

CAMILA SANTANA PEREIRA

DETECÇÃO DE *Ralstonia solanacearum* EM PLANTAS INFECTADAS DE
EUCALIPTO VIA PCR EM TEMPO REAL

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título de
Magister Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P436d
2011

Pereira, Camila Santana, 1985-

Detecção de *Ralstonia solanacearum* em plantas infectadas de eucalipto via PCR em tempo real / Camila Santana Pereira. – Viçosa, MG, 2011.

vii, 23f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 19-23.

1. Eucalipto - Melhoramento genético. 2. Eucalipto - Doenças e pragas. 3. *Ralstonia solanacearum*. 4. Reação em cadeia polimerase. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 631.52

CAMILA SANTANA PEREIRA

DETECÇÃO DE *Ralstonia solanacearum* EM PLANTAS INFECTADAS DE
EUCALIPTO VIA PCR EM TEMPO REAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de outubro de 2011.

Dr.^a Poliane Alfenas-Zerbini
(Coorientadora)

Dr. Lúcio M. da S. Guimarães

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

“Pois o belo muda, o saber muda, a inteligência muda, a medida muda. Mas o desejo é inalterável.”

Rubem Fonseca

Ao meu pai Pedro Paulo Pereira
À minha mãe Maria Aparecida Santana Pereira
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, pois sem Ele nada seria possível.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante o curso e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig pelo apoio e financiamento do projeto.

Às empresas V&M, Fíbria, Amcel e Suzano Papel e Celulose pelo envio de amostras empregadas neste estudo.

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas pelos ensinamentos, pela orientação e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Lúcio Mauro da Silva Guimarães pela amizade, conselhos e por toda contribuição durante as fases deste trabalho.

À Márcia Brandão pelo carinho e a pronta disponibilidade em ajudar.

Ao meu coorientador Dr. Carlos Alberto Lopes pelo envio de isolados utilizados neste estudo e pela colaboração e disponibilidade, mesmo à distância.

À minha coorientadora Dra. Poliane Alfenas-Zerbini pelos ensinamentos e pelas críticas a este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Florestal – BIOAGRO/UFV pela ótima convivência e por terem me apoiado e muito me ensinado neste período, principalmente a Natália pela ajuda e divisão dos problemas durante este trabalho.

Aos meus queridos amigos do Programa de Pós-graduação em Genética, especialmente a Ísis, por me escutar nas horas de desespero e aos integrantes do GenMelhor por todas as horas de trabalho e conquistas durante a coordenação do grupo.

Aos meus amigos do Programa de Fitopatologia, Leonardo e Márcio por terem tornado o trabalho mais agradável.

Aos amigos do Banco do Brasil por todos os momentos de descontração.

Ao Éder, Fernanda e Renan pela ajuda decisiva em momentos deste trabalho.

Aos amigos distantes da graduação.

E em especial aos meus pais, Pedro e Aparecida pelo amor incondicional.

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

BIOGRAFIA

CAMILA SANTANA PEREIRA, filha de Pedro Paulo Pereira e Maria Aparecida Santana Pereira, nasceu em 31 de outubro de 1985 no Rio de Janeiro, RJ.

Em março de 2005, ingressou no curso de Ciências Biológicas, com ênfase em genética e biologia molecular, na Universidade Federal de Viçosa. Em maio de 2006 foi aprovada no concurso para monitor I da disciplina genética básica (BIO240). A partir de agosto de 2006, manteve suas atividades ligadas à pesquisa. No período de agosto de 2006 a julho de 2007 foi bolsista de Iniciação Científica no programa de melhoramento genético do feijoeiro da Universidade federal de Viçosa, sob orientação do professor Pedro Crescêncio Souza Carneiro, com o projeto intitulado “Caracterização e Conservação dos Recursos Genéticos do Banco de Germoplasma de Feijão da Universidade Federal de Viçosa (BGF-UFV)”. Em janeiro de 2008, tornou-se bolsista de Iniciação Científica no laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos, sob a orientação do professor Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, com o projeto intitulado “Caracterização da resistência de *Alternaria solani* aos fungicidas tebuconazole e azoxystrobina”. Desse projeto resultou sua monografia, conforme as exigências do curso de Ciências Biológicas com o título: “Sensibilidade de espécies causadoras de pinta preta aos fungicidas tebuconazole e azoxytrobin” defendida no dia 9 de junho de 2009.

Em agosto de 2009, iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento na mesma instituição, sob orientação do Professor Acelino Couto Alfenas no Laboratório de Patologia Florestal/Bioagro do Departamento de Fitopatologia da UFV.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	3
1- Validação de oligonucleotídeos específicos para <i>R. solanacearum</i>	3
1.1 - Extração de DNA	3
1.2 – PCR (Polymerase Chain Reaction).....	4
2 - Extração de <i>R. solanacearum</i> do sistema vascular de plantas infectadas.....	6
2.1 Isolado bacteriano e curva de crescimento de <i>R. solanacearum</i>	6
2.2 – Material vegetal e inoculação de <i>R. solanacearum</i>	6
2.3 – Métodos de extração do DNA	8
2.4 - Detecção por PCR convencional.....	8
3 – Detecção de <i>R. solanacearum</i> via PCR em tempo real.....	8
3.1 – Material vegetal	8
3.2 – Delineamento experimental.....	9
3.3 – PCR em tempo real	9
RESULTADOS	10
1 - Especificidade dos oligonucleotídeos.....	10
2 – Protocolo para extração de <i>R. solanacearum</i> diretamente do sistema vascular de plantas infectadas.....	11
2.1 - Curva de crescimento de <i>R. solanacearum</i>	11
2.2 - Detecção e sensibilidade de <i>Ralstonia solanacearum</i> via PCR convencional	11
3 - Detecção e quantificação de <i>R. solanacearum</i> via PCR em tempo real.....	12
3.1 – Curva padrão.....	12
3.2 – Ensaio biológico	14
3.3 – Análise de amostras	15
DISCUSSÃO	16
REFERÊNCIAS	19

RESUMO

PEREIRA, Camila Santana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Outubro de 2011. **Detecção de *Ralstonia solanacearum* em plantas infectadas de eucalipto via PCR em tempo real.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Coorientadores: Poliane Alfenas-Zerbini e Carlos Alberto Lopes.

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* é, atualmente uma das mais importantes doenças bacterianas na eucaliptocultura. O uso de mudas clonais sadias é o método mais efetivo para evitar a introdução e disseminação do patógeno em áreas livres da doença. Plantas infectadas podem ser identificadas visualmente ou pela exsudação de pus, porém, em minicepas assintomáticas, mas com infecções latentes, nas quais o xilema apresenta baixas concentrações de células bacterianas, não é possível a visualização de sintomas de murcha ou sinais da doença como a exsudação bacteriana. Assim, para certificação de que as mudas para o plantio estão livres do patógeno, é necessário empregar um método capaz de detectar a bactéria, mesmo quando presente em baixas concentrações. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a PCR em tempo real para detecção da bactéria no período latente de infecção. Primeiramente, dentre seis oligonucleotídeos testados, o oligo 224R/224F, que amplifica a região do gene ribossomal 16S, foi o único específico para *R. solanacearum*. Subsequentemente desenvolveu-se um protocolo de extração de DNA bacteriano a partir do tecido vegetal infectado que consiste da maceração com nitrogênio líquido, adição de solução salina, centrifugação, descarte do sobrenadante e extração com o kit (Promega) de extração. Para avaliar o método da PCR em tempo real, mudas de eucalipto de quatro clones foram inoculadas com o isolado UFV32 de *R. solanacearum* e o DNA do patógeno foi quantificado aos 20 dias da inoculação. Aproximadamente 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colônia (ufc)/g de *R. solanacearum* foram detectadas. O limite de detecção da PCR em tempo real foi de 10^3 ufc/g contra 10^7 ufc/mL da PCR convencional, ou seja 10.000 vezes maior. O método mostrou-se eficiente na detecção e quantificação de *R. solanacearum* diretamente do tecido vegetal de eucalipto.

ABSTRACT

PEREIRA. Camila Santana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2011. **Detection of *Ralstonia solanacearum* in infected plants of eucalyptus with real time PCR.** Advisor: Acelino Couto Alfenas. Co-advisors: Poliane Alfenas-Zerbini e Carlos Alberto Lopes.

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is currently one of the most important bacterial diseases in eucalyptus. The use of healthy eucalyptus cuttings is the most effective method to prevent the introduction and spread of the pathogen in disease free areas. Infected plants can be identified visually by bacterial cell exudation from the host tissue and confirmed by analysis of PCR. However, in asymptomatic minicuttings with latent infections, in which the xylem shows low concentrations of bacterial cells it is not possible to visualize wilting symptoms bacterial exudation. Thus, for certification that eucalyptus cuttings are pathogen free, it is necessary to employ a sensitive method able to detect the bacteria, even when present in low concentrations in the host tissue. This study aimed to evaluate the real-time PCR for detection of bacteria in the latent period of infection. Among six primers previously tested, only the oligo 224R/224F was specific to *R. solanacearum*, that amplifies the r16S ribosomal gene region. Subsequently, it was developed a protocol to extract bacterial DNA from infected plant tissue consisting of tissue maceration in liquid nitrogen, addition of saline solution, centrifugation, discard of the supernatant and DNA extraction. Real-time PCR of four infected eucalyptus cuttings with *R. solanacearum* (UFV32) evaluated at 20 days after inoculation showed 10^5 to 10^6 colony forming units (cfu) of *R. solanacearum* / g of host tissue. The detection limit of real-time PCR was 10^3 cfu / g, compared with 10^7 cfu / mL for the conventional PCR. The method proved to be efficient for detection and quantification of *R. solanacearum* directly from infected eucalyptus plant tissue.

INTRODUÇÃO

A importância da cultura do eucalipto (*Eucalyptus* spp.) para o Brasil pode ser avaliada pela participação do setor florestal na economia do país. O setor responde atualmente por 4% do PIB (produto interno bruto), proporcionando setecentos mil empregos diretos e dois milhões de empregos indiretos. A área estimada das plantações com eucaliptos no Brasil é superior a 4 milhões de hectares (ABRAF, 2010). Adicionalmente, a cultura está em franca expansão na maioria dos estados brasileiros com tradição na silvicultura, ou em estados considerados como novas fronteiras, com crescimento médio no país de 7,1% ao ano entre 2004-2009 (ABRAF, 2010).

Todavia, o avanço das áreas plantadas com espécies e, ou clones mais produtivos sem o prévio conhecimento da resistência a doenças e as extensas áreas de plantio de um mesmo clone criam condições favoráveis à ocorrência de epidemias. Além de fungos, principal grupo de fitopatógenos para a cultura do eucalipto, algumas bactérias como *Ralstoniasolanacearum*, *Xanthomonasaxonopodis*, *Pseudomonascichorii* e *Erwiniapsidii*, foram relatadas como agentes causais de importantes doenças do eucalipto no Brasil (Alfenas et al., 2009).

Ralstoniasolanacearum [(Smith 1896) Yabuuchi et al. 1995] causadora da murcha bacteriana é uma bactéria gram-negativa presente no solo que infecta mais de 450 espécies de plantas, distribuídas em mais de 50 famílias, incluindo muitas culturas de importância econômica como batata (*Solanumtuberosum* L.), tomate (*Solanumlycopersicum*), banana (*Musa spp*) e eucalipto (Poussier et al., 1999). *Ralstonia solanacearum* é considerada uma unidade taxonômica complexa em que as linhagens mostram uma ampla diversidade genética. Tradicionalmente tem sido classificada em cinco raças com base na diferença de hospedeiros (Buddenhagen, 1962; He et al., 1983; Hayward, 1991) e em seis biovars com base em testes bioquímicos (Hayward, 1964; He et al., 1983). Fegan & Prior (2005) propuseram uma nova divisão composta por no mínimo quatro filotipos e subgrupos denominados sequevars que correspondem a grupos de isolados com patogenicidade similares ou isolados com a mesma origem geográfica (Prior & Fegan, 2005).

No Brasil, a murcha bacteriana é uma enfermidade relativamente recente para a cultura do eucalipto. Seu primeiro relato ocorreu no início da década de 1980, em plantios de *E. grandis* no município de Prata (Minas Gerais) (Sudo et al. 1983). relataram

a doença. Atualmente é considerada uma das mais importantes doenças bacterianas na eucaliptocultura, em virtude da natureza sistêmica das infecções, dos danos causados e das várias características do patossistema que dificultam o controle (Alfenas et al., 2006). Em 2005, a incidência da murcha bacteriana em viveiros clonais de eucalipto resultou em elevadas perdas nos Estados da Bahia, do Espírito Santo, do Maranhão, de Minas Gerais e do Pará, devido ao descarte de mudas e minicepas clonais, totalizando um prejuízo estimado em, no mínimo, seis milhões de reais (US\$ 2,7 milhões) (Alfenas et al., 2006). Sabe-se, contudo, que os prejuízos foram bem maiores, podendo ter atingindo cerca de 11 milhões de reais, ao considerar o valor real das minicepas, além das consequências de atrasos nos cronogramas de plantio e da necessidade de mudas de outros clones no mercado (Alfenas et al., 2009).

Para que o plantio de eucalipto possa ser realizado com sucesso, as mudas devem ser sadias, incluindo a ausência de infecção de *R. solanacearum* nas mudas. As principais fontes de inóculo nos viveiros são as macroestacas originárias e matrizes infectadas no campo, a água de irrigação e a areia utilizada nos canaletões (Alfenas et al., 2006). *Ralstoniasolanacearum* pode ser transmitida em viveiros durante o preparo de miniestacas resultando em eficiente disseminação da bactéria (Alfenas et al., 2009).

A diagnose da doença em minicepas pode ser realizada pelo teste de exsudação de pus bacteriano em um recipiente com água ou em gota da água, com o auxílio de um microscópio de luz (40X e 100X). Porém, em minicepas com infecções latentes, nas quais o xilema apresenta baixas concentrações de células bacterianas, não é possível a visualização de sintomas de murcha ou sinais da doença como a exsudação bacteriana. Assim, para certificação de que as mudas para o plantio estão livres do patógeno, é necessário um método capaz de detectar a bactéria, mesmo quando presente em baixas concentrações.

Para efeitos práticos, um ensaio de detecção requer rapidez, especificidade e sensibilidade a níveis inferiores aos que ocorrem em tecidos infectados naturalmente (Huang, et al., 2009; Weller et al., 2000). Métodos tradicionais, como isolamento da bactéria, caracterização morfológica, consomem muito tempo e podem resultar numa subestimação da população real da bactéria (Elphinstone et al., 1996; Yun et al., 2010). A reação em cadeia polimerase (PCR) oferece uma alternativa de identificação específica e sensível desta bactéria (Taghavi et al., 1996; Pastrik & Maiss, 2000). Porém o limite de detecção de um ensaio de PCR é limitada pela sensibilidade das seqüências-alvo e da eficiência de reação e a PCR clássica não tem provado ser útil

paradiagnósticos gerais, principalmente por causada necessidade de realizar uma análise de Southern blot para confirmar a identidade do produto da PCR e pela fácil contaminação cruzada (Elphinstone et al., 1996). Além disso, as baixas concentrações em que *R. solanacearum* pode ser encontrada no seu estágio latente, faz necessária a implementação de métodos de detecção de alta sensibilidade, especificidade e confiabilidade e que, ao mesmo tempo, sejam de fácil utilização e baixo custo. Dentro deste contexto, técnicas de detecção utilizando a PCR em tempo real são vantajosas em relação à técnica convencional, pois permitem a automação da técnica, são adequadas para o processamento em larga escala de amostras e tem potencial para uma quantificação altamente precisa do DNA alvo (Weller et al., 2000).

Diante da importância da murcha bacteriana para a cultura do eucalipto e da necessidade de implantação de um método rápido e prático para a diagnose desta doença, o presente trabalho objetivou: (i) validar oligonucleotídeos específicos para *R. solanacearum*; (ii) desenvolver um protocolo para extração de DNA de *R. solanacearum* diretamente do sistema vascular de plantas infectadas; e (iii) desenvolver um protocolo de PCR em tempo real para detecção da bactéria no período latente de infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

1- Validação de oligonucleotídeos específicos para *R. solanacearum*

Preliminarmente, validaram-se neste trabalho oligonucleotídeos específicos para a identificação de *R. solanacearum*.

1.1 - Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico, os isolados bacterianos (Tabela 1), armazenados em solução salina (0,85%) a temperatura ambiente, foram cultivados em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo o meio sólido 523 (Kado & Heskett, 1970) e após 24 – 48 h de incubação a 28°C, 2 mL de solução salina (0,85%) foram adicionada às placas e por raspagem com uma alça de Drigalski obteve-se uma suspensão bacteriana. A suspensão foi transferida para microtubos (2 mL) e as células bacterianas foram centrifugadas a 13.000 g durante 3 min. Em seguida o DNA foi extraído usando o kit de

extração e purificação de DNA genômico Wizard (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. O DNA obtido de cada isolado foi quantificado e a concentração foi ajustada para 10 ng μL^{-1} .

Tabela 1. Isolados de *Ralstonia solanacearum* e de outras espécies comparadoras utilizados para validação dos oligonucleotídeos específicos

Isolados de <i>Ralstoniasolanacearum</i>	Hospedeiro	Origem
C07 ^a	<i>Solanumtuberosum</i>	Amazonas
C208 ^a	<i>Solanumtuberosum</i>	Roraima
C226 ^a	<i>Solanummelongena</i>	Rio Grande do Sul
C248 ^a	<i>Solanumlycopersicum</i>	Paraná
C255 ^a	<i>Solanumlycopersicum</i>	Paraná
UFV7 ^b	<i>Corymbiacitriodora</i>	Bahia
UFV13 ^b	<i>Eucalyptus spp.</i>	Minas Gerais
UFV17 ^b	<i>Eucalyptus spp.</i>	Espírito Santo
UFV20 ^b	<i>Eucalyptus spp.</i>	Espírito Santo
UFV32 ^b	<i>Eucalyptus spp.</i>	Bahia
UFV34 ^b	<i>Eucalyptus spp.</i>	Pará
UFV55 ^b	<i>Eucalyptus spp.</i>	Bahia
UFV60 ^b	<i>Eucalyptus spp.</i>	Bahia
Espéciescomparadoras		
<i>Xanthomonasgardneri</i> ^c		
<i>Pseudomonas syringaepv. tomato</i> ^c		
<i>Clavibactermichiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ^c		
<i>Erwiniapsidii</i> ^c		
<i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i> – Clone UFV-125		

^aPesquisador Carlos Alberto Lopes da Embrapa Hortaliças – Brasília, DF.

^bLaboratório de Patologia Florestal/BIOAGRO do Departamento de Fitopatologia da UFV.

^cLaboratório de Bacteriologia da UFV.

1.2 – PCR (Polymerase Chain Reaction)

Avaliou-se a especificidade de seis oligonucleotídeos específicos para *R. solanacearum* desenvolvidos por Opina et al.(2003) e Chen et al.(2009) (Tabela 2). A reação foi realizada em um volume final de 25 μL , contendo 0,4 μM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 0,2mM de cada deoxinucleotídeos (dATP,dTTP, dGTP, dCTP)5 X de Tampão de reação (Promega), 2,5 mM MgCl_2 , 10 ng de DNA e água ultrapura para completar o

volume de reação. Em todas as reações foi incluído um controle negativo com água destilada estéril. Os ciclos das reações foram os mesmos descritos por Opina et al.(2003) e Chen et al.(2009), com a exceção do oligonucleotídeos 224F/224R. Para esses oligonucleotídeos foi realizado um ajuste no programa de amplificação e a padronização da reação consistiu em uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 20s, 61°C por 25 s, 72°C por 35 s, e de um período de extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 2%, corados com GelRed™ (Uniscience). Foram aplicados 10 µL de cada amostra em cada canaleta do gel e, posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese sob voltagem constante de 100 V. Para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o padrão de peso molecular de 100pb DNA Ladder(Life Technologies).Posteriormente, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta pelo sistema de fotodocumentação L.PIX (Loccus Biotecnologia, Brasil).

Tabela 2. Oligonucleotídeos específicos para *Ralstonia solanacearum* validados, utilizados neste estudo.

Região alvo	Sequência(5'-3')	Tamanho
Endoglucanase gene ^a	Rs185F= CCGAAAGCAGACTACAACC Rs185R= ACCTTCCCCTGGACAAAAT	185 pb
fliC ^a	Rsol_fliCF= GAACGCCAACG GTGCGAACT Rsol_fliCR = GGCGGCCTTCAGGGAGGTC	400 pb
16S rRNA gene ^a	Rs224F= TAGTTGTTGGGGATTCATTT Rs224R = CCTGTGTCCACTTTCTCTTT	224 pb
ITS ^a	Rs199F= AGTAACTCGGCTGTTCTTT Rs199R =TATTCGCTTGACCCTATAA	199 pb
deacetylase gene ^a	RSF= GTGCCTGCCTCCAAAACGACT RSR= GACGCCACCCGCATCCCTC	159 pb
deacetylase gene ^b	759= GTCGCCGTCAACTCACTTTCC 760= GTCGCCGTGAGCAATGCGGAATCG	283 pb

^aChen et al., 2009

^bOpina et al., 1997

2 - Extração de DNA de *R. solanacearum* do sistema vascular de plantas infectadas

2.1 Isolado bacteriano e curva de crescimento de *R. solanacearum*

Para os ensaios subsequentes, utilizou-se o isolado UFV32 (Tabela 1). A curva de crescimento bacteriano foi obtida pelo método de determinação da concentração do inóculo pela contagem em placas de Petri, relacionando unidades formadoras de colônia (ufc) com densidade óptica (DO). Para isso, preparou-se uma suspensão original da bactéria e a partir desta foi realizada uma diluição em série (10^{-1} a 10^{-10}). Foram adicionadas seis gotas de cada diluição em placas contendo meio sólido 523 (Kado&Heskett, 1970), sendo duas diluições por placa. As placas foram mantidas a 28 °C e após 48 h foi realizada a contagem das ufc. Em uma segunda etapa, determinou-se a densidade óptica ($DO_{\lambda=540}$) das amostras. Com os resultados, procedeu-se a análise de regressão linear, obtendo-se uma reta da equação relacionando-se ufc com OD. As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS®.

2.2– Material vegetal e inoculação de *R. solanacearum*

O clone UFV-125 (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*) foi escolhido por ter sido um dos mais suscetíveis à murcha bacteriana em experimentos anteriores (Fonseca et al., 2008). As mudas com 90 dias de idade foram transplantadas em sacos plásticos de 2L de capacidade, contendo substrato MecPlant® complementado com 6 Kg m⁻³ de fosfato supersimples e 3 Kg m⁻³ de Osmocote® (Figura 1A). As plantas foram inoculadas três dias após o transplantio.

Para a produção de inóculo, o isolado UFV32 foi cultivado a 28 ± 2 °C em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo o meio sólido 523 e após 24h de incubação foi repicado para novas placas contendo, o meio de Kelman (1954), acrescido de cloreto de tetrazólio (0,005%). Após 36- 48h de incubação foram selecionadas colônias de aspecto liso e fluido com o centro vermelho e as bordas brancas (Kelman, 1954). As colônias selecionadas foram repicadas para novas placas contendo meio sólido 523 e novamente cultivadas a 28 ± 2 °C. Após 24 h de incubação, as bactérias crescidas neste meio foram utilizadas para o preparo da suspensão bacteriana.

A inoculação foi realizada pelo método de ferimento com deposição de inóculo (Fonseca et al., 2008). Anteriormente à inoculação, realizou-se com auxílio de um bisturi, um corte superficial longitudinal de, aproximadamente, 1 cm de

comprimento, no caule das plantas próximo à base, até atingir o tecido xilemático (Figura 1 B). Em seguida, com auxílio de uma micropipeta (Figura 1C) depositaram-se no corte 100 μL da suspensão bacteriana, a 10^9ufcmL^{-1} . Em seguida, foi colocado um algodão úmido abaixo do ferimento e cobriu-se o local com um filme de PVC, de modo a propiciar uma câmara úmida (Figura 1D). Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento a $28 \pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h a 40 micromoles de fótons $\text{s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (Figura E).

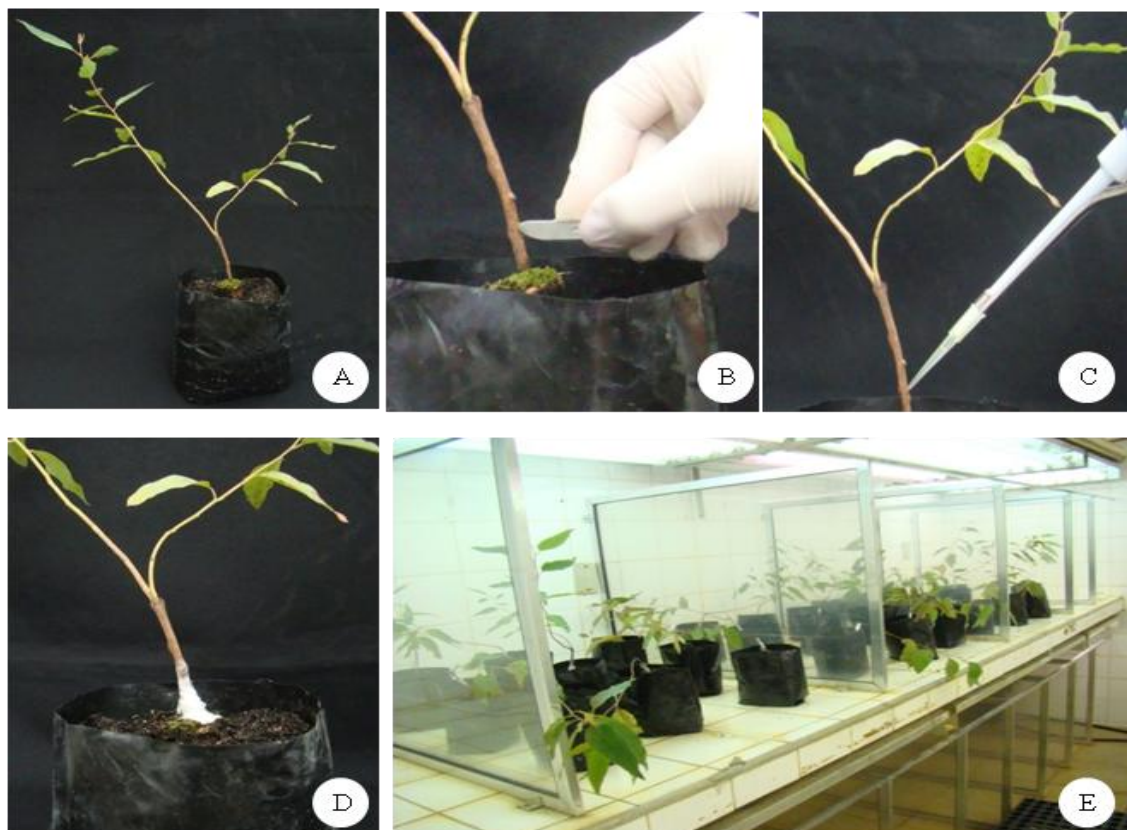


Fig. 1. Inoculação de *Ralstonia solanacearum* pelo método do ferimento em mudas de eucalipto (Fonseca et al., 2008) . A - Clone UFV125(*Eucalyptusurophyllax E. camaldulensis*) transplantado; B - cortesuperficial longitudinal com auxílio de um bisturi; C- deposição da suspensão bacteriana; D - câmara úmida com algodão coberto com umfilme de PVC; E- plantas após a inoculação na câmara de crescimento.

2.3 –Métodos de extração do DNA

Com o objetivo de extrair DNA de *Ralstonia solanacearum* do tecido vegetal infectado realizaram-se alguns testes em mudas inoculadas, que apresentavam sintomas de murcha e escurecimento dos tecidos internos do caule. Pequenas tiras de tecido vegetal do caule foram retiradas com o auxílio de um bisturi, em seguida foram testados três métodos de extração: (i) as tiras de tecido foram colocadas em um microtubo de 2,0 mL e foi realizada a extração do DNA utilizando-se o kit Wizard de extração e purificação de DNA genômico (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, (ii) acréscimo de 1 mL de solução salina 0,85% às tiras de tecido, centrifugação a 13000 g por 3 min, descarte do sobrenadante e extração do DNA utilizando-se o kit (Promega)Wizard; (iii) maceração do tecido vegetal com nitrogênio líquido, acréscimo de 1 mL de solução salina 0,85%, centrifugação a 13000 g por 3 min, descarte do sobrenadante e extração do DNA utilizando-se o kit (Promega).

2.4 - Detecção por PCR convencional

As amostras de DNA obtidas pelos diferentes métodos de extração foram submetidas à análise de PCR com o oligonucleotídeo 224F/224R, conforme descrito anteriormente.

3 – Detecção de *R. solanacearum* via PCR em tempo real

3.1 – Material vegetal

O clone UFV125 foi inoculado com o isolado de UFV 32 de *R. solanacearum* conforme descrito anteriormente. Para a quantificação do DNA do patógeno, amostras do caule a dois centímetros acima e abaixo do ponto de inoculação foram coletadas de dois em dois dias, a partir do dia da inoculação: Tratamento 1 (T1) - mudas saudáveis, T2 – mudas imediatamente inoculadas, T3 – mudas com 2 dias após inoculação (d.a.i.), T4 - mudas com 4 d.a.i., T5 - mudas com 6 d.a.i., T6 - mudas com 8 d.a.i., T7 - mudas com 10 d.a.i., T8 - mudas com 12 d.a.i. e T9 - mudas com 14 d.a.i.

Essas amostras foram submetidas ao método de extração (iii), com tecido macerado com nitrogênio líquido, acréscimo de 1 mL de solução salina 0,85% , centrifugação a 13000 rpm por 3 min e utilização do Kit de extração(Promega).

Paralelamente, quatro clones de *Eucalyptus* spp. (JAC443, TLS479, TLS524, TLS880) foram inoculados com o isolado UFV32, conforme descrito anteriormente, e amostras de tecido do caule foram retiradas após 20 dias da inoculação e o DNA foi extraído de acordo com o método iii.

3.2 – Delineamento experimental

Todos os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado com três plantas (réplicas). Como controle foi utilizada água destilada estéril.

3.3 – PCR em tempo real

As análises quantitativas foram realizadas em um termociclador CFX96 Real-Time System (Bio-Rad), utilizando-se SYBR Green para monitorar a síntese de DNA de fita dupla. As reações foram preparadas em um volume final de 10 µL, contendo 2 µL de DNA, 1 X do corante “Fast SYBR[®] Green Master Mix” (AppliedBiosystems), 0,1 µL de ambos os oligonucleotídeo (20µM cada) e água ultrapura para completar o volume de reação.

Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e a especificidade da amplificação foi determinada por meio da análise das curvas de dissociação. Para quantificar *R. solanacearum* de plantas inoculadas, uma curva padrão de PCR em tempo real foi gerada. Realizou-se uma diluição em série (10^9 ufc mL⁻¹– 10^0 ufc mL⁻¹) a partir de uma suspensão a 1×10^9 ufc mL⁻¹ do isolado UFV32. O DNA foi extraído conforme se segue: 100 µL da suspensão bacteriana de cada diluição e 0.1 g de caule sadio de eucalipto macerado com nitrogênio e transferido para um microtubo de 1.5 mL; foi acrescido 1 mL de solução salina e as amostras foram centrifugadas a 13.000g por 4 min; o sobrenadante foi removido e procedeu-se a extração de DNA conforme descrito anteriormente. Para a construção de uma curva padrão para detecção de *R. solanacearum* em eucalipto, 2 µL de DNA de cada amostra foram amplificados via PCR em tempo real. Este experimento incluiu um controle positivo usando DNA de uma cultura pura de *R. solanacearum*(UFV32), e dois controles negativos usando DNA do

caule de uma planta sadia e água esterilizada. A curva padrão gerada foi usada para a quantificação de células bacterianas nas análises de amostras de tecidos do caule infectados.

A curva padrão foi obtida por regressão dos valores de Ct versus log da ufc inicial de *R. solanacearum*.

Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de dissociação “melting”, a qual foi realizada para determinar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de oligonucleotídeo ou qualquer outro produto inespecífico.

RESULTADOS

1- Especificidade dos oligonucleotídeos

Dentre os oligonucleotídeos testados, apenas 224F/224R amplificou um único fragmento para os isolados de *R. solanacearum* testados e nenhum fragmento para as bactérias controles utilizadas neste estudo (Figura 2).

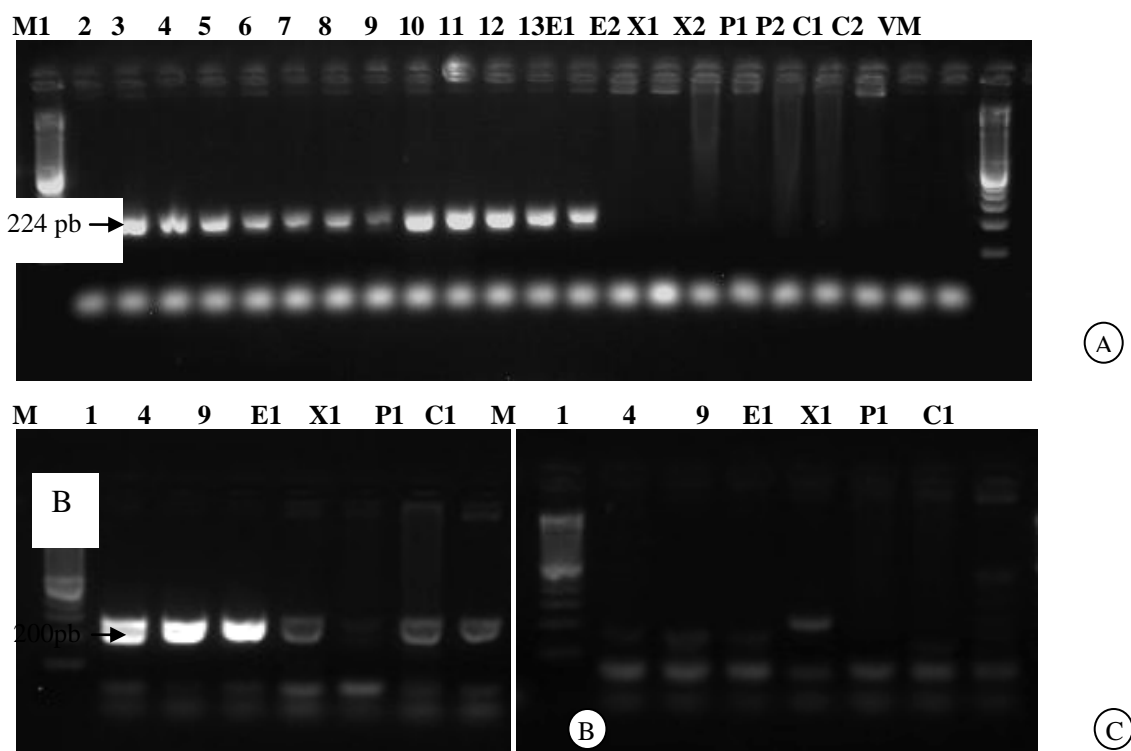


Fig. 2 Produtos da PCR amplificados de isolados de *Ralstonia solanacearum* e isolados controles com A - Oligonucleotídeo 224F/224R; B - Oligonucleotídeo 759/760 e C -

Oligonucleotídeo RSF/RSR . M – Marcador de 100pb; 1 a 13 – Isolados de *Ralstonia solanacearum*; E1/E2 – *Erwinia amylovora*; X1/X2 - *Xanthomonas gardneri*; C1/C2 - *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*; P1/P2 - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; V – Clone UFV125

2 – Protocolo para extração de *R. solanacearum* diretamente do sistema vascular de plantas infectadas

2.1 - Curva de crescimento de *R. solanacearum*

A curva de crescimento do isolado UFV32 de *R. solanacearum* (Figura 3) mostra que a concentração da bactéria em relação à absorbância foi linear.

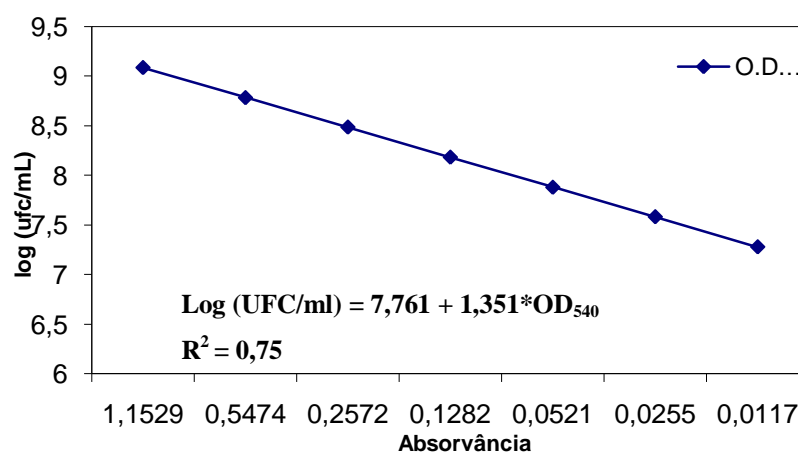


Fig. 3. Ajuste da curva de concentração de *Ralstonia solanacearum* (em unidades formadoras de colônia – ufc) em função da absorbância a 540 nm.

2.2 - Detecção e sensibilidade de *Ralstonia solanacearum* via PCR convencional

Apenas com o método (v), que consiste na maceração com nitrogênio líquido, adição de 1 mL de solução salina (0,85%) seguida por centrifugação a 13000 g por 3 min, descarte do sobrenadante e extração do DNA, conseguiu-se DNA de *R. solanacearum* do tecido vegetal. As amostras de DNA obtidas foram amplificadas com o oligonucleotídeo 224F/224R para comprovar a extração de DNA de *R. solanacearum* (Figura 4).

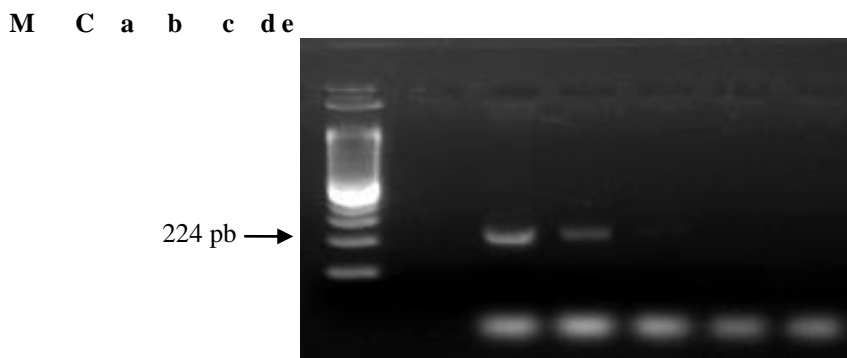


Fig. 4. Amplificações com os oligonucleotídeos 224F/224R das amostras de DNA extraídas diretamente do tecido de plantas inoculadas. M – Marcador de 100 pb; C (controle) – Água; a – Isolado UFV32 de *R. solanacearum*; b/c – Amostras de tecido do caule com sintomas da doença; d – Clone UFV-125 (*E. urophyllax* *E. camaldulensis*); e – Isolado de *Xantomonassp.*

A sensibilidade do oligonucleotídeo 224F/224R foi avaliada utilizando-se uma diluição em série do DNA total extraído de *R. solanacearum* de uma suspensão ajustada para 10^9 ufc. O limite de detecção no PCR convencional foi 10^7 ufc (Figura 5). Não houve amplificação com a suspensão original 10^9 ufc, mas se observou um arraste ao longo da canaleta (dados não apresentados).

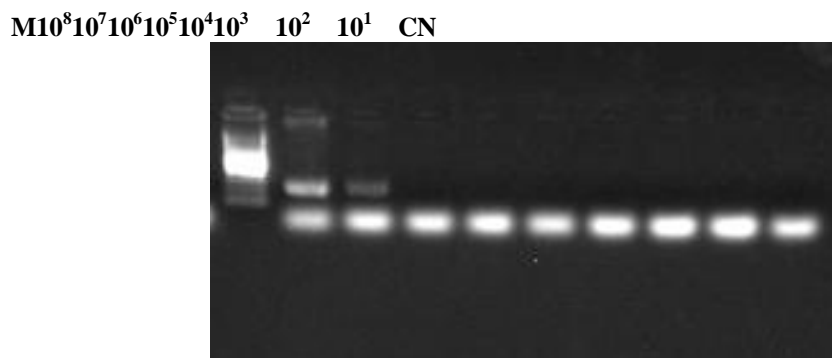


Fig. 5. Sensibilidade de detecção de *Ralstonia solanacearum* utilizando-se o oligonucleotídeo 224F/224R via PCR convencional. M – Marcador de 100 pb; CN – Controle negativo (água). 10^8 - 10^1 – Diluição *R. solanacearum* em ufc/mL.

3 - Detecção e quantificação de *R. solanacearum* via PCR em tempo real

3.1 – Curva padrão

Devido á baixa especificidade do corante intercalante empregado (SYBR Green) que possui ligação altamente específica para qualquer DNA de fita dupla, uma análise do pico da curva de dissociação (Figura 6) foi avaliada para validação do ensaio. Assim, foram consideradas viáveis somente as amostras com pico único e dentro do eixo na curva de dissociação.

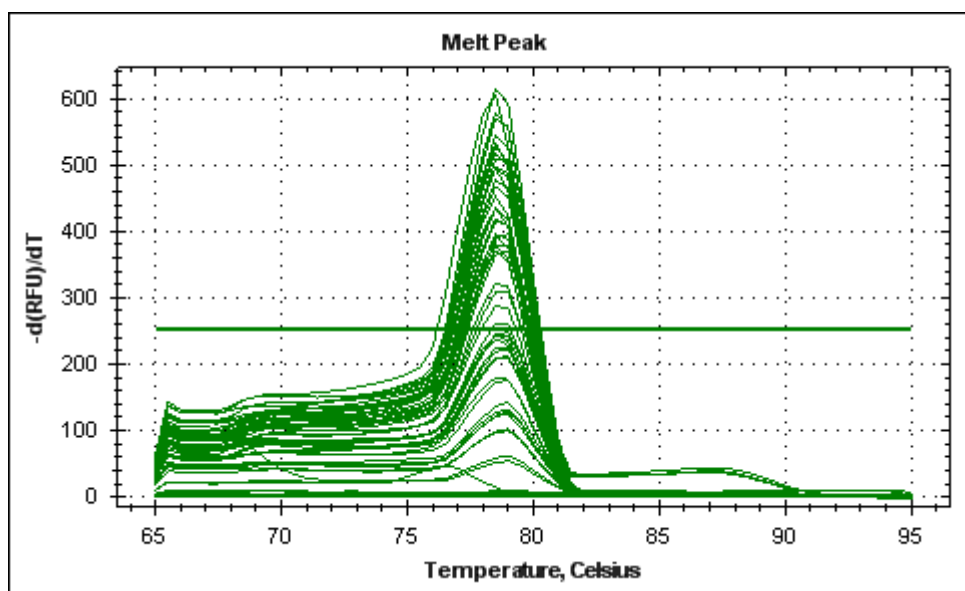


Fig. 6. Curva de dissociação realizada no estudo de amplificação do oligonucleotídeo 224F/224R. Pico máximo de fluorescência entre 75-80° C.

O perfil das amplificações do PCR em tempo real é mostrado na Figura 7. O limite de detecção foi de 10^2 ufc de *R. solanacearum*(Figura 7A). Os valores de Ct para 10^8 , 10^7 e 10^1 ufc foram variáveis e, portanto, não foram incluídos na análise. Não houve nenhum sinal de amplificação para a diluição de 10^9 ufc. A curva padrão construída (Figura 7B) teve um alto coeficiente de correlação ($R^2 = 0,99$). A eficiência da amplificação do PCR em tempo real foi 101,2%, indicando que o ensaio pode ser usado para acurada quantificação de DNA bacteriano.

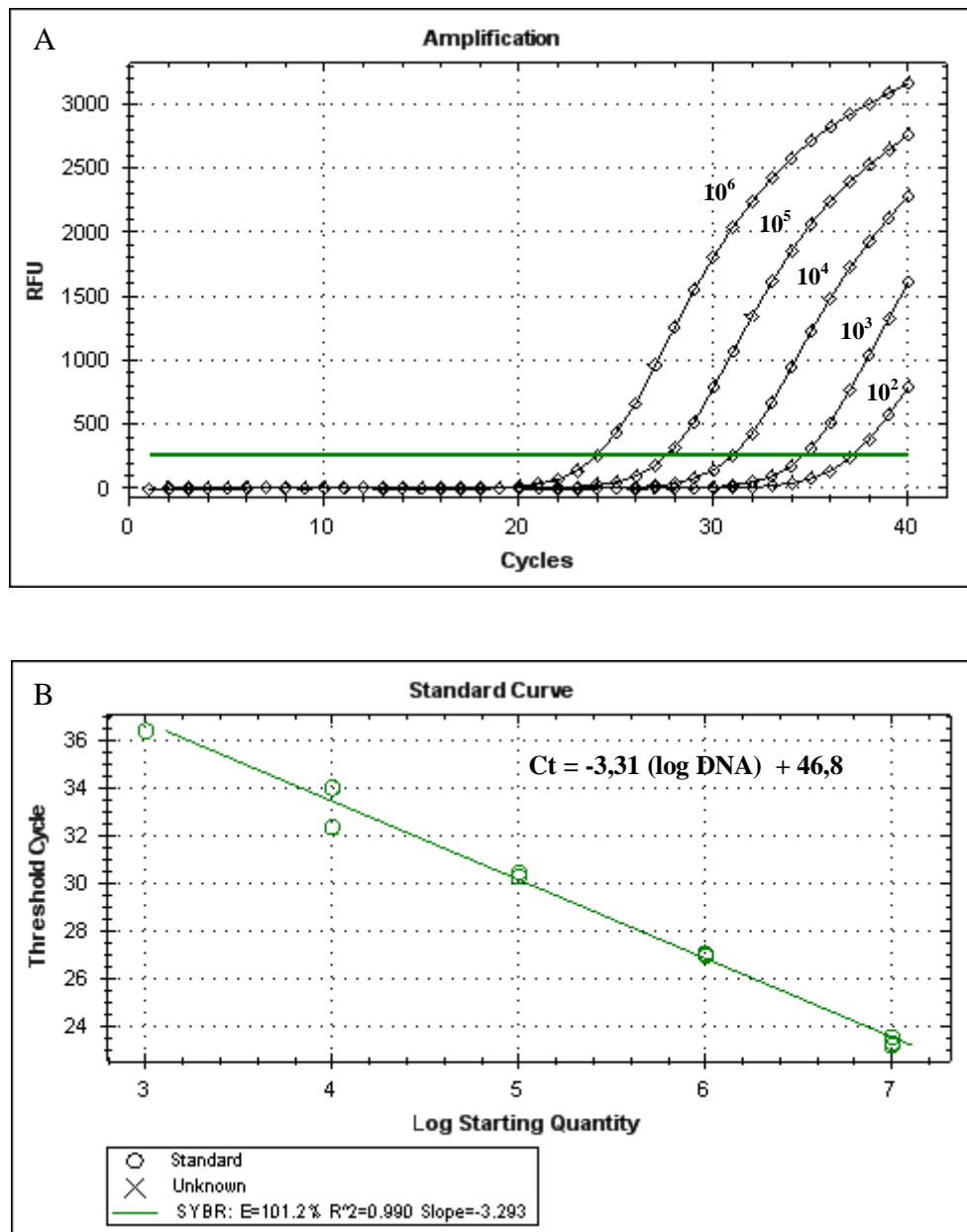


Fig. 7. Curva padrão para detecção de *Ralstonia solanacearum* em tecido vegetal infectado. A –Cinética do corante SYBR Green em diferentes concentrações de *R. solanacearum*. B - Curva de detecção pela plotagem do log de ufc versus o ciclo threshold de cada reação detectada pelo PCR em tempo real com o oligonucleotídeo 224R/224F.

3.2 – Ensaio biológico

As plantas inoculadas não apresentaram sintomas 30 dias após a inoculação. Na PCR em tempo real não se detectou nenhum sinal de amplificação das amostras coletadas do caule ao longo dos dias após a inoculação.

3.3 – Análise de amostras

Através da quantificação absoluta por PCR, usando SYBR Green e o oligonucleotídeo 224R/224F foi confirmada a presença de *R. solanacearum* nas 4 amostras coletadas dos clones inoculados (Figura 7 e Tabela 3).

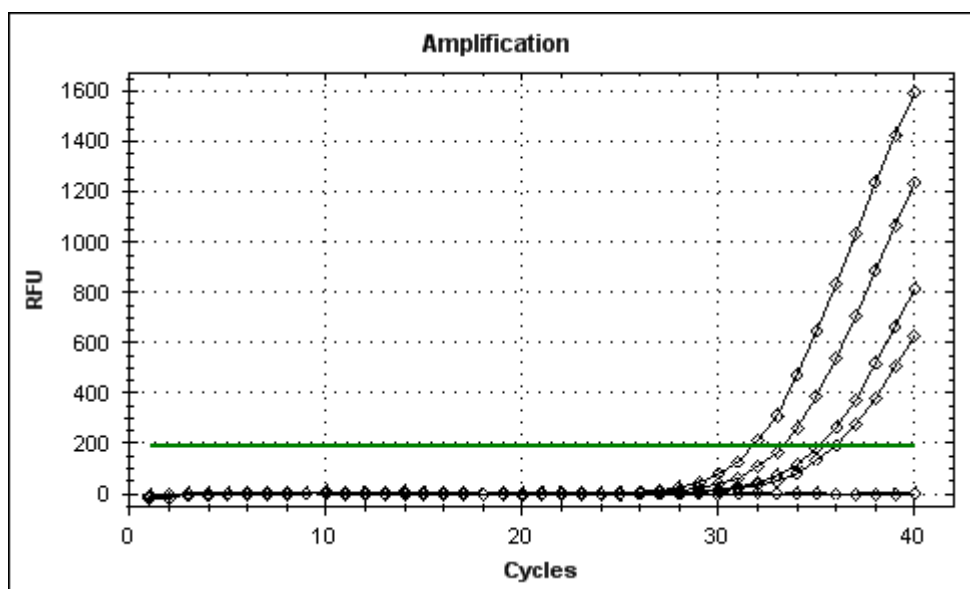


Fig. 7. Cinética da quantificação de DNA de *Ralstonia solanacearum* em clones de *Eucalyptus* spp. inoculados via PCR em tempo real.

Tabela 3. Quantificação de DNA de *R. solanacearum* em clones inoculados via PCR em tempo real

Clone	Ct	Concentração de <i>R. solanacearum</i>
JAC443	32,03	$2,8 \times 10^6$ ufc/grama de tecido
TLS524	32,85	$1,6 \times 10^6$ ufc/grama de tecido
TLS880	35,25	$3,5 \times 10^5$ ufc/grama de tecido
TLS479	36,05	$3,2 \times 10^5$ ufc/grama de tecido

DISCUSSÃO

Atualmente, no Brasil, os plantios de eucalipto são realizados principalmente com mudas clonais, o que permite a manutenção plena das características da planta-mãe, obtendo-se ganhos em crescimento volumétrico, uniformidade da matéria prima, qualidade da madeira e resistência a doenças (Alfenaset al., 2009). Apesar das grandes vantagens do plantio clonal, o emprego de mudas clonais portadoras de infecções latentes vasculares como *R. solanacearum* é um dos métodos mais eficientes de disseminação e introdução da doença em áreas livres do patógeno. Para a certificação de mudas sadias, tem-se empregado as técnicas de exsudação macroscópica e microscópica de pus bacteriano e a PCR convencional em plantas com suspeitas de infecção pela bactéria (Alfenas et al, 2009). Todavia, a eficiência desses métodos é relativamente baixa e incapaz de detectar o patógeno, quando presente em baixas concentrações. Assim, avaliou-se, neste trabalho, a eficiência da PCR em tempo real para detecção de *R. solanacearum* em plantas infectadas de eucalipto, que a exceção do preço do equipamento tem custo relativamente igual a PCR convencional.

A validação dos principais oligonucleotídeos desenvolvidos para identificação de *R. solanacearum* (Chen et al., 2009) mostrou que apenas o oligonucleotídeo 224R/224F foi específico e potencialmente útil para análise de PCR em tempo real. A especificidade para o organismo alvo ou gene é um elemento crítico no uso de qualquer ensaio de PCR em tempo real. Os demais amplificaram fragmentos inespecíficos e, ou foram inespecíficos para os isolados de *R. solanacearum* avaliados neste estudo. A inespecificidade pode ser atribuída à ampla variabilidade genética do patógeno. Chen et al., (2009) ao avaliarem o mesmo conjunto de oligonucleotídeos, consideraram o RSF/RSR como mais específico para *R. solanacearum* oriundos de diferentes hospedeiros. Provavelmente, a discrepância dos resultados deve-se ao fato que Chen et al. (2009) trabalharam com isolados do grupo asiático, geneticamente distinto do americano, que incluem isolados deste estudo.

O operon DNA ribossomal é, atualmente, uma das principais regiões genômicas-alvo para o desenvolvimento de oligonucleotídeos para PCR em diagnósticos moleculares, parcialmente porque a região provê uma alta significância para análises de relações filogenéticas. (Heid et al., 1996; Pastrik et al., 2002). Muitos ensaios de PCR em tempo real para detecção de *R. solanacearum* utilizam a amplificação de genes ribossomais (16S ou 16-23S, região espaçadora intergênica do ribossomo) (Pastrik et

al., 2000; Pastrok et al., 2002; Vander Wolf et al., 2000; Weller et al., 2000), entretanto é necessário validação dos oligonucleotídeos, pois eles podem resultar em falso positivo com espécies relacionadas (Taghavi et al., 1996).

O método de detecção de um patógeno, além da especificidade deve ser preciso, simples, rápido e de custo relativamente baixo. Neste estudo, visando eliminar as etapas de isolamento e cultura da bactéria, desenvolveu-se um protocolo de extração de DNA bacteriano a partir do tecido vegetal infectado de plantas de eucalipto. Dentre três métodos testados, a maceração do tecido infectado em nitrogênio líquido, contendo solução salina (0,85%), seguida de centrifugação, descarte do sobrenadante e extração do DNA (Kit Promega) foi o mais eficiente. Os demais métodos testados renderam baixas concentrações de DNA e não permitiram amplificação, mesmo quando se empregou o oligo 224F/R em PCR convencional ou em tempo real. Paralelamente, ao se realizar uma amplificação com microsátélites específicos para eucalipto (Brondani, et al., 2002), e observaram-se fragmentos com baixa intensidade, mas característicos do perfil de amplificação de clones de eucalipto. Esses resultados indicam que o DNA obtido é do tecido vegetal e não do patógeno-alvo (dados não apresentados). A maceração em nitrogênio líquido é fundamental para extração do DNA bacteriano e a pré-lavagem em solução salina deve eliminar micro-organismos presentes no tecido vegetal.

Validado um oligo específico e desenvolvido um método eficiente para extração do DNA da bactéria a partir de tecidos infectados de eucalipto, avaliou-se a eficiência da PCR em tempo real. A alta sensibilidade, ou a habilidade de detectar pequenas quantidades do DNA alvo do patógeno, é outro elemento crítico no desenvolvimento da PCR em tempo real. Enquanto alguns estudos têm demonstrado alta sensibilidade pela utilização de dois diferentes conjuntos de reações e dois conjuntos de oligonucleotídeos (Li & Hartman, 2003; Zhang et al., 2005), neste trabalho focou-se em um único estágio de reações com o objetivo de desenvolver um ensaio relativamente rápido, exequível e de menor custo. O teste de sensibilidade via PCR em tempo real utilizando o corante SYBR Green permitiu a construção de uma curva padrão com quantidades conhecidas de ufc, em relação à concentração de DNA com o Cyclethreshold (Ct), fornecido pelo programa de análise do PCR em tempo real. Assim, quantidades desconhecidas de ufc podem ser determinadas após a corrida da reação. Para comprovar a eficiência deste método, inoculou-se um clone híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis* (UFV-135), altamente suscetível a *R. solanacearum* com o isolado UFV32 do patógeno e a seguir quantificou-se a concentração da bactéria ao longo dos primeiros dias após a

inoculação, quando ainda não era possível a visualização dos sintomas e, ou sinais da doença. Porém, nenhum sinal de amplificação foi detectado (dados não mostrados). Após 30 dias da inoculação, quando os sintomas já são visíveis em plantas infectadas, constatou-se que não houve desenvolvimento da doença, observando o escurecimento do tecido interno do caule apenas no ponto de inoculação. Acredita-se que isso ocorreu devido ao estado fisiológico das mudas inoculadas, que tinham mais de 120 dias e não estavam em bom estado, uma vez que o mesmo isolado inoculado em tomate pelo mesmo método causou doença com sintomas visíveis em dois dias após a inoculação. Paralelamente, mudas de eucalipto de quatro clones foram inoculadas com o isolado UFV32 de *R. solanacearum* o DNA do patógeno quantificado após 20 da inoculação, apresentou aproximadamente 10^5 a 10^6 ufc/g de *Ralstoniasolanacearum* no extrato total de DNA.

Baseado nas comparações entre a PCR em tempo real e PCR convencional, a primeira foi 10000 vezes mais sensível que a segunda para detecção de *R. solanacearum*. Estes resultados claramente demonstram que a PCR em tempo real é altamente mais sensível e pode detectar níveis muito menores de *R. solanacearum* que a PCR convencional. O limite de detecção da PCR em tempo real foi de 10^3 ufc/g. Chen et al., (2009) conseguiram detectar 10^2 ufc/g de tecido de *R. solanacearum* em amostras de caule de tomate. O limite de detecção de *R. solanacearum* em amostras de eucalipto pode ter sido afetado pela presença de maior quantidade de substâncias que inibem ou reduzem a amplificação, inibidores, como compostos fenólicos (Martins, 2000). Porém, o método se mostrou eficiente na detecção e quantificação de *R. solanacearum* diretamente do tecido vegetal de eucalipto, eliminando etapas como o isolamento e cultivo da cultura que consomem tempo e são passíveis de contaminação. Além de um limite de detecção superior a técnicas convencionais, o que permite certificar com maior precisão a inexistência do patógeno em mudas de eucalipto provenientes de viveiros clonais, garantido maior segurança na comercialização dessas mudas e evitando a disseminação do patógeno.

Conclusões:

- 1- Os oligonucleotídeos 224F/R foram específicos para detecção de *R. solanacearum*.
- 2- O protocolo para extração de *R. solanacearum* diretamente do sistema vascular de plantas infectadas foi eficiente para obtenção de DNA da bactéria.
- 3- A PCR em tempo real foi específica e 1000 vezes mais sensível que a PCR convencional para detecção e quantificação de *R. solanacearum* em plantas infectadas de eucalipto.

REFERÊNCIAS

- ABRAF, Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico da ABRAF 2010, ano base 2009**. Brasília, 2010. 140p.
- ALFENAS, A. C. et al. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 357-366, 2006.
- ALFENAS, A. C., ZAUZA, E. A. V., MAFIA, R. G. AND ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2ª ed. UFV, Viçosa, MG. 2009
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. *Mol. Genetic Genomics*. v.267, p. 338-347, 2002

- BUDDENHAGEN, I. W.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 52, p.726, 1962.
- CHEN, Y.; WEN-ZHI, Z.; XIN, L.; ZHONG-HUA, M.; CAITILYN, A.; JIAN-HUA, G.A Real-time PCR assay for the quantitative detection of *Ralstonia solanacearum* in horticultural soil and plant tissues. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 20, p.193-201, 2009.
- COOK, D.; E. BARLOW; AND L. SEQUEIRA. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v. 2, p.113–121, 1989.
- ELPHINSTONE, J. G. J.; HENNESSY, J. K.; WILSON, D. E.. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) in potato tuber extracts. **EPPO Bull**, v.26, p. 663-678, 1996.
- FEGAN, M. & PRIOR, P. How to complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. In. Allen C., Prior & Hayward A. C. (Eds.). *Bacterial Wilt: the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*, **APS Press**, p. 449-461, 2005.
- FONSECA, N. R.; ALFENAS, A. C.; GUIMARÃES, L. M. S.; OLIVEIRA, L.S. S.; LOPES, C. A. . Inoculação de *Ralstonia solanacearum* em mudas clonais de *Eucalyptus* spp.. In: XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2008, Belo Horizonte, MG. *Tropical Plant Pathology*. v. 33. p. S267-S267, 2008
- HAYWARD, A. C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal Applied Bacteriology**, v.27, p.265–277, 1964.
- HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 65-87, 1991.
- HE, L. Y.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. **Plant Disease**. v.67, p.1357–1361, 1983.

- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Res.** v.6, p. 986-994, 1996.
- HUANG, J.; WU, J., C. LI.; C. XIAO; G. WANG. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil with quantitative, real-time PCR assays. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p. 1729–1739, 2009.
- KADO, E. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopatology**, v. 60, p. 969-976, 1970.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Ralstonia solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, v. 44, p.693, 1954.
- LI, X.; DORSCH, M.; DEL DOT, T.; SLY, L. I.; STACKEBRANDT, E.; HAYWARD, A. C..Phylogeny of biovars of *Pseudomonas solanacearum* based on sequencing of 16S rRNA. **ACIAR Proc.** v.45, p.93–95, 1993.
- LI, S. & HARTMAN, G. L. Molecular detection of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots and soil. **Plant Pathol.** v.52, p.74-83, 2003.
- OPINA, N.; TAVNER, F.; HOLLWAY, G. A novel method for development of species and strain specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). **Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.** v.5, p.19-30, 1997.
- PASTRIK, K. H.; ELPHINSTONE J. G.; PUKALL, R. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. **European Journal Plant Pathology**. v.108, p. 831-842, 2002.
- PASTRIK, K. H. & MAISS, E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. **J. Phytopathol.** v.148, p. 619-626, 2000.

- POUSSIÉ, S.; VANDEWALLE, P.; LUISETTI, J. Genetic Diversity of African and Worldwide Strains of *Ralstonia solanacearum* as Determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hrp* Gene Region. **Applied And Environmental Microbiology**, v.65, p.2184-2194, 1999.
- PRIOR, P. & FEGAN, M. Recent Developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. **Acta Horticulturae**, v. 695, p. 127-136, 2005.
- SUDO, S.; OLIVEIRA, G.H.N.; PEREIRA, A. C. Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E. F. SMITH. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p.631, 1983.
- TAGHAVI, M.; HAYWARD, C.; SLY, L. I.; FEGAN, M. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol**, v.46, p. 10-15, 1996.
- VAN DER WOLF, J.M.; VAN BECKHOVEN, J.R.C.M.; DE HAAN, E.G.; VAN DEN BOVENKAMP, G.W.; LEONE, G.O.M. Specific detection of *Ralstonia solanacearum* 16S rRNA sequences by AmpliDet RNA. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.25–33, 2004.
- WELLER, S. A.; ELPHINSTONE, J. G.; SMITH, N. C.; BOONHAM, N.; STEAD, E. Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. **Applied And Environmental Microbiology**, v.66, p. 2853–2858, 2000.
- YUN, C.; ZHANG, W-Z.; LIU, X.; MA, Z-H.; LI, B.; ALLEN, C.; GUO, J-H. A Real-Time PCR Assay for the Quantitative Detection of *Ralstonia solanacearum* in Horticultural Soil and Plant Tissues. **Journal. Microbiology. Biotechnology**, v. 20, p. 193–201, 2010.

ZHANG, Z. G.; ZHANG, J.Y.; WANG, Y. C.; ZHENG, X. B. Molecular detection of *Fusariumoxysporum* f. sp.*niveum* and *Mycosphaerellamelonis* in infected plant tissues an soil. **FEMS Microbiol.Lett.**v.249, p.39-47, 2005.