

Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* Através de PCR-RFLP do Gene *recA*

Samira O. M. El Tassa¹ & Valmir Duarte²

¹Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Superintendência Federal de Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Rio Grande do Sul, Av. Loureiro da Silva, 515, CEP 90010-420, Porto Alegre, RS, fax: (51) 3284-9532, e-mail: samiracolodel@agricultura.gov.br; ²Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Cx. Postal 15100, CEP 90001-970, Porto Alegre, RS, fax: (51) 3316-6016, e-mail: valmir@ufrgs.br

(Aceito para publicação em 22/07/2005)

Autor para correspondência: Valmir Duarte

EL TASSA, S.O.M. & DUARTE, V. Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* através de PCR-RFLP do gene *recA*. Fitopatologia Brasileira 31:023-028. 2006.

RESUMO

Pectobacterium carotovorum subsp. *brasiliensis* foi proposta como o principal agente causal da canela preta da batata (*Solanum tuberosum*) no Brasil. Com o objetivo de identificar essa subespécie, oligonucleotídeos iniciadores foram selecionados a partir de regiões heterólogas do gene *recA* existentes entre *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-41 e outras pectobactérias disponíveis no GenBank e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* BAB1. No entanto, os oligonucleotídeos iniciadores apresentaram baixa especificidade. O produto da PCR do gene *recA*, um fragmento de \pm 730 pb, de 38 estirpes de *P. chrysanthemi* e das diferentes subespécies de *P. carotovorum*, foi digerido com as endonucleases de restrição *TasI* e *HhaI*. Estas enzimas foram selecionadas com base na sequência do gene *recA* das estirpes *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-416 (581 pb) e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* BAB1 (626 pb). A análise do PCR-RFLP com as enzimas *TasI* e *HhaI* gerou sete e 12 padrões, respectivamente. A combinação dos resultados permitiu a separação em 13 grupos distintos e a discriminação de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

Palavras-chave adicionais: pectobactérias, canela preta, podridão-mole, batata, *Solanum tuberosum*.

ABSTRACT

Identification of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* through PCR-RFLP of the *rec-A* gene

Pectobacterium carotovorum subsp. *brasiliensis* has been proposed to be the major causal agent of blackleg of potato (*Solanum tuberosum*) in Brazil. In order to identify this subspecies, primers were selected from heterologous regions of *recA* genes present in *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-41, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* BAB1, and other DNA sequences of pectobacteria available in the GenBank. These primers, however, showed low specificity. The *recA* gene PCR product, a DNA fragment of \pm 730 bp, from 38 strains of *P. chrysanthemi*, subspecies of *P. carotovorum*, was digested with *TasI* and *HhaI* restriction enzymes. These enzymes were selected based on the sequences of *recA* gene from strains of *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-416 (581 pb) and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* BAB1 (626 pb). The restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis with *TasI* and *HhaI* enzymes generated seven and 12 patterns, respectively. Analysis of the combined results allowed for the separation of 13 distinct groups and differentiation of *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

Additional keywords: pectobacteria, blackleg of potato, potato, *Solanum tuberosum*.

INTRODUÇÃO

Pectobacterium carotovorum subsp. *atrosepticum* (van Hall) Hauben *et al.*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben *et al.*, *P. chrysanthemi* (Bulkholder *et al.*) Brenner *et al.* emend. Hauben *et al.* e, mais recentemente, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* Duarte *et al.* (Duarte *et al.*, 2004) são as bactérias responsáveis por causar podridão-mole em tubérculos e/ou canela-preta em plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) (Pérombelon & Kelman, 1987; Duarte *et al.*, 2004). Esta última subespécie foi proposta conforme estudos que mostraram que estirpes brasileiras, isoladas de lavouras do Rio Grande do Sul, inicialmente identificadas como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*

(Oliveira *et al.*, 2003), apresentaram perfis genéticos, bioquímicos, fisiológicos e sorológicos diferentes dos esperados para essa subespécie (Duarte *et al.*, 2004). Levantamento posterior, em tubérculos-semente também produzidos nesse estado, mostrou a ausência de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* e uma alta incidência de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (El Tassa & Duarte, 2004).

A aparente ausência de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (El Tassa & Duarte, 2004), principal agente causador de canela preta em outros países, e a presença de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* em batata, faz com que as ferramentas para diagnóstico disponíveis no mercado, como anticorpos monoclonais (De Boer & McNaughton, 1987) e oligonucleotídeos iniciadores específicos (De Boer & Ward,

1995; Bertheau *et al.*, 1998) não possam ser utilizadas em programas de certificação no Brasil. Testes bioquímicos e fisiológicos demandam tempo, são trabalhosos e, além disso, a ocorrência de formas intermediárias dificulta a interpretação dos resultados, impossibilitando muitas vezes a identificação correta dessas bactérias (Stanguellini & Meneley, 1975; Jabuonski *et al.*, 1986; Pérombelon & Van Der Wolf, 1998). Novas alternativas baseadas no sequenciamento de genomas bacterianos e no emprego de vários marcadores moleculares têm fornecido mais informações sobre a especificidade dos genomas. Assim como 16S e 23S rDNA, o gene *recA*, que codifica a enzima recombinase A, pode servir como marcador para a identificação de patógenos bacterianos (Ludwing & Schleifer, 1999). RecA é uma proteína multifuncional envolvida na recombinação homóloga, reparo do DNA e na resposta SOS (Eisen, 1995). Comparações da seqüência da proteína RecA e do gene *recA* têm sido usadas para especular o relacionamento filogenético entre gêneros e espécies (Lloyd & Sharp, 1993; Eisen, 1995; Karlin *et al.*, 1995). Caracterização genotípica, baseada na análise de PCR-RFLP do gene *recA*, foi feita com membros do gênero *Erwinia/Pectobacterium* (Waleron *et al.*, 2002). Essa análise resultou na identificação de espécies e subespécies, bem como de estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. chrysanthemi*.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo identificar *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* através da análise da

seqüência e PCR-RFLP do gene *recA*.

MATERIAL E MÉTODOS

Estirpes

As estirpes usadas neste estudo estão listadas na Tabela 1.

Extração de DNA

Células bacterianas, cultivadas em meio de cultura Nutriente Agar, com 24-48 h, foram transferidas para 250 µl de tampão de extração (100mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA; 1% SDS e 5 µg de proteinase K), com o auxílio de um palito de dente e incubadas por 3 h a 56 °C em banho-maria. Posteriormente, adicionou-se 250 µl de acetato de amônio 7,5 M e procedeu-se a centrifugação a 14.000 g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionado igual volume de isopropanol e incubado durante a noite a -20 °C. O precipitado obtido após centrifugação por 25 min a 14.000 g a 4 °C, foi lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente, dissolvido em 50 µl de água ultra pura e armazenado a -20 °C (De Boer & Ward, 1995).

PCR e sequenciamento

O DNA extraído dos isolados foi submetido a PCR, utilizando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (5'→3'):

TABELA 1 - Estirpes de *Pectobacterium* sp. usadas neste estudo. Porto Alegre, 2004

Identificação/n° de estirpes	Hospedeiro	Origem	Fonte
<i>Pectobacterium carotovorum</i> IAC2, IAC3, BAB5	Batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	Brasil	S. O. M. El Tassa/UFRGS
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i> (1) 31	Batata		CFIA,CA
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>betavascularum</i> (2) LMG2464 ^T IBSBF787 (ATCC43762) ^T	Beterraba açucareira (<i>Beta vulgaris</i> L.)	EUA EUA	CFIA,CA Instituto Biológico, BR
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> (20) ATCC BAA-416, ATCC BAA-417 ^T , ATCC BAA-418, ATCC BAA-419 MB1, MB8, BAPB6, BAPB8, EPB11, BIPB15, APB14, CBC2, CMAC19, PMAR2, PMAB3, PMAB11, PAB10, IEC5, CBC1 285	Batata	Brasil	V. Duarte/UFRGS S. O. M. El Tassa/ UFRGS
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (6) IBSBF 1442 BAB1, BAB3, CBC11, PPR5, PMAR14	<i>Dianthus caryophyllus</i> L. Batata	Argentina Brasil	C. C. Rommel/UFRGS Instituto Biológico, BR S. O. M. El Tassa/ UFRGS
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i> (1) CFBP1645	Chicória (<i>Chicorium endivia</i> L.)	França	CFIA, CA
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>wasabiae</i> (4) SR91 ^T , SR92, SR93, SR94	Horseradish (<i>Eutrema wasabi</i> Maxim.)	Japão	CFIA, CA
<i>P. chrysanthemi</i> (1) IBSBF1468	Cebola (<i>Allium cepae</i> L.)	Brasil	Instituto Biológico, BR

(GGT AAA GGG TCT ATC ATG CG) / (CCT TCA CCA TAC ATA ATT TGG A) (Waleron *et al.*, 2002) que produzem um fragmento de 730 pb do gene *recA*. As reações foram feitas em um volume final de 50 µl, onde foi usado 1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; tampão de reação (10 mM Tris pH 8,3; 50 mM KCl); 2,5 mM de MgCl₂; 0,25 mM de cada dNTP (Invitrogen); 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e cerca de 100 ng de DNA (Waleron *et al.*, 2002). As amplificações foram conduzidas em termociclador MJ Research (PTC-100), nas seguintes condições: 95 °C/3 min, (94 °C/1 min, 47 °C/1 min, 72 °C/2 min) 32X, 72 °C/5 min. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese juntamente com marcador de peso molecular 100 pb (Promega), a 4V/cm por 2 h, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz ultra-violeta e fotografado através de sistema de análise de gel computadorizado (Kodak Digital Science 1D). Posteriormente, 45 µl do produto da reação de duas estirpes (*P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-416 e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* BAB1) foram encaminhados para sequenciamento no Core Molecular Biology Facility York University (North York, Ontário, Canadá).

Seleção de oligonucleotídeos iniciadores e PCR

As seqüências obtidas foram avaliadas quanto à homologia entre si e com outras seqüências disponíveis na base de dados do GenBank usando o programa BLASTN. Oligonucleotídeos iniciadores foram selecionados a partir de regiões heterólogas da seqüência de DNA, entre *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e as demais estirpes.

A PCR usando estes oligonucleotídeos iniciadores teve as mesmas condições descritas anteriormente. No entanto, visando melhorar a especificidade da reação, diferentes temperaturas de anelamento (47 – 68 °C) e número de ciclos (25 e 30) foram testados.

PCR – RFLP do gene *recA*

A PCR foi feita como descrita anteriormente. O DNA presente na reação (40 µl) foi precipitado com 4,5 µl de acetato de amônio 3M e 44,5 µl de isopropanol a –20 °C durante a noite. O precipitado foi centrifugado a 17.000 g por 10 min, lavado com 500 µl de etanol 70%, centrifugado novamente na mesma condição anterior, seco a temperatura ambiente e ressuscitado em 10 µl de água ultrapura. O DNA foi digerido com duas endonucleases de restrição [*Hha*I (Invitrogen) e *Tas*I (Fermentas)], as quais foram selecionadas com base na seqüência de nucleotídeos do gene *recA* das estirpes *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-416 e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* BAB1, usando o programa Webcutter (Heiman, 2003). A digestão foi feita durante a noite (aproximadamente 12 h) num volume final de 10 µl contendo 2,5 U de cada endonuclease usando o tampão e temperatura [37 °C (*Hha*I) e 65 °C (*Tas*I)] recomendados pelo fabricante. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 2,5%, juntamente com marcador de peso molecular

50 pb (Amersham Biosciences), através de eletroforese de 4 V/cm por 8 h, corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz ultra-violeta e fotografado através do sistema de análise de gel computadorizado (Kodak Digital Science 1D). Os padrões de PCR-RFLP, para cada enzima, foram baseados no número de bandas e sua posição. Os grupos de RFLP foram formados pela análise combinada dos padrões obtidos.

RESULTADOS

Sequenciamento do gene *recA*

A PCR com os oligonucleotídeos iniciadores do gene *recA* produziu um fragmento de aproximadamente 730 pb para as estirpes analisadas, sendo que o sequenciamento dos fragmentos das estirpes *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-416 e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* BAB1, resultou em seqüências de 581 e 626 pb, respectivamente. A homologia entre as duas seqüências foi de 90%. No entanto, a homologia entre a seqüência do gene *recA* da estirpe *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-416 com as outras seqüências do mesmo gene disponíveis no GenBank, variou de 90 a 99% com as estirpes das subespécies de *P. carotovorum*. A maior homologia foi verificada com as estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Seleção de oligonucleotídeos iniciadores e PCR

Oligonucleotídeos iniciadores, *recAF* e *recAR*, foram selecionados a partir de regiões da seqüência de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-416 de baixa homologia quando comparada com as outras seqüências disponíveis no GenBank e com *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* BAB1. Um fragmento, de tamanho esperado, de 429 pb foi amplificado do DNA das estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. No entanto, quando as temperaturas de anelamento variaram entre 47 - 60 °C, algumas estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* tiveram o mesmo fragmento amplificado. Em temperaturas superiores a 60 °C, estas estirpes não tiveram o fragmento amplificado, juntamente com algumas *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Figura 1).

PCR-RFLP do gene *recA*

A menor diferenciação dos padrões de RFLP foi observado com *Tas*I, com somente sete padrões com as estirpes testadas (Tabela 2). A maior diferenciação foi obtida com a enzima *Hha*I, com 12 padrões. O resultado da análise dos padrões (Figura. 2) combinados de PCR-RFLP com o produto do gene *recA*, usando as enzimas *Hha*I e *Tas*I, revelou a presença de 13 diferentes grupos de RFLP (Tabela 2). Estes grupos foram consistentemente diferentes e característicos para as espécies e subespécies testadas, com exceção da estirpe *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* PPR5 que está presente no mesmo grupo das estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. A maior diversidade do gene foi observada entre seis estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, com cinco grupos de RFLP. Por outro lado, as

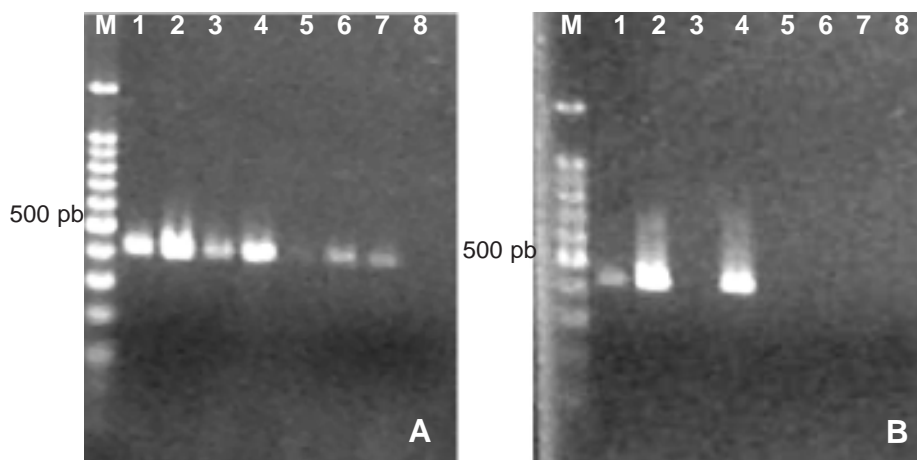


FIG. 1 - Produtos da PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores recAF e recAR com duas temperaturas de anelamento **A**, 60 °C; **B**, 65 °C. M, marcador de peso molecular 100 pb; 1, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-416; 2, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-417T; 3, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-417; 4, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-418; 5, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* 285; 6, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* PLT1; 7, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* IBSBF 1442; 8, negativo (sem DNA).

TABELA 2 - Grupos de RFLP obtidos com base na análise de restrição do fragmento do gene *recA* com duas endonucleases de restrição. Porto Alegre, 2004

Grupos de RFLP ¹	Padrão de PCR-RFLP para endonucleases de restrição		Estirpes ²	Nº de estirpes
	<i>HhaI</i>	<i>TasI</i>		
1	1	1	Pcbr ATCC BAA 416, ATCC BAA-417T, ATCC BAA-419 419, pmab3, pmab11, iec5, mb1, mb8, apb14	9
2	2	1	Pcbr ATCC BAA -418, cbc2, pmar2, pab10, cbc1, bapb6, bapb8, epb11, cmac19 Pcc ppr5	9 1
3	1	2	Pcbr bipb15	1
4	3	1	Pcc IBSBF1442	1
5	5	1	Pcc cbc11	1
6	6	1	Pcc pmar14	1
7	4	3	Pcc bab1, bab3 Pc iac2, iac3, bab5	2 3
8	7	4	Pcb IBSBF787 (ATCC43762 ^T), LMG2464T	2
9	8	5	Pcw SR94, SR93, SR92	3
10	9	5	Pcw SR91T	1
11	10	2	Pco CFBP1645	1
12	11	6	Pch IBSBF1468	1
13	12	7	Pca 31	1

¹ Número dos grupos de RFLP baseados nos padrões combinados de PCR-RFLP com as endonucleases de restrição *HhaI* e *TasI*.

² Pcbr, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*; Pcc, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pc, *P. carotovorum*; Pcb, *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum*; Pcw, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae*; Pco, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*; Pca, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*; Pch *P. chrysanthemi*.

19 estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* testadas estão distribuídas em três grupos. Três estirpes de *P. carotovorum*, caracterizadas pela ausência de crescimento a 37 °C, possuem o mesmo padrão de algumas estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, ficando incluídas no mesmo grupo de RFLP. Estas estirpes já haviam sido identificadas pelo sistema Biolog (Hayward, EUA) como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (El Tassa & Duarte, 2004)

e a análise de rep-PCR mostrou que elas estão presentes no mesmo grupo de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (El Tassa & Duarte, 2003).

DISCUSSÃO

Segundo Duarte *et al.* (2004), análises sorológicas e de composição de ácidos graxos confirmaram que estirpes

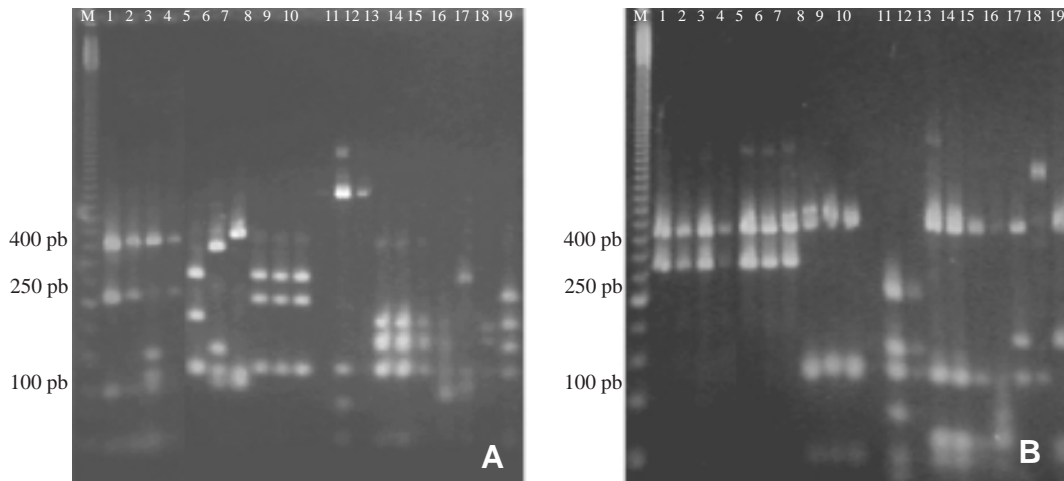


FIG. 2 - Padrões de PCR-RFLP do gene *recA* com as edonucleases de restrição *HhaI* (A) e *TasI* (B). M, marcador de peso molecular 50 pb; 1, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-416; 2, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-417; 3, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-417; 4, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-418; 5, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CBC11; 6, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* PPR5; 7, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* PMAR14; 8, *P. carotovorum* IAC2; 9, *P. carotovorum* IAC3; 10, *P. carotovorum* BAB5; 11, *P. carotovorum* subsp. *betavascularum* IBSBF787; 12, *P. carotovorum* subsp. *betavascularum* LMG2464^T; 13, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* SR94; 14, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* SR93; 15, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* SR92; 16, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* SR91^T; 17, *P. carotovorum* subsp. *odrififerum* CFBP1645; 18, *P. chrysanthemi* IBSBF1468; 19, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* 31.

de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* diferem de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*. O sítio de restrição da endonuclease *SexAI* na região IGS de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, aparentemente ausente nas outras subespécies e espécies de pectobactérias, foi usado para desenhar um oligonucleotídeo iniciador específico para *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Duarte *et al.*, 2004). Mas quando este oligonucleotídeo foi usado na PCR para identificação de um número maior de estirpes de pectobactérias em batata, algumas *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* apresentaram um fragmento do mesmo tamanho (El Tassa & Duarte, 2004). Isto sugere que estas estirpes podem apresentar o sítio de restrição da enzima *SexAI* na mesma posição que *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

Dessa forma, um dos objetivos do presente trabalho foi selecionar oligonucleotídeos iniciadores específicos para *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, que pudessem ser utilizados como ferramenta para sua detecção em trabalhos epidemiológicos e de controle. No entanto, o gene escolhido como alvo, *recA*, não se mostrou adequado para esta proposta. A falta de especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores selecionados pode ser explicada pelo uso da endonuclease de restrição *HhaI*. O oligonucleotídeo iniciador *recAF* foi selecionado a partir de uma região que continha o sítio de restrição para essa enzima em outras estirpes de pectobactérias e não para *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ATCC BAA-416. No entanto, a análise de RFLP do gene *recA* revelou que algumas estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (ATCC BAA-418, *cbc2*, *pmar2*, *pab10*, *cbc1*,

bapb6, *bapb8*, *epb11*, *cmac19*) contém o sítio de restrição para a enzima *HhaI* na mesma posição. Isto explica a ausência de amplificação com temperaturas de anelamento mais altas, com algumas estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Assim, estes oligonucleotídeos iniciadores não podem ser usados para detecção de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

Por outro lado, PCR-RFLP do gene *recA*, com as endonucleases *HhaI* e *TasI*, evidenciou a formação de grupos distintos entre as subespécies analisadas, principalmente para *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, apesar de uma estirpe de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* estar presente no mesmo grupo. Estes resultados corroboram os obtidos anteriormente com rep-PCR (El Tassa & Duarte, 2003) onde as estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* formaram um grupo homogêneo e separado das demais subespécies. Da mesma forma, evidencia a heterogeneidade de estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. No entanto, o uso de outras enzimas de restrição e a análise combinada dos padrões de PCR-RFLP, poderão dar maior evidência da distinção entre as espécies e subespécies de pectobactérias.

A caracterização genotípica, realizada por Waleron *et al.* (2002), de estirpes do gênero *Erwinia/Pectobacterium*, através de PCR-RFLP do gene *recA*, identificou 57 grupos de RFLP, sendo 42 dentro do gênero *Pectobacterium*. Assim como no presente trabalho, o maior número de grupos de RFLP foi obtido com *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Da mesma forma, Seo *et al.* (2002) identificaram dez grupos de RFLP, do gene *recA*, entre 92 estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* isoladas de diferentes hospedeiros. Um

alto nível de variabilidade nesta subespécie já foi observado em estudos sorológicos (De Boer & McNaughton, 1987) e em análises de RFLP de seqüências de genes de enzimas pectolíticas (Darrasse *et al.*, 1994). Em contraste, neste trabalho as 19 estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* estão distribuídas em apenas três grupos de RFLP. A baixa variabilidade nesta subespécie também tem sido observada com análise de rep-PCR (El Tassa & Duarte, 2003).

O conhecimento da diversidade é um importante pré-requisito para o desenvolvimento de métodos para identificação e detecção dessas fitobactérias, bem como para classificação taxonômica, estudos epidemiológicos e desenvolvimento de estratégias para o controle da doença, principalmente no que diz respeito à seleção de genótipos e desenvolvimento de variedades resistentes em programas de melhoramento. Isto é particularmente importante quando diferentes espécies e subespécies, bastante relacionadas, causam doença no mesmo hospedeiro, como é o caso das pectobactérias em batata.

Dessa forma, PCR-RFLP do gene *recA* pode ser usado para a identificação de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, bem como para estudar a variabilidade de estirpes de pectobactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTHEAU, Y., FRÉCHON, N., D., TOTH, I.K. & HYMAN, L.J. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: Pérombelon, M. C. M. & Van Der Wolf, J. M. (Eds.) Methods for detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* potatoes: Laboratory Manual. Dundee. Scottish Crop Research Institute. 1998. pp.38-48.
- DARRASSE, A., PRIOU, S., KOTOUJANSKY, A. & BERTHEAU, Y. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. Applied and Environmental Microbiology 60:1437-1443. 1994.
- DE BOER, S.H. & McNAUGHTON, M.E. Monoclonal antibodies to the lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* serogroup I. Phytopathology 77:828-832. 1987.
- DE BOER, S.H. & WARD, L.J. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. Phytopathology 85:854-858. 1995.
- 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 96:535-545. 2004.
- EISEN, J.A. The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: Comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. Journal of Molecular Evolution 41:1105-1123. 1995.
- EL TASSA, S.O.M. & DUARTE, V. Caracterização molecular de pectobactérias por ERIC-PCR, BOX-PCR e RAPD. Fitopatologia Brasileira 28:S239. 2003. (Suplemento)
- EL TASSA, S.O.M. & DUARTE, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente no Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira. 29:620-625. 2004.
- HEIMAN, M. Webcutter, versão 2.0. Texas: First Market Research, 1997. Disponível em: <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>. Acesso em: 30 nov. 2003.
- JABUONSKI, R.E., TAKATSU, A. & REIFSCHNEIDER, F.J.B. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. Fitopatologia Brasileira 11:185-195. 1986.
- KARLIN, S., WEINSTOCK, G.M. & BRENDDEL, V. Bacterial classification derived from RecA protein sequence comparisons. Journal of Bacteriology 177:6881-6893. 1995.
- LLOYD, A.T. & SHARP, P.M. Evolution of the *recA* gene and molecular phylogeny of bacteria. Journal of Molecular Evolution 37:399-407. 1993.
- LUDWING, W. & SCHLEIFER, K.H. Phylogeny of bacteria beyond the 16 rRNA standard. ASM News 65:752-757. 1999.
- OLIVEIRA, A. M. R., DUARTE, V., SILVEIRA, J.R.P. & MORAES, M.G. Incidence of pectolytic erwinias associated with blackleg of potato in Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira 28:49-53. 2003.
- PÉROMBELON, M.C.M. & KELMAN, A. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: Proposal for revision of terminology. Plant Disease 71:283-285. 1987.
- PÉROMBELON, M.C.M. & KELMAN, A. Ecology of the soft rot erwinias. Annual Review of Phytopathology 18:361-387. 1980.
- PÉROMBELON, M.C.M. & VAN DER WOLF, J.M. (Eds.). Methods for detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potatoes. Laboratory Manual. Dundee. Scottish Crop Res. 1998.
- SEO, S.T., FURUYA, N., TAKESHITA, M. & TAKANAMI, Y. Genotyping of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strains from Asia based on *recA* gene restriction fragment length polymorphisms. Journal of the Faculty of Agriculture 47:7-12. 2002.
- STANGHELLINI, M.E. & MENELEY, J.C. Identification of soft rot *Erwinia* associated with blackleg in Arizona. Phytopathology 65:86-87. 1975.
- WALERON, M., WALERON, K., PODHAJSKA, A.J. & LOJKOWSKA, E. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. Microbiology 148:583-595. 2002.