram editadas e submetidas à plataforma Multalin/INRA (Expasy, 2008), para o alinhamento múltiplo e verificar prováveis diferenças que possam servir para a projeção de oligos que diferenciem as biovars 1 e 2 de *R. solanacearum* e sejam usados em PCR quantitativa. As seqüências também foram comparadas às depositadas no GenBank através da plataforma BLAST (GenBank, 2008).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Sensibilidade da PCR na detecção de *Ralstonia solanacearum* com diferentes métodos de extração de DNA de tecidos com diferentes níveis de infecção

Os resultados obtidos (Tabela 4) mostraram que é possível detectar um tubérculo infectado numa amostra composta de 100 tubérculos. Também ficou comprovado que a retirada de uma pequena porção de tecido da região do estolão do tubérculo é suficiente para detectar *R. solanacearum* nestas condições. No entanto, a eficiência de detecção da presença de *R. solanacearum* por PCR variou com o método de extração de DNA e com a incidência nos tubérculos testados. O protocolo do FTA preconiza a utilização de 10 µL da amostra. Entretanto, este volume não foi suficiente para a detecção de *R. solanacearum*, através de PCR qualitativa, nas amostras com 1% de infecção (Tabela 4). Neste experimento também foi testada a homogeneização e maceração das amostras na proporção de 1:1 de tubérculos em ADE ou em tampão KH_2PO_4 3 mM, não havendo diferença quando o método de obtenção do DNA foi o FTA. O método de bio-PCR se mostrou mais eficiente quando o macerado foi feito na solução tampão, pois *R. solanacearum* não foi detectada quando se utilizou água, independente da concentração da amostra (Tabela 4).

TABELA 4. Detecção de *Ralstonia solanacearum* por PCR, com os oligos OLI1/Y2, utilizando diferentes métodos de extração do DNA em amostras coletadas com auxílio de seringa, de tubérculos de batata com três níveis de infecção. Porto Alegre, RS, 2008.

Método de extração do DNA	Amostras*					
	1		2		3	
	água	KH ₂ PO ₄	água	KH ₂ PO ₄	água	KH ₂ PO ₄
FTA (10 µL)	-.**	-	-	-	+	+
FTA (100 µL)	-	-	+	+	+	+
Bio-PCR (100 µL)	-	-	-	+	-	+
Lise celular por aquecimento (100 µL)	-	-	-	-	+	+

*Amostras compostas de tubérculos de batata com zero (1), 1 (2) e 10% (3) de tubérculos infectados.

**Experimento conduzido duas vezes.

A pesar do método de bio-PCR ter-se mostrado eficiente quando as amostras foram maceradas em tampão, este consumiu muito tempo e trabalho intensivo. Métodos de pré-purificação, tais como métodos de enriquecimento, têm sido amplamente utilizados para purificar as células bacterianas antes da PCR (Schaad *et al.*, 1995; Elphinstone, 1996). Entretanto, quando se deseja uma detecção rápida, o enriquecimento prévio não é aconselhável (Patrik, 2000).

A detecção de patógenos em sementes ou material propagativo, como tubérculos de batata, podem ser extremamente difíceis quando a população do patógeno é baixa. Portanto, técnicas sensíveis, capazes de detectar a pequena população do patógeno são necessárias (Schaad & Frederick, 2002).

O sucesso da detecção por PCR depende da natureza da amostra, sugerindo que uma grande quantidade de substâncias pode inibir a reação de amplificação do DNA alvo. Isto foi observado quando diferentes amostras foram analisadas (sementes, plantas, água e solo) (Poussier, 2002). Entretanto, o kit QIAamp[®] se mostrou muito eficiente e confiável na separação do DNA de possíveis substâncias inibidoras, sendo

possível a detecção de *R. solanacearum* em todas as de amostras estudadas (Poussier, 2002).

Tubérculos de batata homogeneizados são considerados um meio difícil de extração do DNA de *R. solanacearum* (Rogers *et al.*, 1996). Diversos métodos de extração em extratos de tubérculos, baseados na lise celular por aquecimento, sem posterior purificação, extração convencional com clorofórmio ou fenol/clorofórmio e subsequente precipitação do DNA por etanol ou isopropanol, além de métodos que unem o DNA a resinas ou a colunas de purificação foram testados (Patrik, 2000). Estes resultados mostraram que muitos destes métodos, inclusive a lise celular por aquecimento, requerem uma diluição do DNA antes da PCR, para reduzir o efeito de inibidores que diminuem a sensibilidade da reação (Patrik, 2000). Entretanto, tal diluição pode acarretar a diminuição da sensibilidade de detecção do patógeno (Patrik & Maiss, 2000).

O limite de detecção de *R. solanacearum* por PCR em amostras de batata é afetado pela presença de substâncias que inibem ou reduzem a amplificação. O limite de detecção obtido para tubérculos de batata foi menos sensível do que para plantas de tomate, provavelmente devido à presença de maior quantidade de inibidores, como compostos fenólicos, nos tubérculos (Martins, 2000).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a coleta de tubérculos de batata com auxílio de seringa é possível e, aliada ao método FTA, possibilita a coleta de um grande número de amostras. Portanto, a utilização deste método, aliado à PCR qualitativa, no estudo da epidemiologia da MB, tem potencial. Outros trabalhos também mostraram que a sensibilidade de detecção através do método FTA têm aumentado em relação à sensibilidade obtida através de métodos convencionais de extração do DNA

(Orlandi & Lampel, 2000). Uma baixa concentração de DNA-alvo pode ser extraído com menos trabalho (Lampel *et al.*, 2000).

4.3.2 Métodos de extração de DNA e PCR qualitativa

A presença de *R. solanacearum* em tubérculos, coletados nos municípios de SFP e IB, RS, não foi detectada através de PCR qualitativa com os oligos OLI1 e Y2, em amostras retiradas com seringas e submetidas à extração do DNA através do método FTA, lise celular por aquecimento, bio-PCR e lise celular por aquecimento, e kit *GenSpinTM Plant DNA Purification*. Entretanto, a detecção através do método FTA foi possível quando se utilizou os oligos RS-I e RS-II (Tabela 3).

TABELA 5. Detecção de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata através de PCR qualitativa com os oligonucleotídeos iniciadores OLI1/Y2, utilizando diferentes métodos de extração do DNA e FTA para os oligonucleotídeos RS-I/RS-II. Porto Alegre, RS, 2008.

Local	Cultivar					
	Ágata		Asterix		Viavaldi	
	OLI1/Y2	RS-I/RS-II	OLI1/Y2	RS-I/RS-II	OLI1/Y2	RS-I/RS-II
São Francisco de Paula, RS	0/1*	1/1	0/1	1/1	0/2	2/2
Ibiraiaras, RS	0/3	3/3	0/6	6/6	-	-

*Amostras positivas/ Total de amostras

Diferentes condições da PCR com os oligos OLI1 e Y2 foram testadas, evidenciando que não se tratou de um problema da reação. Um possível pareamento dos oligos OLI1 e Y2 nas extremidades 5' foi evidenciado, quando submetidos ao programa *Oligo Analyser* (Figura 4), o que pode acarretar a formação de dímeros de oligos, justificando sua menor sensibilidade. Nas baixas concentrações que *R. solanacearum* pode ocorrer em infecções latentes, é mais provável que os oligos se pareiem entre si do que encontrem uma sequência alvo de DNA para se parear.

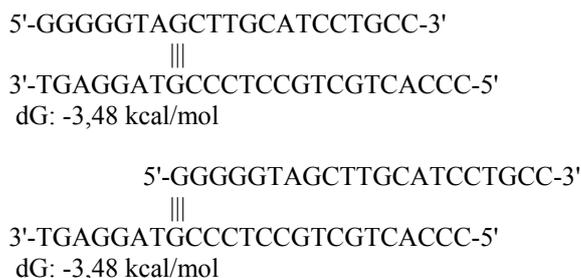


FIGURA 4. Representação indicando o pareamento dos oligos OLI1 e Y2, obtida com o programa *Oligo Analyser*. Porto Alegre, RS, 2008.

Teoricamente, através de PCR, pode-se detectar uma cópia do DNA-alvo (Patrik, 2000). Diferentes métodos têm sido utilizados para detecção de *R. solanacearum* em plantas naturalmente infectadas (Pradhanang *et al.*, 2000). Entretanto, vários fatores podem restringir a habilidade de detectar um baixo número de células da bactéria (Elphinstone & Stanford, 1998).

Os oligos usados neste trabalho OLI1 e Y2, assim como, RS-I e RS-II, detectam, além de *R. solanacearum*, outras bactérias com homologia conhecida para o rDNA 16S, região utilizada para a projeção dos oligos (Seal *et al.*, 1993; Taghavi *et al.*, 1996). Isto inclui todas as biovars de *R. solanacearum*, BDB e *R. syzygii*. Entretanto, estas espécies são facilmente diferenciadas pela gama de hospedeiros e propriedades fisiológicas (Eden-Green & Sastraatmadja, 1990).

A ausência de qualquer sintoma ou sinal (exsudação) da MB nos tubérculos amostrados evidencia que o método FTA tem potencial na detecção de infecções latentes em tubérculos-semente de batata, quando aliado à PCR qualitativa com os oligos RS-I e RS-II. Com a padronização do método FTA, o processo de detecção se torna mais ágil, já que não se faz necessária a extração do DNA, e o material pode ser transferido para o cartão diretamente no campo.

4.3.3 Determinação do limite de detecção do método *FTA*[®] *Cards Whatman*

O método FTA, assim como a lise celular por aquecimento, se mostrou eficaz na extração de DNA para a detecção de *R. solanacearum* em meio de cultura líquido. Contudo, somente foi possível detectar 10^6 UFC.mL⁻¹ (diluição 10^{-1}) com ambos os métodos, através de PCR qualitativa com os oligos OLI1 e Y2 (Figura 5).

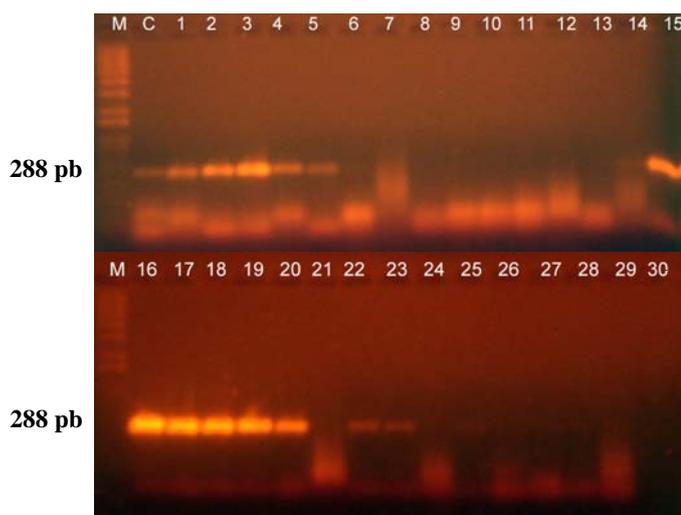


FIGURA 5. Amplificação do DNA, em suspensões de células de *Ralstonia solanacearum* (OD₆₀₀), por PCR com os oligos OLI1 e Y2: Método (1-14) *FTA*[®] *Cards Whatman*; (15-28) Lise celular por aquecimento; M, marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen); C, controle positivo de FTA; absorvâncias (1 e 15) 1,00; (2 e 16) 0,50; (3 e 17) 0,25 e (4 e 18) 0,10; Diluições (5 e 19) 10^{-1} ; (6 e 20) 10^{-2} ; (7 e 21) 10^{-3} ; (8 e 22) 10^{-4} ; (9 e 23) 10^{-5} ; (10 e 24) 10^{-6} ; (11 e 25) 10^{-7} ; (12 e 26) 10^{-8} ; (13 e 27) 10^{-9} e (14 e 28) 10^{-10} ; (29 e 30) controle negativo (água). Porto Alegre, RS, 2007.

Entretanto, quando as mesmas suspensões, transferidas para cartões FTA foram submetidas à PCR qualitativa com os oligos RS-I e RS-II, foi possível detectar 1 UFC.mL⁻¹, que corresponde a diluição 10^{-10} (Figura 6). Estes resultados corroboram com os obtidos nas coletas de campo, mostrando que os oligos RS-I e RS-II se pareiam mais facilmente à seqüência-alvo, resultando em uma maior sensibilidade de reação.

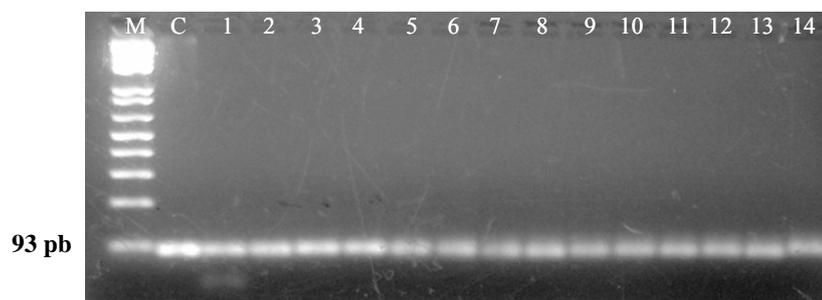


FIGURA 6. Amplificação do DNA, em suspensões de células de *Ralstonia solanacearum* (OD_{600}), por PCR com os oligos RS-I e RS-II através do método *FTA® Cards Whatman*; M, marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen); C, controle positivo de FTA; Absorbâncias (1) 1,00; (2) 0,50; (3) 0,25 e (4) 0,10; Diluições (5) 10^{-1} ; (6) 10^{-2} ; (7) 10^{-3} ; (8) 10^{-4} ; (9) 10^{-5} ; (10) 10^{-6} ; (11) 10^{-7} ; (12) 10^{-8} ; (13) 10^{-9} e (14) 10^{-10} . Porto Alegre, RS, 2008.

No entanto, a sensibilidade de detecção de colônias puras de *R. solanacearum* suspensa em PBS pode chegar a 10^2 UFC.mL⁻¹, através do método de lise por aquecimento, utilizando os oligos OLI1 e Y2 (Caruso *et al.*, 2003). Porém, o método de lise celular por aquecimento tem se mostrado de baixa confiabilidade, muitas vezes não reproduzível (Pastrik, 2000).

A análise do limite de detecção de suspensões de *R. solanacearum* em água, através de PCR qualitativa com a utilização dos oligos OLI1 e Y2 foi de 10^3 UFC.mL⁻¹. No entanto, quando extratos de batata foram analisados o limite de detecção foi de 10^4 UFC.mL⁻¹ (Weller *et al.*, 2000; Weller *et al.*, 2001).

A detecção de *R. solanacearum* em tubérculos de batata se mostrou adequada através dos oligos OLI1 e Y2, projetados a partir do rDNA 16S (Seal *et al.*, 1993). Entretanto, alguns produtos inespecíficos de tamanho similar ao esperado para *R. solanacearum*, foram observados quando estes oligos foram utilizados, resultando numa difícil interpretação dos dados (Pastrik & Maiss, 2000).

Em estudos com os oligos RS30 e RS31, projetados a partir da seqüência dos genes *hrpO* e *hrpN* da estirpe GMI1000 de *R. solanacearum*, obteve-se uma sensibilidade de 10^6 UFC.mL⁻¹ para suspensões bacterianas analisadas através de PCR qualitativa. A sensibilidade foi aumentada para 10^3 UFC.mL⁻¹ com o método *nested-PCR* usando os oligos RS30a/RS31a e RS30b/RS31b. Também foi testado o uso de

diferentes tampões para diminuir a possível inibição da PCR. Entretanto, o incremento da eficiência depende da planta estudada e, em extratos de tubérculos de batata e planta, não houve um aumento significativo da sensibilidade (Poussier & Luisetti, 2000).

O método FTA é uma matriz fibrosa que tem possibilitado a rápida coleta, purificação e análise do material genético de uma ampla gama de fontes biológicas, tais como, sangue, saliva, tecidos, plasmídeos, plantas e microrganismos (Lampel *et al.*, 2000). O cartão, que contém agentes químicos, protege o DNA da ação de nucleases, oxidação, danos causados por UV e microrganismos. A sensibilidade de detecção de diluições de suspensões bacterianas em FTA e subsequente amplificação em PCR vêm mostrando uma alta sensibilidade de detecção (10 UFC.mL^{-1}). Isto sugere a utilidade do FTA como meio ideal para rápida estocagem e recuperação de ácidos nucleicos para análise molecular. Entretanto, a detecção de algumas bactérias, como bacilos foi menos sensível ($10^3\text{-}10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$) (Rajendram *et al.*, 2006).

4.3.4 Eluição do DNA retido no FTA[®] Cards Whatman

Os resultados da PCR com o DNA eluído dos cartões FTA não se alteraram (Figuras 7 e 8). Assim como os resultados obtidos por (Rajendram *et al.*, 2006), o DNA eluído do FTA teve qualidade comparável ao do DNA imobilizado no cartão (Figura 9), viabilizando o uso do DNA extraído pelo método FTA em PCR quantitativa, que requer o DNA em solução.

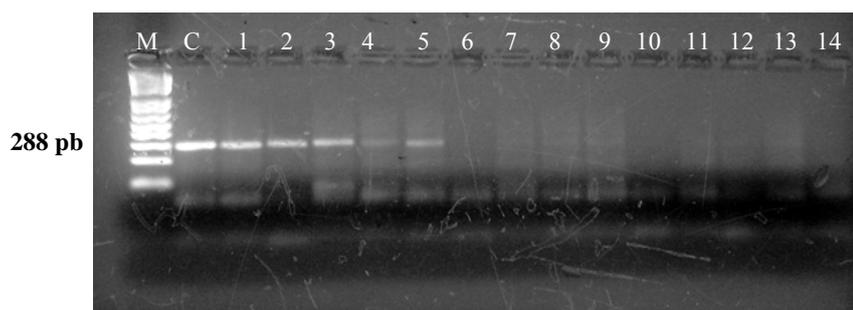


FIGURA 7. Amplificação do DNA, em suspensões de células de *Ralstonia solanacearum* (OD_{600}), por PCR com os oligos OLI1 e Y2, através do método de eluição do DNA retido no cartão *FTA® Cards Whatman*; M, marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen); C, controle positivo de FTA; Absorbâncias (1) 1,00; (2) 0,50; (3) 0,25 e (4) 0,10; Diluições (5) 10^{-1} ; (6) 10^{-2} ; (7) 10^{-3} ; (8) 10^{-4} ; (9) 10^{-5} ; (10) 10^{-6} ; (11) 10^{-7} ; (12) 10^{-8} ; (13) 10^{-9} e (14) 10^{-10} . Porto Alegre, RS, 2008.

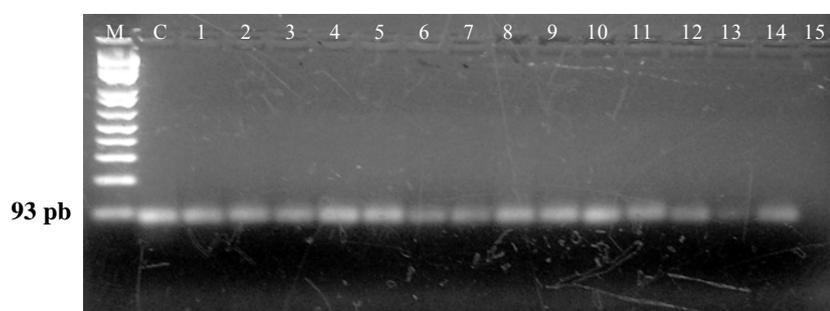


FIGURA 8. Amplificação do DNA, em suspensões de células de *Ralstonia solanacearum* (OD_{600}), por PCR com os oligos RS-I e RS-II através do método de eluição do DNA retido no cartão *FTA® Cards Whatman*; M, marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen); C, controle positivo de FTA; Absorbâncias (1) 1,00; (2) 0,50; (3) 0,25 e (4) 0,10; Diluições (5) 10^{-1} ; (6) 10^{-2} ; (7) 10^{-3} ; (8) 10^{-4} ; (9) 10^{-5} ; (10) 10^{-6} ; (11) 10^{-7} ; (12) 10^{-8} ; (13) 10^{-9} e (14) 10^{-10} ; (15) controle negativo (água). Porto Alegre, RS, 2008.

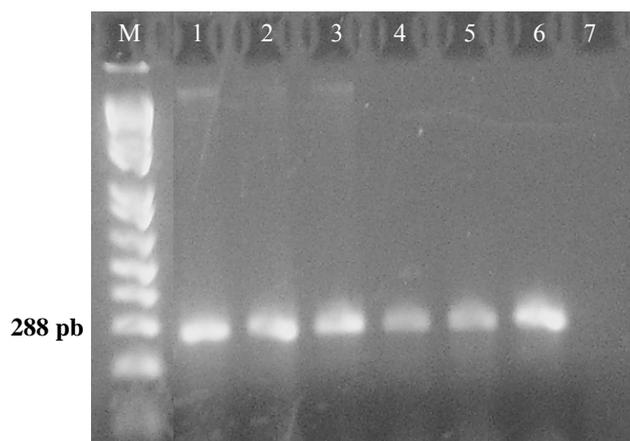


FIGURA 9. Perfil eletroforético dos produtos de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores OLI1 e Y2, utilizando os métodos *FTA® Cards Whatman* (1 a 3) e eluição do DNA retido no cartão *FTA® Cards Whatman* (4 a 6), em amostras de batata infectadas com *Ralstonia solanacearum* oriundas de Criciúma, SC; M, marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen); 1-4, amostra 1; 2-5, amostra 2; 3-6, amostra 2; 7, água (controle negativo). Porto Alegre, RS, 2007.

4.3.5 PCR quantitativa

Através da quantificação absoluta por PCR, usando *SYBR Green* e os oligos RS-I e RS-II foi confirmada a presença de *R. solanacearum* nas 13 amostras coletadas nos dois municípios (Figura 10). Assim como a PCR qualitativa (Figura 8), foi possível a detecção de 1 UFC.mL⁻¹ através deste método (Figura 11). Entretanto, algumas amostras apresentaram dois picos de fluorescência (Figura 10), provavelmente devido à presença de produtos inespecíficos gerados durante a reação, com os oligos RS-I e RS-II e que não são visualizados em gel de agarose com a PCR qualitativa, ou até mesmo a formação de dímeros de oligos. Estes problemas também podem ser resolvidos com o uso de métodos de PCR quantitativa que se baseiem em sondas, como o método *TaqMan*. Porém, as amostras analisadas com o uso de *SYBR Green*, quando extraídas por lise alcalina apresentaram somente um pico de amplificação (Figura 12).

Embora a tolerância da presença de *R. solanacearum* em tubérculos-semente de batata seja zero, e a PCR qualitativa seja suficiente para atender este requisito, a PCR quantitativa indica a concentração estimada de células por tubérculo, sendo uma ferramenta potencial para estudos epidemiológicos e de certificação de batata. Além disso, a PCR quantitativa agiliza o processo de detecção, já que não se fazem necessários os processos para visualização do produto da PCR.

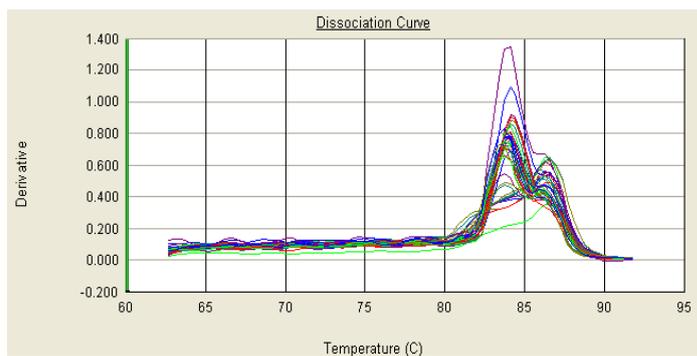


FIGURA 10. Detecção de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata através de PCR quantitativa com os oligos RS-I/RS-II. Porto Alegre, RS, 2008.

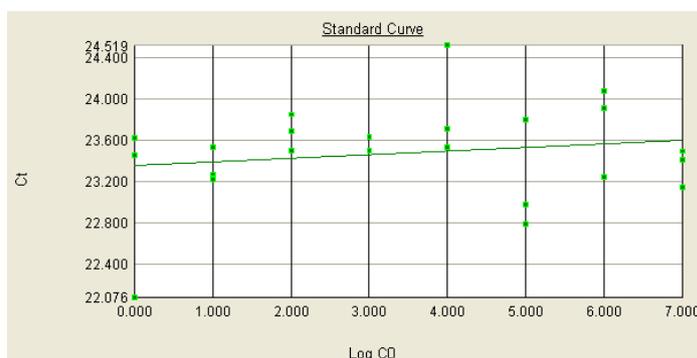


FIGURA 11. Curva padrão obtida através da análise de suspensões de células de *Ralstonia solanacearum* extraídas pelo método FTA e analisadas por PCR qualitativa com os oligos RS-I/RS-II usando o corante *SYBR Green*. Porto Alegre, RS, 2008.

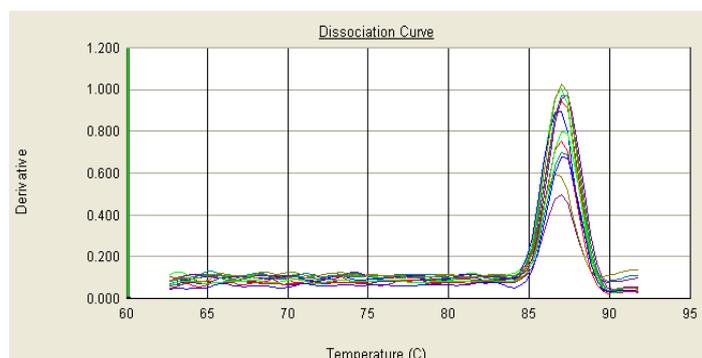


FIGURA 12. Detecção de *Ralstonia solanacearum* através de PCR quantitativa com os oligos RS-I/RS-II, usando estirpes padrão de biovares 1 e 2. Porto Alegre, RS, 2008.

Vários métodos baseados na emissão de fluorescência para PCR quantitativa vêm sendo utilizados. Apesar dos métodos que se baseiam em sonda serem mais específicos, como os métodos *TaqMan*, *Scorpions* e *Molecular Beacons*, o método *SYBR Green* tem sido amplamente utilizado por ser menos oneroso. Este baseia-se no

aumento da fluorescência ao longo do número de ciclos de PCR devido à intercalação do fluoróforo na dupla fita de DNA (Gibson, 2006).

Através da análise de suspensões bacterianas de *R. solanacearum* utilizando o método *TaqMan* com o *set* de sonda e oligos (RS) para detecção de todas as biovars de *R. solanacearum* e o *set* de sonda e oligos (RS-B2), específico para biovar 2A, foi obtido um limite de detecção de 10^4 UFC.mL⁻¹ para ambos os oligos. Em extratos de batata, a detecção de *R. solanacearum* foi de 10^4 UFC.mL⁻¹ com ao uso do *set* geral (RS) e diminuiu cerca de 10 vezes quando o *set* (RS-B2) foi utilizado (Weller *et al.*, 2000; Weller *et al.*, 2001).

4.3.6 Análise *in silico* das amostras seqüenciadas

Tanto para *R. solanacearum*, como para outros patógenos, o DNA ribossomal, e especialmente 16S, é a seqüência-alvo mais comumente usada para a busca de seqüências específicas de DNA. Esta seqüência gênica vem sendo anotada mais freqüentemente para um grande número de estirpes, descrevendo com maior acurasse o grupo consenso e a variabilidade intra-específica (Arahal *et al.*, 2004). A alta variabilidade das regiões ITS tem sido identificada como fonte de variação de seqüência com um grau apropriado instabilidade genética (Rogers & Burgoyne, 1997).

Após o seqüenciamento das estirpes 216, 221 e 256 (biovar 1) e 213, 245 e 253 (biovar 2) de *R. solanacearum* com os oligos OLI1 e Y2, projetados a partir de rDNA 16S, as amostras foram editadas e alinhadas através da ferramenta Multalin/INRA (Expasy, 2008) (Figura 9). Apesar da seqüência rDNA 16S ser considerada uma fonte de variabilidade intra-específica, através da análise dos fragmentos de DNA gerados não foi possível projetar oligos que diferenciem estas biovars para que pudessem ser utilizados em PCR quantitativa. Provavelmente, a carência de regiões heterólogas entre

5 CONCLUSÕES

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

A projeção de oligonucleotídeos iniciadores que diferenciem as biovars 1 e 2 de *Ralstonia solanacearum*, através de PCR, necessita ser feita com base em um maior número de seqüências de DNA de maior número de estirpes;

A utilização da seringa na coleta das amostras de tubérculos de batata para a detecção de *R. solanacearum* é viável;

Os oligonucleotídeos iniciadores RS-I e RS-II devem ser utilizados na detecção de *R. solanacearum* através de PCR com o método FTA de extração do DNA;

O método FTA, pela sensibilidade na extração e conservação de DNA, viabiliza a realização de levantamentos representativos da incidência de *R. solanacearum* em tubérculos de batata, particularmente em tubérculos-semente;

O nível de contaminação com *R. solanacearum* dos tubérculos analisados, tanto utilizando PCR qualitativa, como quantitativa, indica que um levantamento representativo da incidência deste patógeno em tubérculos-semente é imperativo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAHAL, D.R.; LLOP, P.; ALONSO, M.P.; LOPEZ, M.M. *In silico* evaluation of molecular probes for detection and identification of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. **Systematic and Applied Microbiology**, Building, v.27, n.5, p.581-591, 2004.
- BECKER, S.; FRANCO, J.R.; SIMARRO, P.P.; STICH, A.; ABEL, P.M.; STEVERDING, D. Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Building, v.50, n.3, p.193-199, 2004.
- BELGRADER, P.; DEL RIO, S.A.; TURNER, K.A.; MARINO, M.A.; WEAVER, K.R.; WILLIAMS, P.E. Automated DNA purification and amplification from blood-stained cards using a robotic workstation. **Biotechniques**, Building, v.19, p.426-432, 1995.
- BOUDAZIN, G.; LE ROUX, A.C.; JOSI, K.; LABARRE, P.; JOUAN, B. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v.105, p.373-380, 1999.
- BUDDENHAGEN, I.; KELMAN, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.12, p.203-230, 1964.
- CARDUCCI, C.; ELLUL, E.; ANTONOZZI, I.; PONTECORVI, A. DNA elution and amplification by polymerase chain reaction from dried blood spots. **Biotechniques**, Building, v.13, p.735-737, 1992.
- CARUSO, P.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; LOPEZ, M.M. A new and sensitive co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. **Journal Microbiological Methods**, Columbia, v.55, n.1, p.257-272, 2003.
- CASTILLO, J.A.; GREENBERG, J.T. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, n.4, p.1225-1238, 2007.
- CIAMPI, L.; SEQUEIRA, L.; FRENCH, E.R. Latent infection of potato-tubers by *Pseudomonas solanacearum*. **American Potato Journal**, Bangor, v.57, n.8, p.377-386, 1980.

COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v.2, n.3, p.113-121, 1989.

COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. DNA probe as tools for the study of host-pathogen evolution: the example of *Pseudomonas solanacearum*. In: HENNECKE, H.; VERMA, D.P. **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions**. Dordrecht: Kluwer, 1991. v.1. p.103-108.

COOK, D.; SEQUEIRA, L. The use of the subtractive hybridization to obtain a DNA probe specific for *Pseudomonas solanacearum* race 3. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.227, p.401-410, 1991.

COUNCIL directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* **Official Journal of the European Communities**, Rome, n° L235/1, Annex 1-VI, 1998.

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

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

DI CELLO, F.; BEVENINO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PATTETI, D.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of *Bulkholderia cepacia* population isolate from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.4485-4493, 1997.

DITTAPONGPITCH, V.; SURAT, S. Detection of *Ralstonia solanacearum* in soil and weeds from commercial tomato fields using immunocapture and the polymerase chain reaction. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.151, p.239-246, 2003.

DREIER, J.; BERMPOHL, A.; EICHENLAUB, R. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, p.462-468, 1995.

DRESCHER, A.; GRANER, A. PCR-genotyping of barley seedlings DNA using samples from tissue prints. **Plant Breeding**, Berlin, v.121, p.228-231, 2002.

DUARTE, V.; DE BOER, S.H.; WARD, L.J.; DE OLIVEIRA, A.M.R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96, p.535-545, 2004.

EDEN-GREEN, S.J.; SASTRAATMADJA, H. Blood disease in Java. **FAO Plant Protection Bulletin**, Roma, v.38, n.1, p.49-50, 1990.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, p.1949-1991.

ELPHINSTONE, J.G. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. **Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes**, Paris, v.26, p.663-678, 1996.

ELPHINSTONE, J.G.; STANFORD, H.M. Sensitivity of methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber. **Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes**, Paris, v.28, p.69-70, 1998.

ELPHINSTONE, J.G.; STANFORD, H.M.; STEAD, D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers, *Solanum dulcamara* and associated irrigation water. In: PRIOR, P.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J.G. **Bacterial wilt disease- molecular and ecological aspects**. Verlag: Springer, 1998. p.133-139.

ENGLEBRECHT, M.C. Modification of semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A.C. **Bacterial wilt newsletter**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1994. p.3-5.

EXPASY. **Multalin/INRA**. Disponível em: <http://www.expasy.org>. Acesso em: 15 jan. 2008.

EXPASY. **Multalin/INRA**. Disponível em: <http://www.expasy.org>. Acesso em: 31 jul. 2006.

FEGAN, M.; HOLOWAY, G.; HAYWARD, A.C.; TIMMIS, J.N. Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *Ralstonia solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype. In: PRIOR, P.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J.G. **Bacterial wilt disease- molecular and ecological aspects**. Verlag: Springer, 1998. p.34-43.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2005. p.449-461.

FRENCH, E.R. Control integrado de la marchitez bacteriana de la papa causada por el biovar 1- raza 3 de *Pseudomonas solanacearum*. In: TALLER SOBRE ENFERMEDADES BACTERIANAS DE LA PAPA, 1993, Brasília. **Memórias...** Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1994. p.39-41.

GABRIEL, D.W.; ALLEN, C.; SCHELL, M.; DENNY, T.P.; GREENBERG, J.T.; DUAN, Y.P.; FLORES-CRUZ, Z.; HUANG, Q.; CLIFFORD, J.M.; PRESTING, G.; GONZALEZ, E.T.; REDDY, J.; ELPHINSTONE, J.; SWANSON, J.; YAO, J.; MULHOLLAND, V.; LIU, L.; FARMERIE, W.; PATNAIKUNI, M.; BALOGH, B.; NORMAN, D.; ALVAREZ, A.; CASTILLO, J.A.; JONES, J.; SADDLER, G.; WALUNAS, T.; ZHUKOV, A.; MIKHAILOVA, N. Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v.19, n.1, p.69-79, 2006.

GENBANK. **Plataforma BLAST**. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome. Acesso em: 15 jan. 2008.

GENBANK. **Plataforma BLAST.** Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome. Acesso em: 31 jul. 2006.

GENIN, S.; BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.3, n.3, p.111-118, 2002.

GIBSON, N.J. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. **Clinica Chimica Acta**, Netherlands, v.363, p.32-47, 2006.

GILLINGS, M.; FAHY, P. Genomic fingerprinting and PCR analysis: rapid, sensitive and inexpensive means of differentiating strains of *Pseudomonas solanacearum*. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT CONFERENCE, 1992, Taiwan. **Proceedings...** Canberra: ACIAR, 1993. p.85-92.

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

GOTZ, M.; GOMES, N.C.; DRATWINSKI, A.; COSTA, R.; BERG, G.; PEIXOTO, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Survival of gfp-tagged antagonistic bacteria in the rhizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial community. **FEMS Microbiology Ecology**, England, v.56, n.2, p.207-218, 2006.

GRIEP, R.A.; VAN TWISK, C.; VAN BECKHOVEN, J.R.C.M.; VAN DER WOLF, J.M.; SCHOTS, A. Development of specific recombinant monoclonal antibodies against the lipopolysaccharides of *Ralstonia solanacearum* race 3. **Phytopathology**, Saint Paul, v.88, p.795-803, 1998.

GRIMAUULT, V.; ANAIS, G.; PRIOR, P. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. **Plant Pathology**, Oxford, v.43, p.663-668, 1994.

GUTHRIE, R.; SUSI, A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. **Pediatrics**, Illinois, v.32, p.338-343, 1963.

HALBERT, N.D.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARY, B.P.; DERR, J.N. Conservation genetic analysis of taxa state bison herb. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v.85, n.5, p.924-931, 2004.

HAYWARD, A.C. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. **Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p.123-135.

HAYWARD, A.C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.27, p.265-277, 1964.

HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.29, p.65-87, 1991.

HAYWARD, A.C. A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. **Nature**, England, v.186, p.405-406, 1960.

HAYWARD, A.C. *Pseudomonas solanacearum*. In: SINGH, U.; SINGH, R.; KOHMOTO, K. **Pathogenesis and host specificity in plant diseases: Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. Oxford: Pergamon, 1995. v.1. p.139-151.

HORITA, M.; TSUCHIYA, K. Comparative analysis of Japanese and foreign strains of *Ralstonia solanacearum* based on 16S rRNA gene sequences. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.66, p.132-137, 2000.

HORITA, M.; TSUCHIYA, K.; OOSHIRO, A. Characteristics of *Ralstonia solanacearum* biovar N2 strains in Asia. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.153, p.209-213, 2005.

HSIAO, K.; LIN, H.; PAN, H.; LI, T.; CHEN, S.; JOU, S.; CHIU, Y.; WU, M.; LIN, C.; LI, S. Application of FTA sample collection and DAN purification system on the determination of CTG trinucleotide repeat size by PCR-based southern blotting. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [S.I.], v.13, p.188-193, 1999.

HUANG, J.; SCHELL, M.A. DNA sequence analysis of *pglA* and mechanism of export of its polygalacturonase product from *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.172, p.3879-3887, 1990.

INVITROGEN. **Programa Oligo Perfect**. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/>. Acesso em: 31 jul. 2006.

ITO, S.; USHIJIMA, Y.; FUJII, T.; TANAKA, S.; KAMEYA-IWAKI; YOSHIWARA, S.; KISHI, F. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semiselective medium and a PCR technique. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.146, p.379-384, 1998.

JANSE, J.D. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. **European and Mediterranean Plant Protection Organization**, Paris, v.18, p.343-351, 1988.

JANSE, J.D. Potato brown rot in western Europe- history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. **Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes**, Paris, v.26, p.679-695, 1996.

JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.945-952, 1993.

KELMAN, A. One hundred and one years of research on bacterial wilt. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2, 1997, Guadalupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.1-5.

KIM, S.H.; OLSON, T.N.; SCHAAD, N.W.; MOORMAN, G.W. *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, the causal agent of brown rot of potato, identified in

geranium in Pennsylvania, Delaware, and Connecticut. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, p.450-2003.

LAMPEL, K.A.; ORLANDI, P.A.; KORNEGAY, L. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.10, p.4539-4542, 2000.

LANDER, E.S.; WATERMAN, M.S. Genomic mapping by fingerprinting random clones: A mathematical analysis. **Genomics**, Building, v.2, p.231-239, 1988.

LANGE, D.A.; PENUELA, S.; DENNY, L.R.; MUDGE, J.; CONCIDIDO, V.C.; ORF, H.J.; YOUNG, N.D. A plant isolation protocol suitable for polymerase chain reaction based marker-assisted breeding. **Crop Science**, Madison, v.138, p.217-220, 1998.

LEE, Y.A.; FAN, S.C.; CHIU, L.Y.; HSIA, K.C. Isolation of an insertion sequence from *Ralstonia solanacearum* race 1 and its potential use for strain characterization and detection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.9, p.3943-3950, 2001.

LIN, J.J.; FLEMING, R.; KUO, J.; MATHEWS, B.F.; SAUNDERS, J.A. Detection of plant genes using a rapid, nonorganic DNA purification method. **Biotechniques**, Building, v.28, p.346-350, 2000.

LÓPEZ, M.M.; BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; CARUSO, P.; GORRIS, M.T.; LLOP, P.; PENYALLVER, R.; CAMBRA, M. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. **International Microbiology**, Madri, v.6, p.233-243, 2003.

LÓPEZ, M.M.; LLOP, P.; CUBERO, J.; PENYALVER, R.; CARUSO, P.; BERTOLINI, E.; PEÑALVER, J.; GORRIS, M.T.; CAMBRA, M. Strategies for improving serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 10., 2000, Charlottetown. **Proceedings...** Charlottetown: Kluwer Academic Publishers, 2001. p.83-86.

MARTINS, O.M. **Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*** Göttingen, Germany: Georg-August University, 2000. 131 f. Thesis(Doctoral) - Institute of Plant Pathology and Plant Protection of the Georg-August University, Göttingen, Germany, 2000.

MBOGORI, M.N.; KIMANI, M.; KURIA, A.; LAGAT, M.; DANSON, J.W. Optimization of technology for large scale plant DNA isolation for use in marker assisted selection. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v.5, n.9, p.693-696, 2006.

McARTHUR, J.V.; KOVACIC, D.A.; SMITH, M. Genetic diversity in natural populations of bacterium across a landscape gradient. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.85, p.9621-9624, 1998.

McMANUS, P.S.; JONES, A.L.; . Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR - dot-blot and reverse-blot hybridizations. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, p.618-623, 1995.

MOSCOSO, H.; BRUZUAL, J.J.; SELLERS, H.; HOFACRE, C.L. FTA liver impressions as DNA template for detecting and genotyping fowl adenovirus. **Avian Diseases**, Iowa, v.51, n.1, p.118-121, 2007.

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

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>. Acesso em: 31 jul. 2006.

NELSON, P.V.; CARY, W.F.; MORRIS, C.P. Gene amplification directly from Guthrie blood spots. **Lancet**, London, v.33, p.1451-1452, 1990.

ORLANDI, P.A.; LAMPEL, K.A. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.6, p.2271-2277, 2000.

PASTRIK, K.H. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v.106, n.2, p.155-165, 2000.

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

POUSSIER, S.; CHERON, J.J.; COUTEAU, A.; LUISETTI, J. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v.51, n.3, p.349-359, 2002.

POUSSIER, S.; LUISETTI, J. Specific detection of biovar of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by Nested PCR-RFLP. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v.106, p.255-265, 2000.

POUSSIER, S.; TRIGALET-DEMERY, D.; VANDEWALLE, P.; GOFFINET, B.; LUISETTI, J.; TRIGALET, A. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. **Microbiology**, New York, v.146, p.1679-1692, 2000.

PRADHANANG, P.M.; ELPHINSTONE, J.G.; FOX, R.T.V. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. **Plant Pathology**, Oxford, v.49, p.414-422, 2000.

PRIOR, P.; FEGAN, M. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. **Acta Horticulturae**, Netherlands, v.695, p.127-136, 2005.

RAJENDRAM, D.; AYENZA, R.; HOLDER, F.M.; MORAN, B.; LONG, T.; SHAH, H.N. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v.67, n.3, p.582-592, 2006.

ROBINSON-SMITH, A.; JONES, P.; ELPHINSTONE, J.G.; FORDE, S.M.D. Production of antibodies to *Ralstonia solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. **Food and Agricultural Immunology**, London, v.7, p.67-79, 1995.

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

ROGERS, C.; BURGOYNE, L. Bacterial typing: Storing and processing of stabilized reference bacteria for polymerase chain reaction without preparing DNA- an example of an automatable procedure. **Analytical Biochemistry**, Building, v.247, p.223-227, 1997.

ROGERS, H.J.; BURNS, N.A.; PARKES, H.C. Comparison of small-scale methods for the rapid extraction of plant DNA suitable for PCR analysis. **Plant Molecular Biology Reporter**, Netherlands v.14, p.170-183, 1996.

ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extration of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissue. **Plant Molecular Biology**, Netherland, v.5, p.69-76, 1985.

ROSATO, Y.B.; GONÇALVES, E.R.; TAHARA, S.T.; MEHTA, A. Diagnóstico molecular de doenças em plantas: detecção de fitopatógenos bacterianos. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias: EDUCS, 2002. p.70-100.

SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULT, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J.C.; CATTOLICO, L.; CHANDLER, M.; CHOISNE, N.; CLAUDEL-RENARD, C.; CUNNAC, S.; DEMANGE, N.; GASPIN, C.; LAVIE, M.; MOISAN, A.; ROBERT, C.; SAURIN, W.; SCHIEX, T.; SIGUIER, P.; THEBAULT, P.; WHALEN, M.; WINCKER, P.; LEVY, M.; WEISSENBACH, J.; BOUCHER, C.A. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, England, v.415, n.6871, p.497-502, 2002.

SALANOUBAT, M. et al. **Genoma GMI1000**. Disponível em: <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/annotation/iANT/bacteria/ralsto/>. Acesso em: 31 jul. 2006.

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

SCHAAD, N.W.; CHEONG, S.S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N.J. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, p.243-248, 1995.

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

SCHAAD, N.W.; GAUSH, P.E.; OZAKMAN, M. **Real-time PCR primers and probes for identification of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 in potato and others plants**. Disponível em: <http://patentstorm.us/patents/7262010-fulltext.html>. Acesso em: 15 dez. 2007.

SEAL, E.S.; JACKSON, L.A.; DANIELS, M.J. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.11, p.3759-9761, 1992.

SEAL, S.E.; ELPHINSTONE, J.G. Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p.35-57.

SEAL, S.E.; JACKSON, L.A.; YOUNG, J.C.P.W.; DANIELS, M.J. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. **Journal of General Microbiology**, Londres, v.139, p.1587-1594, 1993.

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

SHINOHARA, R.; KANDA, A.; OHNISHI, K.; KIBA, A.; HIKICHI, Y. Contribution of folate biosynthesis to *Ralstonia solanacearum* proliferation in intercellular spaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.1, p.417-422, 2005.

SILVEIRA, J.R.P. **Aspectos epidemiológicos e de resistência à *Ralstonia solanacearum* na cultura da batata no Rio Grande do Sul**. 2002. 105 f. Tese (Doutorado - Fitossanidade) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

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

SILVEIRA, J.R.P.; DUARTE, V.; MORAES, M.G.; OLIVEIRA, A.M.R.; BARNI, V.; MACIEL, J.L.N. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-Rep e RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.615-622, 2005.

SILVEIRA, J.R.P.; RUPRECHT, V.C.; SILVA, M.M.; LISBOA, B.B.; VARGAS, L.K.; OLIVEIRA, A.M.R. Predominância da biovar 1 de *Ralstonia solanacearum* em olerícolas cultivadas no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.12, n.1-2, p.31-36, 2006.

SINGH, U.; TREVORS, C. Serological detection of *Ralstonia solanacearum* in potatoes by ELISA and Immunofluorescence, and comparison to PCR. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 10., 2000, Charlottetown. **Proceedings...** Charlottetown: Kluwer Academic, 2001. p.428-433.

SMITH, J.J. et al. Biogeographic studies on *Ralstonia solanacearum* race 1 and 3 by genomic fingerprinting. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadalupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.50-55.

SMITH, J.J.; OFFORD, L.C.; HOLDERNESS, M.; SADDLER, G.S. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.4263-4268, 1995.

SWANSON, J.K.; MONTES, L.; MEJIA, L.; ALLEN, C. Detection of latent infections of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 in geranium. **Plant Disease**, Saint Paul, v.91, n.7, p.828-833, 2007.

SWANSON, J.K.; YAO, J.; TANS-KERSTEN, J.K.; ALLEN, C. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. **Phytopathology**, Saint Paul, v.95, p.136-143, 2005.

TAGHAVI, M.; HAYWARD, A.C.; SLY, L.; FEGAN, M. Analisis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, New York, v.46, p.10-15, 1996.

TAKATSU, A. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.15, p.170-177/1997. Suplemento.

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

TIMMS-WILSON, T.M.; BRYANT, K.; BAILEY, M.J. Strain characterization and 16S-23S probe development for differentiating geographically dispersed isolates of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.3, p.787-795, 2001.

TSUKAYA, H.; IOKAWA, Y.; KONDO, M.; OHBA, H. Large-scale general collection of wild-plant DNA in Mustang, Nepal. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.118, n.1, p.57-60, 2005.

VAN DER WOLF, J.M.; BONANTS, P.J.; SMITH, J.J.; HAGGENAAR, M.; NIJHUIS, E.; VAN BECKHOVEN, J.R.C.M.; SADDLER, G.S.; TRIGALET, A.; FEUILLADE, R. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in western Europe determined by AFLP, Rc-PGEF and Rep-PCR. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadalupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.44-49.

VAN DER WOLF, J.M.; VAN BECKHOVEN, J.R.C.M.; BONANTS, P.J.; SCHOEN, C.D. New technologies for sensitive and specific routine detection of plant pathogenic bacteria. In: DE BOER, S.H. In: 10TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT

PATHOGENIC BACTERIA, 2000, Charlottetown. **Proceedings...** Charlottetown: Kluwer Academic, 2001. p.75-77.

VILLA, J.E.; TSUCHIYA, K.; HORITA, M.; NATURAL, M.; OPINA, N.; HYKUMACHI, M. Analysis of Asian strains of *Ralstonia solanacearum* species complex based on 16S rDNA, endoglucanase and *hrpB* gene sequences. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.71, p.39-46, 2005.

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

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

WELLER, S.A.; ELPHINSTONE, J.G.; SMITH, N.C.; HENNESSY, J.; STEAD, D.E. Detection of plant associated bacteria by TaqManTM PCR. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 10., 2000, Charlottetown. **Proceedings...** Charlottetown: Kluwer Academic, 2001. p.441-445.

WILLIAMSON, L.; HUDELSON, B.D.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* strains isolated from geranium belong to race 3 and are pathogenic on potato. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, p.987-991, 2002.

WOLF, J.B. **Applied molecular biology, beginning laboratory manual**. Disponível em: <http://www.research.umbc.edu/~jwolf/method1.html>. Acesso em: 5 mar. 2007.

WULLINGS, B.A.; VAN BEUNINGEN, A.R.; JANSE, J.D.; AKKERMANS, A.D. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23S rRNA-targeted probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.11, p.4546-4554, 1998.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.39, n.11, p.897-904, 1995.