

LILIAN CAÇÃO COSTA

**CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E MOLECULAR DA INTERAÇÃO  
ENTRE CULTIVARES DE BATATA (*Solanum tuberosum* L.) E BACTÉRIAS  
PECTINOLÍTICAS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

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

T

Costa, Lilian Cação, 1985-  
C837c      Caracterização patogênica e molecular da interação entre  
2013      cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) e bactérias  
pectinolíticas / Lilian Cação Costa. – Viçosa, MG, 2013.  
ix, 44 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luis Claudio Vieira da Cunha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 35-44.

1. Batata - Doenças e pragas. 2. Pectobacterium.
  3. Dickeya. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.
- II. Título.

CDD 22.ed. 632.32

**LILIAN CAÇÃO COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E MOLECULAR DA INTERAÇÃO  
ENTRE CULTIVARES DE BATATA (*Solanum tuberosum* L.) E BACTÉRIAS  
PECTINOLÍTICAS**

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

APROVADA: 30 de julho de 2013.

---

José Rogério de Oliveira

---

Gloria Patricia Castillo Urquiza

---

Luis Cláudio Vieira da Cunha

(Orientador)

À Deus, sobretudo,  
Aos meus pais, Haroldo e Maria Helena,  
À minha irmã, Mariana,  
Ao meu noivo, Leandro,

Dedico!

**"O conhecimento pronto estanca o saber e  
a dúvida provoca a inteligência."**  
Vigotsky

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo conforto espiritual nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, Haroldo e Maria Helena, por me mostrarem que a caminhada é tortuosa e necessária, mas que neles encontro tudo o que preciso.

À minha irmã, Mariana, a quem procuro ser um grande exemplo, pelo imenso amor e por me auxiliar na execução do experimento.

Ao meu noivo, Leandro, pelo apoio necessário em todos os momentos e pelo sorriso que torna tudo mais fácil.

Aos meus familiares, pela constante torcida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade.

Ao Prof. Luis Cláudio Vieira da Cunha pela orientação, profissionalismo, amizade e oportunidade de realizar este trabalho que tanto me engrandeceu.

Ao Prof. José Rogério de Oliveira, pelos conselhos e atenção.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, pela contribuição em minha formação profissional.

Aos funcionários, em especial ao Camilo e a Sueli, pelo carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia, pela boa convivência, auxílio e sugestões, em especial à Yane, que contribuiu imensamente na realização deste trabalho, pelo compromisso e amizade que construímos.

Aos amigos Tiago, Cecília, Lívio, Juliana e Eduardo, pela grande ajuda na realização do experimento.

Aos queridos amigos Davi, Alessandra e Bruno, pelo incentivo e exemplo.

Aos Laboratórios dos professores Eduardo Mizubuti, Claudine Carvalho, Luciano Fieto e Cláudio Mafra, pelo suporte e colaboração de todos.

Ao Braz, pelos ensinamentos e conselhos.

Ao Wanderson, pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Rafael, pela enorme contribuição com o RT-qPCR.

Aos amigos que fizeram com que tudo ficasse mais fácil, que preencheram a saudade de casa e o cansaço dos estudos “intermináveis”, André, Ana Lúcia, Tiago, Raul, Filipe Borel, Denise e Deiziane.

**MUITO OBRIGADA!**

## **BIOGRAFIA**

LILIAN CAÇÃO COSTA, filha de Haroldo Costa e Maria Helena Cação Costa, nasceu em 28 de dezembro de 1985, em Ubá, Minas Gerais.

Em maio de 2006 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, graduando-se em julho de 2011.

Durante a graduação, foi bolsista na Clínica de Doença de Plantas/ Departamento de Fitopatologia sob orientação do Prof. Robert Weingart Barreto.

Em agosto de 2011, iniciou o Curso de Mestrado em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a orientação do Prof. Luis Cláudio Vieira da Cunha.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
2.1. Isolados bacterianos e cultivares de batata.....	8
2.2. Transformação, estabilidade e seleção dos isolados transformados.....	10
2.3. Teste de patogenicidade.....	12
2.3.1. Maceramento de tubérculos.....	12
2.3.2. Maceramento de haste.....	13
2.4. Perfil da expressão gênica.....	13
2.4.1. Extração de RNA e síntese de c-DNA.....	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.1. Caracterização dos isolados.....	16
3.2. Teste de patogenicidade em tubérculo.....	18
3.3. Teste de patogenicidade em haste.....	23
3.4. Perfil da expressão dos genes de defesa.....	28
4. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

## RESUMO

COSTA, Lilian Cação, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Caracterização patogênica e molecular da interação entre cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) e bactérias pectinolíticas.** Orientador: Luis Cláudio Vieira da Cunha.

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é o quarto alimento mais consumido no mundo. No Brasil, a produtividade fica abaixo do potencial da cultura principalmente devido ao uso de batata-semente de baixa qualidade fitossanitária. Estas sementes servem como meio de disseminação de diversos patógenos, incluindo o complexo de espécies de *Pectobacterium* e *Dickeya*, agentes causadores da podridão-mole e canela-preta da batata. Apesar destas espécies apresentarem uma séria ameaça a produção da cultura, pouco se sabe sobre as respostas das cultivares brasileiras, seja a nível de tubérculo ou haste, com relação a infecção por estas espécies tanto a nível patogênico quanto molecular. Portanto, este trabalho teve por objetivo caracterizar a nível patogênico e molecular a resposta de diferentes cultivares de batata na interação com quatro espécies pertencentes a este complexo. Para estudo, os isolados bacterianos foram previamente transformados por eletroporação, com o plasmídeo pPROBE-AT-GFP, conferindo resistência a ampicilina. Testes de estabilidade do plasmídeo foram realizados posteriormente à transformação a fim de avaliar a sua permanência nas células bacterianas. A virulência e expressão de sintomas das espécies *Pectobacterium carotovorum*, *P. atrosepticum*, *Dickeya chrysanthemi* e *P. brasiliensis* foram avaliadas através da inoculação em mini-tubérculos e em hastes de plantas jovens de batata das cultivares Ágata, Asterix, Atlantic, Cupido e Emerald. O estudo do perfil da expressão relativa de 24 genes marcadores de defesa foi feito por meio de PCR em Tempo Real. Houve interação significativa das diferentes cultivares em relação às espécies estudadas tanto para maceramento de tubérculo quanto comprimento de lesão em hastes. As cultivares avaliadas apresentaram resistência parcial diferenciada às espécies, variando de acordo com o órgão da planta infectado. Enquanto a cultivar Ágata foi menos resistente à podridão do tubérculo quando comparada as demais, as hastes apresentaram os menores comprimentos de lesões. *Pectobacterium brasiliensis* foi a espécie com maior virulência em relação às demais espécies tanto na haste quanto no tubérculo. Em contrapartida, *Dickeya chrysanthemi* apresentou-se como a espécie menos virulenta em

todas as cultivares testadas. De um modo geral, os resultados dos testes de patogenicidade mostram haver uma complexa rede de interações considerando que diferentes cultivares apresentam respostas diferenciadas dependendo da espécie em questão. Ainda, os resultados mostraram que a resistência parcial de uma determinada cultivar pode ser dependente do órgão vegetal infectado. Considerando as análises moleculares, dos vinte e quatro genes marcadores de defesa estudados, apenas cinco, JAZ-1, ERF3, PR-3, PR-5 e MAPK, permitiram uma melhor elucidação da hipótese deste trabalho. Estes resultados apontam que a resposta de defesa de batata a bactérias pectinolíticas depende em grande parte da ação coordenada da sinalização hormonal baseada nas rotas do ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) e a consequente expressão de proteínas relacionadas à patogênese. Portanto, tratar o complexo de espécies bacterianas de forma individualizada é imprescindível para o estabelecimento de medidas de controle eficazes, pois cada patossistema pode apresentar características específicas dependendo da cultivar e órgão afetado. Além disso, o entendimento das bases moleculares que regulam as respostas de defesa de batata, contra estas bactérias no campo, auxiliará os trabalhos de melhoramento na seleção de cultivares mais resistentes.

## ABSTRACT

COSTA, Lilian Cação, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Pathogenic and molecular characterization of the interaction between potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) and soft-rot causing bacteria.** Adviser: Luis Cláudio Vieira da Cunha.

Cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* L.) is forth most important food crop in the world. In Brazil, mainly due to the use of low quality potato seeds the yield of potato crops is considered low as far as its genetic potential is concerned. These low quality seeds can transmit several plant pathogens, including members of the soft-rot and black-leg causing species complex of the genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. Even though these bacterial species represent a serious threat to potato production, little is known about the response of Brazilian potato cultivars, upon infection of both tuber and stems, by these species, at the pathogenic and molecular level. Therefore, this work aimed at characterizing at the pathogenic and molecular level the response of different potato cultivars in the interaction with four soft-rot causing species. In order to do this, all bacterial isolates were first transformed by electroporation, using the ampicilin resistant plasmid pPROBE-AT-GFP. Following transformation, analyses of plasmid stability in the bacterial cells was carried out to ensure consistency in the growth curve analysis. Bacterial virulence and symptom expression induced by *Pectobacterium carotovorum*, *P. atrosepticum*, *P. brasiliensis* and *Dickeya chrysanthemi* were evaluated by inoculating mini-tubers and stems of young plants of the potato cultivars Asterix, Atlantic, Cupido e Emeraude. At the molecular level, the relative expression profile of 24 defense-related genes was analyzed by Real Time PCR. There was a significant interaction of the different potato cultivars in relation to the studied species not only for tuber decaying but also lesion length in potato stems. The evaluated cultivars showed distinct susceptibility depending on the bacterial species as well as the infected plant organs. While Ágata was the most susceptible to tuber decaying when compared with the remaining cultivars, its stems showed the smallest lesion lengths. *P. brasiliensis* was the most virulent in all cultivars when compared with all other bacterial species in both tubers and stems. In opposite, *D. chrysanthemi* was the least virulent bacterial species in all tested cultivars. In general, the pathogenicity data pointed out a complex set of interactions since different cultivars showed distinct responses depending on the bacterial species. In addition, the results demonstrated that the susceptibility of any

cultivar may vary depending on the plant organ infected. Regarding the molecular studies, 5 out of 25 defense-related genes JAZ-1, ERF3, PR-3, PR-5 and MAPK were overexpressed in the interaction, allowing a better understanding about the molecular mechanisms regulation the interaction between potato-pectinolytic bacterias. These results suggest that the potato defense responses against these bacterial pathogens depend for the most part in the coordinated hormone signaling responses regulated by jasmonic acido (JA) and ethylene (ET) and, consequently, in the expression of pathogenesis-related proteins. Therefore, it seems reasonable to consider each species belonging to this bacterial complex individually for the development of effective control strategies, since each pathosystem may show different characteristics depending on the cultivar and plant organ affected. Hence, a better understanding about the molecular basis that regulates potato defense responses in the field, against these bacteria, may assist the potato breeding programs in the development of more tolerant cultivars.

## 1. Introdução

A batata (*Solanum tuberosum* L.), pertence à família Solanaceae. Originou-se na América do Sul, mais precisamente no Peru e Bolívia. Cultivada em aproximadamente 120 países e com uma produção anual de mais de 300 milhões de toneladas, é o quarto alimento mais consumido no mundo, excedida apenas pelo arroz, trigo e milho (Pereira & Daniels, 2003).

Considerada uma cultura sensível ao clima, exigindo-se de dias quentes e noites frias. Portanto, foi introduzida na Região Sul do Brasil pelos colonizadores europeus no final do século XIX, pois as condições climáticas eram mais favoráveis à produção (Pereira & Daniels, 2003).

No Brasil, grande produtor de batata, esta hortaliça representa a mais importante cultura olerícola, com uma produção de aproximadamente 3,5 milhões de toneladas por ano em quase 140 mil hectares plantados (IBGE 2010). Embora o consumo de 14 Kg/habitante/ano seja baixo quando comparado a outros países da Europa, em que o consumo chega a 100 Kg/habitante ao ano, existe uma grande expectativa de crescimento do mercado e investimento do capital internacional no setor. A produção brasileira está concentrada em quatro estados da federação: Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul. Minas Gerais ocupa uma posição destacada no cenário nacional como o maior produtor de batata do Brasil. Em 2010 a colheita estimada foi na ordem de 1,1 milhão de toneladas, o equivalente a 32% da safra nacional do tubérculo, em uma área de aproximadamente 39 mil hectares (IBGE, 2010).

As doenças de ordem biótica são consideradas um dos principais fatores que contribuem para o baixo rendimento da cultura, favorecidas em grande parte, pelo uso de batata semente de baixa qualidade fitossanitária. Dentre estas doenças, a podridão-mole e canela-preta, causada pelo complexo de espécies de bactérias pectinolíticas pertencentes aos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*, têm um papel relevante causando perdas elevadas pré e pós-colheita (Carvalho, 2009). Tais bactérias têm como principal característica, a produção de enzimas pectinolíticas em grande escala, que levam a rápida deterioração dos tecidos do tubérculo (podridão-mole) ou da haste da planta (canela-preta/talo-oco), dificultado muito a determinação da espécie bacteriana em questão com base apenas na sintomatologia (Tumelero, 2003). Estes sintomas variam de acordo com ambiente em que o patossistema se encontra, com a

resistência/suscetibilidade da cultivar plantada e com a parte da planta afetada pela doença (Bain et al., 1990).

Até pouco tempo, a podridão-mole e a canela-preta eram atribuídas ao ataque de bactérias chamadas “erwinias apodrecedoras” (Takatsu, 1983). Isso porque, embora pudessem ser também associadas a outros gêneros de bactérias, como *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Clostridium*, na grande maioria das vezes essas doenças eram causadas pelas até então conhecidas espécies e subespécies de *Erwinia*: *E. carotovora* subsp. *carotovora* (ECC), *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (ECA) e *E. chrysanthemi* (ECHR). Entretanto, as espécies do gênero *Erwinia*, capazes de produzir enzimas pectolíticas, responsáveis pelo apodrecimento ou “podridão mole” dos tecidos, foram reclassificadas como espécies de *Pectobacterium* e *Dickeya* (Tabela 1). Esta distinção taxonômica tem como finalidade básica tratar de forma diferente os diferentes patossistemas, analisando suas diversas formas de controle.

**Tabela 1.** Mudança de nome das principais espécies causadoras de canela-preta, podridão-mole e podridão de rama em batata. (Adaptada de Saddler, 2009).

Hospedeiras (Sintomas)	Nome antigo	Novo nome	Referência
Batata e outras hortaliças (canela preta e podridão mole)	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	(van Hall) Gardan et al., 2003
Batata e muitas outras hospedeiras (canela preta e podridão mole)	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	(Jones) (Bergey et al.) Hauben et al., 1998
Batata, cravo, tomate, milho, repolho, crisântemo muitas outras (canela preta, podridão mole, podridão vascular).	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<b><i>Dickeya</i> spp.</b> <i>D. chrysanthemi</i> * <i>D. dadantii</i> * <i>D. dianthicola</i> * <i>D. dieffenbachiae</i> <i>D. paradisiaca</i> <i>D. zeae</i> * <i>D. solani</i> *	(Burkholder et al.) Samson et al., 2005
<b>Situação no Brasil (após Carvalho, 2009)</b>			
Batata	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Dickeya</i> sp.	
Batata	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	<i>P. atrosepticum</i>	
Batata	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	<i>P. carotovora</i>	
Batata	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>betavasculorum</i>	<i>P. betavasculorum</i>	

\* Espécies de *Dickeya* que causam doenças em batata.

Nos últimos cinco anos, as perdas de batata ocasionadas por espécies de *Dickeya* aumentaram significativamente em muitos países Europeus e em Israel. Em Israel, reduções de 20 a 25% foram reportadas em várias variedades (Tsrer et al., 2009). Levantamentos na Holanda e França detectaram níveis de incidência de 15% e 20% das plantas com canela-preta, respectivamente. No Brasil, perdas no armazenamento podem chegar a 100%; já no campo estas perdas giram em torno de 10-40% em função da redução do estande e podridão das progênies dos tubérculos (Pereira, 2003). Para contornar estas perdas, os métodos mais recomendados para o manejo da doença são de caráter preventivo e de utilização conjunta, tais como, a rotação de cultura, o plantio de tubérculos-sementes livres do patógeno, a redução de injúrias no tubérculo, principalmente durante a colheita e condições adequadas de armazenamento. Porém, estas técnicas, mesmo que utilizadas de forma reunidas, não têm se mostrado suficientes, uma vez que a bactéria é capaz de penetrar pelas aberturas naturais dos tubérculos.

A utilização de cultivares resistentes, ou tolerantes, a diferentes patógenos tem sido a prática de manejo mais eficaz na cultura da batata, uma vez que os custos associados a sua utilização são mais baixos e inexistem defensivos químicos eficientes, visando garantir a sustentabilidade do sistema de produção (Toth et al., 2011). Um grande número de cultivares de batata encontra-se disponível no mercado brasileiro, entretanto, pouco se sabe sobre a resposta destas cultivares a infecção por estas diferentes espécies.

A resistência parcial à podridão causada por pectobactérias varia com a concentração de inóculo, temperatura, cultivar a ser plantada e idade fisiológica da planta. Além disso, a aplicação de cálcio em solos cujos níveis deste elemento encontram-se reduzidos, e a conseqüente elevação deste no tubérculo, faz aumentar a resistência à podridão pela formação do complexo cálcio-pectina, tornando-os mais resistentes à ação das enzimas pectolíticas (Benelli et al., 2003).

Embora ocorra diferenças quanto à resistência entre as cultivares de batata às pectobactérias, existem poucas, comumente cultivadas na América do Norte e na Europa, que são consideradas altamente resistentes (Pérombelon et al., 1988; Toth et al., 2011), e no Brasil, não há registro de variedades resistentes. Soma-se a isso, a falta de conhecimento no que se diz respeito à resposta das variedades brasileiras à infecção por esse complexo de espécies (Benelli et al., 2003).

### ***Respostas de Defesa da Batata***

As plantas estão sujeitas a infecção por um grande número de patógenos e, como resultado, apresentam um mecanismo complexo de reconhecimento e ativação de defesas para se protegerem. A resistência de plantas a patógenos pode ser definida como a capacidade que estas possuem em reduzir ou mesmo evitar a colonização por um determinado agente patogênico. Basicamente, estes mecanismos se baseiam na presença de barreiras físicas e químicas pré e pós-formadas (induzidas) para conter o avanço do patógeno (AGRIOS, 2005). Ao contrário das barreiras pré-formadas naturais, também conhecidas como constitutivas (ou basais), estas possuem mecanismos inativos (latentes) que são ativados somente após o contato entre os dois organismos. Este último é conhecido como resistência induzida (Colson & Deveral, 1996).

A interação entre a planta e o microrganismo é dependente do reconhecimento molecular específico entre os dois organismos (Dangl & Jones, 2001). Os patógenos desenvolveram mecanismos para detectar a presença do hospedeiro através da percepção de fatores derivados do hospedeiro. Este reconhecimento desencadeia uma mudança no metabolismo do patógeno no sentido de se tornar patogênico. No caso de patógenos bacterianos, a patogênese envolve a síntese e injeção, dentro da célula do hospedeiro, de fatores de virulência os quais alteram o metabolismo do hospedeiro no sentido de fornecer condições mais apropriadas ao crescimento do patógeno. Como as plantas não são passivas, estas desenvolveram mecanismos sofisticados para reconhecer a presença de moléculas associadas ao patógeno (PAMPs) e fatores de virulência levando ao reforço de defesas pré-existentes (gerais ou basais) e ativação de outros mecanismos de defesa induzidos. Embora os PAMPs ativem mecanismos de defesa basais no hospedeiro, não específicos, as proteínas efetoras podem ativar resistência raça-específica mediada por genes-R (Dangl & Jones, 2001).

No caso da resistência mediada por genes R, esta está associada à morte programada das células em contato com o patógeno, conhecida como reação de hipersensibilidade ou HR, o qual possui semelhanças com a morte programada de células características em animais (Takken & Joosten, 2000). Cultivares com alto nível de suscetibilidade podem apresentar respostas de defesa semelhantes às mediadas por genes-R através da indução de resistência (Gilchrist, 1998). A diferença entre

suscetibilidade e resistência está associada à velocidade e intensidade de ativação destes componentes mais do que a expressão de mecanismos diferenciados, ou seja, a diferença entre interações incompatíveis (não ocorrência de doença) e interações compatíveis (ocorrência de doença) é quantitativa (Yi et al., 2003).

Além da formação de barreiras estruturais e da produção de compostos fenólicos tóxicos, que resultam no atraso da infecção, a resposta local aos patógenos envolve a explosão oxidativa (geração de espécies ativas de oxigênio-EAOs;  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  e  $OH^-$ ), morte celular programada das células do hospedeiro, frequentemente referida como reação de hipersensibilidade (HR), expressão elevada de genes codificadores das proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas). As PR-proteínas são acumuladas no local específico após a indução, atuando direta ou indiretamente contra o fitopatógeno.

A nível bioquímico, um arranjo de eventos é observado em células vegetais poucos minutos após a interação planta-patógeno, resultando na síntese de novos compostos e no aumento da atividade de enzimas importantes para a defesa da planta tais como, peroxidases (POX), glutathione-S-transferase (GST),  $\beta$ 1-3 glucanases, quitinases, polifenoloxidasas (PPO), proteínas da parede celular, inibidores de proteinases (PPI), várias enzimas hidrolíticas e produtos específicos de genes de resistência de efeito maior (R-genes). A ativação destes genes é importante para o mecanismo de defesa no local onde a infecção ocorre (Moraes, 1998). Vários fatores de estresse como a infecção por bactérias, vírus, fungos patogênicos e a alimentação de insetos causam a indução na atividade de  $\beta$  -1,3 glucanases e de quitinase, sugerindo que essas enzimas apresentem função defensiva nas plantas, inclusive para o ataque de fitobactérias (Lee & Hwang, 1996; Young et al., 1995; Hong & Hwang, 2006).

Polifenoloxidasas e peroxidases são enzimas que frequentemente aumentam sua atividade em respostas ao estresse, e um de seus principais papéis parece ser o de promover a proteção das células via a oxidação de compostos fenólicos (Siegel, 1993). As peroxidases pertencem a família PR-9 as quais podem catalisar ligações cruzadas entre grupos fenólicos (e.g. tirosina, fenilalanina e ácido ferúlico) em proteínas da parede celular, pectinas e outros polímeros. Tal acoplamento é importante para a formação de ligações cruzadas de lignina na parede (Cosgrove, 2004). As peroxidases são também capazes de catalisar a oxidação de componentes celulares, tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou peróxidos orgânicos, constituindo-se em uma proteção oxidativa para as células (Kvaratskhelia et al., 1997). Young et al. (1995)

citam que em arroz (*Oryza sativa* L.) a acumulação de peroxidase no fluido apoplástico dos vasos do xilema é correlacionada com a resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Polifenoloxidasas são enzimas que frequentemente aumentam suas atividades em resposta ao estresse, como injúria, toxicidade de nitrogênio e ataque de patógenos, com finalidade de proteger a célula (Siegel, 1993). Em geral, a polifenoloxidase é elevada em tecidos infectados e apresenta grande importância para as plantas, pois está envolvida nos mecanismos de defesa e na senescência (Agrios, 2005).

As  $\beta$ -1,3-glucanases são capazes de desencadear os mecanismos de defesa da planta e agir diretamente sobre o patógeno. A enzima  $\beta$ -1,3-glucanase atua diretamente nas células fúngicas, liberando fragmentos de oligossacarídeos da parede celular e, podendo elicitar respostas secundárias de defesa das plantas (Van Loon, 1997). A sua expressão é induzida por elicitores como etileno, ácido salicílico, ácido jasmônico e também ataque de patógenos. A atividade coordenada da  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase foram induzidas em folhas de pimentão infectadas com *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e ainda mais elevada com um isolado avirulento (Lee & Hwang, 1996).

As quitinases ocorrem normalmente nas plantas e são induzidas como resultado de infecções por patógenos bem como por agentes abióticos (Lee & Hwang, 1996). As quitinases hidrolisam a quitina. A quitina é definida como um polímero de N-acetil-D-glucosamina com ligações  $\beta$ -1,4, encontrada embebida numa matriz de fibras de glucana com proteínas e carboidratos. Vários trabalhos indicam que as formas extracelulares das quitinases possuem uma função imediata na defesa das plantas, com ação direta sobre as hifas fúngicas. Esta ação provoca a liberação de elicitores oligossacarídicos a partir das paredes fúngicas que podem ativar novas respostas de defesa por parte da planta (Hammond-Kozack & Jones, 2000).

O primeiro passo do processo de infecção por um patógeno é a invasão das bactérias nos tecidos deste hospedeiro, seguido do aumento populacional das mesmas (Ngadze et al., 2012). A partir do reconhecimento do patógeno, as plantas reagem à invasão bacteriana, ativando respostas de defesa associadas à produção de enzimas em uma tentativa de conter o patógeno. Porém, ao atingirem certa densidade populacional (conhecida como quorum sensing), *Pectobacterium* e *Dickeya* ativam a produção de fatores de virulência que se correlacionam com a degradação da parede celular das plantas de batata, pela ação de isoformas da enzima pectato-liase, que por sua vez, induzem respostas de defesa no hospedeiro. A virulência destas bactérias está

diretamente relacionada à resistência diferenciada de cada cultivar e na agressividade apresentada por estes patógenos.

A resistência a doenças nesta interação é marcada por mudanças no metabolismo celular do hospedeiro, principalmente na atividade enzimática da fenilalanina amônia liase (PAL), responsável pela síntese de vários compostos secundários relacionados à defesa, tais como lignina e fenóis; peroxidase; polifenol oxidase, o qual é aumentado mediante ferimento ou infecção da planta; lipoxigenase; superóxido desmutase e  $\beta$ -1,3-glucanase (Ngadze, 2012).

Sendo assim, sabe-se que a cadeia produtiva da batata carece de informações com relação à infecção pelas diferentes espécies de *Pectobacterium* e *Dickeya*, tanto no âmbito de patogenicidade (sintomatologia/tolerância) quanto na expressão de resposta de defesa. Portanto, um das hipóteses deste trabalho foi a de que cultivares brasileiras apresentariam respostas diferenciadas a infecção por uma determinada espécie bacteriana. A outra hipótese se relacionou ao fato de que diferentes espécies bacterianas apresentariam virulência diferenciada de acordo com a cultivar utilizada. Desse modo, é razoável assumir uma possível interação cultivar-espécie, o que tem uma importância significativa do ponto de vista do manejo, onde diferentes áreas agrícolas podem estar infestadas com diferentes espécies (El Tassa & Duarte, 2004). Logo, um estudo detalhado da interação bactérias pectinolíticas - batata se faz imprescindível.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a nível patogênico e molecular a resposta de diferentes cultivares de batata à infecção pelas diferentes espécies do complexo. Em outras palavras, buscou-se compreender as respostas de defesa de algumas cultivares brasileiras em relação à infecção por estas diferentes espécies, através da análise da capacidade de maceramento de tubérculos e hastes de batata, curva de crescimento populacional, assim como também através da análise do perfil de expressão de genes marcadores de defesa por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Para realização desse estudo, quatro espécies de bactérias pectinolíticas (*P. carotovorum*, *P. brasiliensis*, *P. atrosepticum* e *Dickeya sp.*), e cinco cultivares de batata (Ágata, Asterix, Atlantic, Emeraude e Cupido) foram selecionadas.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Isolados bacterianos e variedades de batata

Os isolados das espécies estudadas, *Pectobacterium carotovorum* (Pc863), *P. atrosepticum* (Pa424) e *Dickeya chrysanthemi* (Dc231) foram obtidos da Coleção de culturas do Instituto Biológico de São Paulo (IB, <http://www.biologico.sp.gov.br/bacterias.php>); e *P. brasiliensis* (Pbr1697), gentilmente cedido pelo Dr. Valmir Duarte, do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Após o recebimento estes foram repicados em meio sólido 523 (Kado & Heskett, 1970), contendo 10 g de sacarose, 4 g de extrato de levedura, 8 g de caseína ácida hidrolisada, 2 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,3 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 17 g de ágar por litro de solução, e incubados a 28° C por 24 horas. Após a repicagem, as bactérias foram avaliadas quanto à virulência, utilizando-se iscas biológicas de frutos de pimentão verde (*Capsicum annuum* L.) (Romeiro, 2001). Para isto, os frutos foram previamente desinfestados em etanol 50% por 1 minuto, seguido da imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) 3% por 3 minutos e tríplice lavagem em água destilada. Pedacões de pimentão de aproximadamente 4,0 x 2,5 cm foram inoculados com o auxílio de um palito de dente, com uma massa de células correspondente a cada isolado, sem perfurar por completo o fruto. Os materiais inoculados foram depositados em gerbox (2 pedaços/isolado), sobre papel toalha úmido e incubados a 28°C por no máximo 24 horas, a fim de manter as condições ideais para o crescimento das bactérias. A partir do tecido macerado, novas colônias foram reisoladas pelo método de estrias compostas em placas de Petri, contendo meio 523 sólido e incubadas a 28°C por 24 horas como previamente descrito (El Tassa e Duarte, 2004). As etapas acima foram repetidas 3 vezes para a reativação da virulência dos isolados. Após o isolamento final e a reativação, as culturas foram preservadas pelo método de Castellani (Castellani, 1963) em água destilada autoclavada a temperatura ambiente e a -80°C em glicerol 30%.

Para a confirmação da identidade dos isolados a nível de gênero e espécie, o DNA foi extraído a partir de cultura pura com 24-48 horas de crescimento utilizando-se o kit de extração Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A amplificação do DNA ribossomal (rDNA) 16S e 23S e de sua região intergênica espaçadora (16S-23S) se deu através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se um termociclador PTC-100<sup>™</sup> Peltier Thermal Cycler

(MJ Research), com as seguintes condições de reação: 12,5 µl de Dream Taq PCR Master Mix (2X; Thermo Scientific), 60 ng DNA e 0,2 µM (concentração final) de cada oligonucleotídeo iniciador, em um volume final de reação de 25 µl. As condições para a amplificação foram: desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação, sendo 45 segundos para anelamento. As temperaturas de anelamento (T<sub>m</sub>) e tempo de extensão (30 segundos para cada 500 pb) variaram de acordo as características de cada par de oligonucleotídeos (Tabela 2). As amplificações finalizaram com extensão final a 72°C por 10 minutos. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão listados na Tabela 2. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % com tampão TAE 1X (4,84 g de Tris-base; 1,14 ml de ácido acético glacial; 100 ml de EDTA 0,5M por litro de solução), corados com brometo de etídio (0,5 µg/L) e visualizados em um transluminador UV.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para identificação dos isolados bacterianos.

Nome	Seqüência do Primer (5' - 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Pb	Especificidade	Referência
1491F L1R	GAAGTCGTAACAAGGTA CARGGCATCCACCGT	55	510 e 550	Diferencia <i>Pectobacterium</i> <i>sp.de Dickeya sp.</i>	Fessehaie et al., 2002.
BR1F	GCGTGCCGGGTTTATGACCT	55	322	Juntamente com L1R, diferencia <i>P. brasiliensis</i> e algumas estirpes de <i>P.</i> <i>carotovorum</i> das demais pectobactérias	Duarte et al, 2004.
Ech1/1'F Ech1/1'R	TGGCGCGTCAGGAAGTTTAT TCACCGGTCAGGGTGAAGTT	55	600	Específico para <i>Dickeya</i>	Diallo, et al.,2009.
ECA1F ECA1R	CGGCATCATAAAAACACG GCACACTTCATCCAGCGA	64	690	Específico para <i>P.</i> <i>atosepticum</i>	De Boer & Ward, 1995; Frechón et al., 1998.
ADE1 F ADE2 R	GATCAGAAAGCCCGCAGCCAG AT CTGTGGCCGATCAGGATGGTT TTGTCGTGC	64	420	Amplifica de forma específica os genes pel de <i>Dickeya spp.</i>	Nassar et al., 1996).
HrpN F HrpN R	GAGTTGAACAACATCAGTACG C ATCGCTGCATCAATACCCAGC	64	344	Específico para <i>P. brasiliensis</i>	Dellagi et al., 2000.

Os experimentos foram conduzidos com cinco cultivares de batata, comuns nas áreas produtoras do Brasil (Ágata, Asterix, Atlantic, Emeraude e Cupido), as quais apresentam características físico-químicas diferenciadas tanto para o consumo in natura quanto para o processamento e industrialização, como por exemplo, ciclo vegetativo e teor de matéria seca (Tabela 3). Nenhuma destas cultivares selecionadas apresentam resistência a podridão mole.

**Tabela 3.** Origem, ciclo da planta e principais características dos tubérculos das variedades de batata a estudadas.

Cultivar	País de Origem	Ciclo da Planta	Matéria Seca	Aptidão culinária
Ágata	Holanda	Precoce	Baixo	Cozimento
Asterix	Holanda	Médio	Médio	Multiuso
Atlantic	EUA	Médio	Alto	Fritura
Cupido	Holanda	Precoce	Médio	Cozimento
Emeraude	França	Precoce	Baixo	Multiuso

Tubérculos						
				Cor		
Cultivar	Produção	Formato	Tipo	Pele	Polpa	Olho
Ágata	Graúdos	Ovalado	Lisa	Amarela	Amarela pálida	Raso
Asterix	Alta	Oval alongado	Meio ásp.	Vermelha	Amarela clara	Raso
Atlantic	Alta	Redondo	Áspera	Amarela	Branca	Meio prof.
Cupido	Alta	Alongado	Lisa	Amarela	Amarela clara	Raso
Emeraude	Alta	Oval along.	Lisa	Amarela	Amarela clara	Raso

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e em casas-de-vegetação, situados no Departamento de Fitopatologia (DFP) na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para os testes de patogenicidade e perfil da expressão gênica (RT-qPCR; discutido abaixo) em hastes, batata semente pré-básica (mini-tubérculos; Multiplanta) livres de qualquer patógeno, foram semeados em vasos de 2 L contendo substrato comercial (ProPlant), adubados na base de 1,5 g do adubo 4-14-8 /Kg de substrato no momento do semeio e mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade em casa de vegetação.

## 2.2. Transformação, estabilidade e seleção dos isolados transformados.

Para a quantificação da população bacteriana nos tecidos vegetais inoculados, os isolados das quatro espécies estudadas foram previamente transformados com o plasmídeo pPROB-AT-GFP (Czajkowski et al., 2010), que marca as bactérias eletrotransformadas de forma fluorescente, mas cujo interesse neste trabalho está na sua capacidade de conferir resistência ao antibiótico ampicilina (Amp<sup>+</sup>). Uma minipreparação plasmidial antecedeu a transformação para obter-se uma maior concentração do plasmídeo. Para isto, as células foram crescidas em 4 ml de meio Luria-Bertani (LB) líquido (10 g de tripton; 5 g de extrato de levedura; 10 g de NaCl; 17 g de ágar) contendo antibiótico, 100 µg/ml (concentração final), por agitação, por 24 horas. Foi realizada uma centrifugação deste meio por 3 minutos a 14500 g e descartado

o sobrenadante. Procedeu-se a lavagem do pellet com uma Solução de Lise I (glucose 50 mM, Tris-Cl 25 mM pH 8 e EDTA 10 mM pH 8). Foi feita uma nova centrifugação e o sobrenadante foi descartado. Seguiu-se novamente adicionando a Solução de Lise I, além das Soluções de Lise II (0,2 N NaOH e 1% (W/V) SDS) e Lise III (60 ml de acetato de potássio 5M; 11,5 ml de ácido acético glacial, e água, 28,5 ml). Realizou-se uma centrifugação por 5 minutos a 14500 x g e 500 µl do sobrenadante transferido para um novo tubo Eppendorf. O plasmídeo foi decantado por centrifugação adicionando-se 500 µl de isopropanol gelado (4°C) ao sobrenadante. Após 3 lavagens sucessivas do pellet com etanol 70%, este foi secado ao ar por 15 min, ressuspensionado em água ou TE e posteriormente tratado com RNase.

Visando a transformação destas células bacterianas, foi feita uma preparação para torná-las eletrocompetentes. Os isolados foram crescidos em 50 ml de meio LB até atingirem OD<sub>600</sub> 0,6. Em seguida, as células bacterianas foram resfriadas em gelo por 15-30 minutos e centrifugadas a 4°C por 10 minutos, a 1950 x g. Substituiu-se o sobrenadante por 30 ml de água Mili-Q gelada (4°C), dissolveu-se gentilmente o pellet e realizou-se novamente uma centrifugação nas mesmas condições anteriores. Este processo foi repetido, posteriormente o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 2 ml de glicerol a 10% (concentração final). Uma nova centrifugação foi realizada e em seguida, o pellet foi novamente ressuspensionado, porém, em 550 µl de glicerol 10%. Este volume foi redistribuído em tubos Eppendorfs e armazenado imediatamente a -80°C até seu processamento.

Células eletrocompetentes de cada isolado bacteriano foram transformadas por eletroporação com o plasmídeo pPROB-AT-GFP, como descrito anteriormente (Czajkowski et al., 2010; Calvin & Hanawalt, 1988), utilizando o aparelho Bio-Rad nas condições de 2,5 KV, 25 mF e 200V em cubetas de 0,2 cm. Os isolados transformados foram mantidos em meio LB líquido, sem antibiótico, por 4 horas, sob agitação constante e em seguida, foram transferidos para placas de Petri com meio LB sólido contendo 100 µg/ml de ampicilina e incubados a 28°C. Colônias individuais de cada isolado foram selecionadas e utilizadas para a inoculação das hastes de batata para confirmação da patogenicidade e preservadas a -80°C em glicerol 30%. Anteriormente a instalação dos experimentos, testes de estabilidade do plasmídeo nas células bacterianas foram realizados por um período correspondente aos intervalos de coleta e avaliação dos experimentos. Brevemente, tecidos de pimentão macerados foram homogeneizados em

tubos de microcentrífuga contendo solução tampão  $MgCl_2$  a 10 mM, com auxílio de um pistilo de plástico, seguido de diluições seriadas e depósito destas em placas de Petri pelo método de microgotas (10  $\mu$ l), tanto na presença quanto na ausência de ampicilina para estimativa da perda do plasmídeo.

## **2.3. Testes de patogenicidade**

### **2.3.1. Maceramento de tubérculos**

A virulência das quatro espécies bacterianas foi avaliada através da inoculação dos mini-tubérculos semente, das cultivares estudadas: Ágata, Asterix, Atlantic, Emeraude e Cupido.

Primeiramente, procedeu-se a desinfestação dos mesmos em etanol 50% durante 1 minuto, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2% por 3 minutos e, por último à 3 lavagens sucessivas em água destilada/esterilizada. Para inoculação, uma suspensão bacteriana calibrada a  $10^7$  unidades formadoras de colônia/ml (UFC/ml;  $OD_{600} = 0,1$ ) em tampão  $MgCl_2$  10 mM, foi preparada a partir de células crescidas em meio sólido 523 (Kado e Heskett, 1970) por 24 horas a 28°C. Desta suspensão, 10  $\mu$ l foram adicionados a um orifício de aproximadamente 0,3 x 0,3 cm, no centro de mini-tubérculos partido ao meio. Os mini-tubérculos foram acondicionados em gerbox, sobre papel de filtro umedecido com água destilada, caracterizando uma unidade experimental. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 5x4 (cinco cultivares e quatro espécies bacterianas), com 3 repetições, cada uma contendo 4 pedaços (metades) de mini-tubérculos. Como controle negativo, o mesmo tratamento foi dado aos mini-tubérculos, porém, adicionando-se apenas tampão de inoculação. O ensaio foi mantido em B.O.D. a temperatura constante de 28°C, e o índice de maceramento (podridão) avaliado as 24, 48, 60 e 92 horas após a inoculação (hai). Para tal, os tubérculos foram pesados antes da inoculação e o maceramento foi estimado pela perda de massa após a remoção do tecido macerado utilizando hastes flexíveis de pontas revestidas de algodão para limpeza da área afetada. Os resultados obtidos foram integralizados como área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD); a análise de variância foi feita no programa estatístico SAS (Benelli et al., 2003), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **2.3.2. Maceramento de haste**

A inoculação das hastes das diferentes cultivares de batata foi realizada pelo método do palito, utilizando-se colônias bacterianas na fase exponencial de crescimento, em três pontos por haste, sendo o primeiro ponto a 5 cm acima do nível do solo e os demais distantes entre si cerca de 3 cm (Duarte et al., 2004). Foram inoculadas 3 hastes, com o mesmo isolado, em cada vaso e cada tratamento dispôs-se de 3 repetições. Foram realizadas avaliações de severidade através da determinação do comprimento da lesão ao longo do tempo, juntamente com a coleta de material para a quantificação populacional (curva de crescimento bacteriano) nos períodos de 0, 12, 24, 36 e 48 horas após a inoculação. Os resultados obtidos foram integralizados como área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD); a análise de variância foi feita usando o programa estatístico SAS (Benelli et al., 2003), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A quantificação populacional foi realizada pelo método de diluição em placas (Romeiro, 2001). Para cada repetição, 3 discos de hastes de aproximadamente 0,5 cm de comprimento (~0,1g) foram cortados nos pontos de inoculação, sendo cada um deles provenientes de diferentes hastes de vasos distintos. Primeiramente estes discos foram pesados para estimativa da densidade populacional e posteriormente acondicionados em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, imersos em 200 µl tampão de inoculação 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Este tecido foi triturado com o auxílio de um pistilo de plástico, rapidamente centrifugado a baixa velocidade e o sobrenadante (suspensão bacteriana) submetido a 8 diluições seriadas de 1:4 (5X), transferindo-se 40 µl do mesmo para 160 µl de tampão de inoculação. Cada diluição foi posta em placas por microgotas, 20 µl, em meio LB acrescido de ampicilina e ciclohexamida a 100µg/ml para posterior estimativa das UFCs. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 5x4 (cinco cultivares e quatro espécies bacterianas), com 3 repetições. Como controle negativo, o mesmo tratamento foi dado as haste, porém, utilizando-se palitos de dente esterilizados, livres de massa bacteriana.

### **2.4. Perfil de expressão gênica**

O estudo do perfil de expressão de 24 genes marcadores de defesa foi conduzido através da análise de RT-qPCR (Reverse Transcriptase-PCR quantitativo em Tempo Real), com os respectivos oligonucleotídeos gene-específicos selecionados a partir da

literatura (Tabela 4) cujo papel na interação batata-bactérias é desconhecido. Para isto, as cultivares Ágata e Asterix foram selecionadas ao acaso e as hastes inoculadas com *P. brasiliensis*, espécie de grande importância e ampla distribuição no Brasil. A inoculação dos isolados foi feita conforme descrito (2.3.2), porém, respeitando-se os horários de coleta dos discos, programados para 0, 6, 12 e 20 horas após a inoculação das mesmas. As hastes coletadas destinadas a análise da curva de crescimento bacteriano foram imediatamente processadas, ao passo que as que se destinaram ao estudo do perfil da expressão gênica foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o processamento para extração de RNA.

**Tabela 4.** Sequência e detalhe dos oligonucleotídeos selecionados para estudo da expressão dos diferentes genes de defesa.

Primer	Sequência (5' - 3') Forward	Sequência (5' - 3') Reverse	T <sub>m</sub> (°C)	Comprimento (pb)	Acession #	Referências
$\beta$ -tub F <sup>1</sup>	ATGTTCAAGCGCAAGGCTT	TCTGCAACCGGGTCATTCAT	84	101	Z33382	Gallou et al., 2009
EF1- $\alpha$ F	ATTGGAACCGGATATGCTCCA	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	84	101	AB061263	Gallou et al., 2009
Ubc F	TGATGGTTACCCATTGAGCC	ACTGGTCCTTCAGGATGTC	82	110	DQ241834	Gallou et al., 2009
PR-1 F	TATCTTGCAGTTTCAACGA	CACCAGTCTTGAGTTGGCA	55	109	AJ250136	Kerchey et al., 2012
PR-2 F	TATCATCAGCAGGGTTGCAAA	TCGCGAAAAATGCTATTCTAGG	81	100	AJ009932	Gallou et al., 2009
PR-3 F	AATAAGCCATCATGCCACAACG	GCAGTATTCGGACCCATCCC	55	ND	ND	Aghabozorgy and Mohammad, 2009
PR-5 F	ATGGGGTAAACCACCAAAACA	GTTAGTTGGGCCGAAAGACA	60	121	X67244	Wang et al., 2008
PR10-a F	TGACAATCTTATTCCTAAGTTGATGC	AGGTCACTTCTTGATGCTTCC	60	80	M29042	Gonzalez-Lamothe et al., 2008
PPI II F	CAAGCGATTTGCAACATGCA	AATATGGGCAAAATCCCATAGTCA	55	81	BQ113673	Restrepo et al., 2005
PMEI F	AGGCGCCATCGTGACT	AAAATCTTTAGGGGAAATGAAGG AAT	ND	80	BQ504752	Kogovsek et al., 2010
PDF2.1 F	AACAGTTTCGGGTGCAGAAG	GTGAGTCGAAGACCCACCAT	60	135	DR751991	Niehl et al., 2006
ERF3 F	AGGAGGAAGATCTGAAATTC	AACCATAACCGACTCGAC	81	92	EF091875	Gallou et al., 2011
JAZ-1 F	CCATGAATCTTTCCCTCAAG	TTTGTGCTTTTCTGGTTGA	55	ND	EF591123	Kerchey et al., 2012
NPR-1 F	AAATCCGAGAGGGTTGACT	AAACGTCGACCTGTCTCCAC	60	ND	Q6GUF1	Niehl et al., 2006
EDS1 F	CTTCTGCACTGGGAATGGA	TTCGGAAGTCAAGTTGAGAGG	73	91	STMIX37	Lindqvist-Kreuzer et al., 2010
WRKY27 F	ATTGAAGAAGCATACCAAGAG	CCACTGAGGTTGATCGGAG	ND	94	ND	Gallou et al., 2012
WRKY 16 F	GAGTTGGAGGTGTTGGATGA	ATCCTCCACTTGAACATTTGTAG	ND	106	ND	Gallou et al., 2012
WRKY 20 F	GGCTGCTGCATCTTATTGAC	CCACCGCATATTTGTACT	ND	93	ND	Gallou et al., 2012
WRKY3 F	GCTCTTCTTCTTGAAGGTGGA	AAAACCTCACTCTTGGGACTAAT	ND	110	ND	Gallou et al., 2012
WRKY N F	CACCAACACATGTACACATGAAT	GGTCTCAAGTTGTCTTTGTTTC	ND	110	ND	Gallou et al., 2012
WRKY R F	ATGAGCTTGTGGACATGC	AATCGCATGATTTGAAATCAGC	ND	91	ND	Gallou et al., 2012
WRKY 6 F	CTCACGTAAGTACCATTGCAC	GCCTAATAACTCAAACCAAGCC	ND	91	ND	Gallou et al., 2012
WRKY 6-2 F	ATGTTATGTCACTGGGGTTTAC	ATCAAAATTCCAAAGACCCCTCC	ND	98	EU056918	Gallou et al., 2012
WRKY 6-3 F	GTATGCAGGCACTACTTTAGG	CTTGTGGATGGTCTTGGAAT	ND	92	ND	Gallou et al., 2012
WRKY 30 F	ACTAAGACGGATCTGTCCTTC	CAAGGGCCCATCTAGCTT	ND	90	ND	Gallou et al., 2012
WRKY TF F	ATTCAGAGAGCAGTTCAAGTGATG	TGTGTTCTTCTTGGTTTCTTTG	72	60	AB642198	Orłowska et al., 2012

1  $\beta$ -tub ( $\beta$ -tubulina), EF1- $\alpha$  (fator de alongação 1 $\alpha$ ), Ubc (ubiquitina), PR-1 (proteína relacionada a patogênese 1), PR-2 (proteína relacionada a patogênese 2), PR-3 (proteína relacionada a patogênese 3), PR-5 (proteína relacionada a patogênese 5), PR10-a (proteína relacionada a patogênese 10a), PPI II (proteína inibidora de proteases), PME1 (inibidor da pectina metil esterase), PDF2.1 (defensina), ERF3 (fator de resposta ao etileno), JAZ-1 (proteínas JAZ), NPR-1 (proteína tipo NIM1 anquirina), EDS1 (lipase), WRKY (fatores de transcrição tipo WRKY).

Uma análise temporal da expressão relativa destes genes quando comparados ao controle não inoculado, na interface da interação planta-bactéria, foi conduzida nos intervalos de 0, 6, 12 e 20 horas após a inoculação. A quantificação da população bacteriana nas amostras acima foi realizada pelo método de maceramento, diluição serial e incubação em meio seletivo como descrito acima (2.3.2). As reações de RT-qPCR foram corridas em placas de 48 poços usando o equipamento StepOne Real Time

PCR System (Applied Biosystems) através da tecnologia Sybr Green com o kit Fast SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), com 3 repetições técnicas em duplicatas, sendo a média dos valores utilizada para quantificação. Os níveis de expressão relativa dos genes alvos foram calculados usando o gene endógeno constitutivo do fator de alongamento 1 $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ) como referência para normalização através do método Ct comparativo ( $\Delta\Delta C_t$ ) (Schmittgen & Livak, 2008), o qual apresentou melhor desempenho frente a curva de dissociação. Seguindo-se o RT-qPCR, a curva de dissociação dos produtos foi gerada para assegurar a especificidade e qualidade da amplificação.

#### **2.4.1. Extração de RNA e síntese de cDNA**

O RNA total foi extraído a partir de hastes das cultivares Ágata e Asterix, inoculadas com as 4 espécies bacterianas (*P. carotovorum*, *P. atrosepticum*, *P. brasiliensis* e *D. chrysanthemi*) e também de hastes não inoculadas (apenas perfuradas por palitos livres de bactérias). A extração do RNA foi realizada utilizando-se o Kit TRizol<sup>®</sup> Plus RNA Purification Kit (Invitrogen), seguido da síntese do cDNA (DNA complementar) a partir do RNA mensageiro usando o Kit SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante.

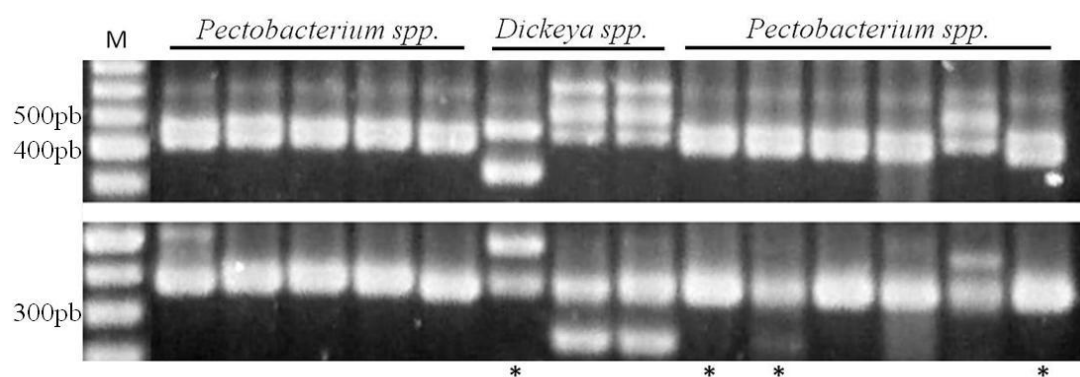
### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1- Caracterização dos isolados

Historicamente, a detecção e identificação de bactérias do gênero *Pectobacterium* tem sido realizada através de testes bioquímicos e fisiológicos clássicos. Dentre eles podemos citar: crescimento a 37°C, degradação de pectato, produção de ácidos a partir de alfa-metil glucosídeo, lactose, maltose, sacarose, e trealose; e a presença de fosfatase (Schaad, 1988; Pérombelon et al., 1998). Entretanto, esses métodos dispendem muito tempo para se ter um diagnóstico conclusivo e são de interpretação duvidosa (Schaad, 1979). De forma promissora, as técnicas biomoleculares baseadas em PCR tem sido aplicadas em análises de rotina, por serem mais eficientes na identificação precisa tanto a nível de gênero quanto espécie.

Para a realização deste estudo, empregamos isolados das espécies *P. carotovorum*, *P. brasiliensis*, *P. atrosepticum* e *D. chrysanthemi*, provenientes de uma coleção de culturas, previamente caracterizados a nível de espécie. Ainda assim, para a confirmação da identidade destes isolados, testes clássicos aplicados no diagnóstico de bactérias pectinolíticas foram executados, incluindo a capacidade de maceração de tubérculos de batata e frutos de pimentão, crescimento anaeróbico e, por último, através da amplificação com oligonucleotídeos gênero e espécie-específicos (Tabela 2). Como esperado, os isolados aqui estudados apresentaram reação positiva para os testes de podridão-mole e crescimento anaeróbico, em acordo com a identificação prévia das espécies (dados não mostrados). De modo similar, testes de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 1491F/L1R, que diferencia *Pectobacterium* de *Dickeya*, confirmaram a identidade dos isolados, uma vez que a amplificação do DNA das espécies de *Pectobacterium* gerou fragmentos de aproximadamente 510 e 550 pares de bases (pb), enquanto que a amplificação do DNA das espécies de *Dickeya* gerou além do fragmento de 550pb um fragmento de aproximadamente 480pb (Figura 1) (Duarte et al., 2004). Embora bandas inespecíficas puderam ser observadas em amplificações do DNA das espécies de *Dickeya* com os oligonucleotídeos BR1F/L1R, um fragmento de tamanho esperado (~ 350pb) foi gerado com o DNA das espécies de *Pectobacterium*. As reações de PCR utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos para a identificação de espécies de *Pectobacterium*, não proporcionou resultados conclusivos (dados não mostrados).

Uma das características marcantes do complexo de espécies de bactérias pectinolíticas é o seu alto grau de variabilidade fenotípica e genética (Yap et al., 2004; Costa et al., 2006). A falha na confirmação das espécies de *Pectobacterium* pode ser explicada como resultado desta alta variabilidade que associada à utilização de oligonucleotídeos desenhados com base em isolados estrangeiros, gerou padrões de bandas inespecíficos impossibilitando a identificação. Pouco se sabe sobre a diversidade genética de isolados brasileiros em relação aos isolados de outros países. Entretanto, diante destes resultados e associado ao fato de que os isolados aqui estudados foram adquiridos de uma coleção de culturas, é razoável assumir que estes pertencem às espécies em questão.



**Figura 1.** Padrão de amplificação observado para os diferentes isolados utilizando os oligonucleotídeos 1491F/L1R (superior) e BR1F/L1R (inferior). Isolados das diferentes espécies estudadas foram analisados e aqueles apresentando o padrão de amplificação esperado, selecionados (\*) para a realização dos experimentos. M, marcador molecular 100bp.

Para viabilizar o estudo do crescimento populacional nas hastes das diferentes cultivares de batata, procedeu-se a transformação dos isolados com o plasmídeo pPROBE-AT-GFP, o qual confere resistência ao antibiótico ampicilina. Este plasmídeo, desenvolvido para a transformação e marcação de *Dickeya sp.* (Czajkowski et al., 2010), mostrou-se eficiente produzindo colônias com as mesmas características morfológicas e patogênicas dos isolados selvagens. Similarmente, as curvas de crescimento dos isolados transformados quando comparado aos respectivos isolados selvagens, em hastes e tubérculos de batata, não apresentaram comportamento diferenciado. De um modo geral, a presença do plasmídeo nas células bacterianas mostrou-se estável em repicagens sucessivas, por um período de tempo equivalente a avaliação dos

experimentos (dados não mostrados). A não utilização do meio semi-seletivo cristal violeta-pectato, CVP (Schaad, 2001), que se baseia na capacidade das bactérias de formarem cavidades características sobre este meio, para estimativa das unidades formadoras de colônia, se deu devido à dificuldade de aquisição de uma fonte de pectina adequada para a composição do mesmo.

### 3.2. Testes de patogenicidade em tubérculo

Com o intuito de melhor compreender as respostas das diferentes cultivares de batata diante da infecção por diferentes espécies de bactérias pertencentes ao complexo causador da podridão-mole, e identificar uma possível interação cultivar-espécies, testes de patogenicidade em tubérculos e hastes foram desenvolvidos. A análise de variância da AACPD (para maceramento de tubérculos) indicou que houve uma interação significativa das diferentes cultivares de batata frente à infecção pelas quatro espécies bacterianas (Tabela 5).

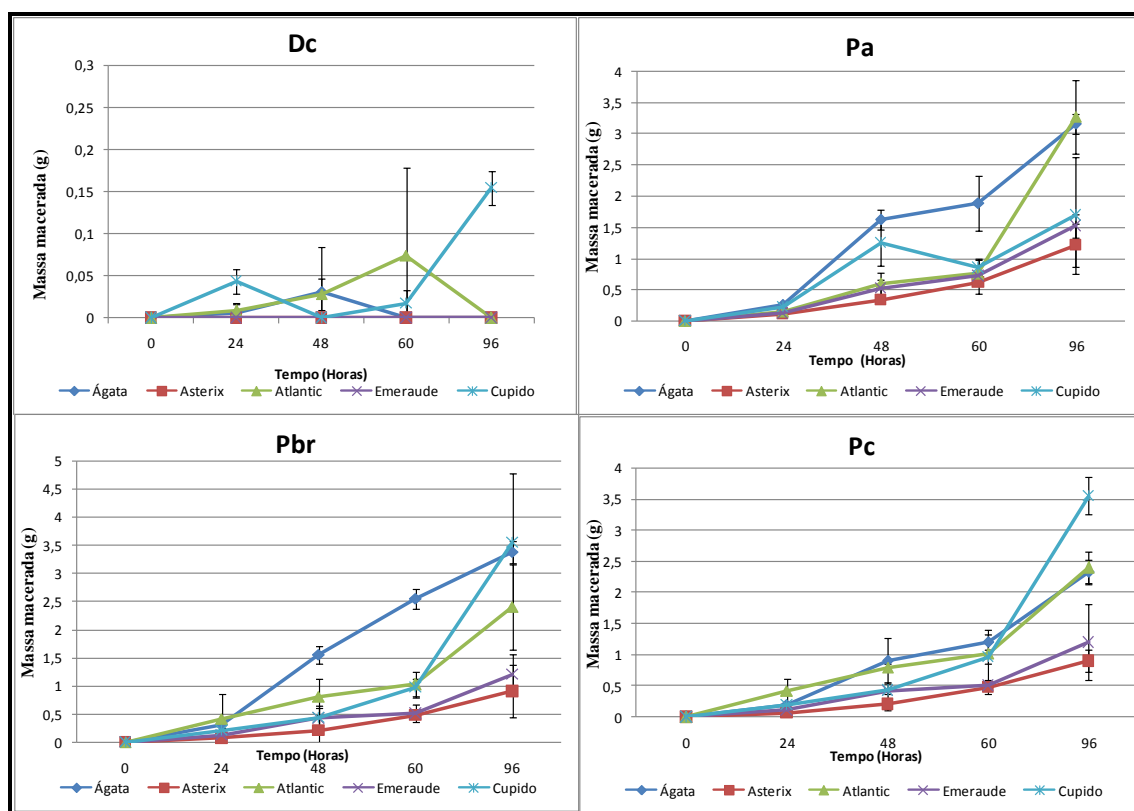
Das quatro fitobactérias levantadas neste estudo, *P. brasiliensis* apresentou-se como a espécie com maior virulência em relação às demais nos tubérculos de todas as cultivares testadas, exceto quando comparada com *P. atrosepticum*, sendo que estas diferiram significativamente apenas na capacidade de maceramento de tubérculos da cultivar Ágata (Tabela 5). Em contraste, *D. chrysanthemi* foi a espécie que apresentou a menor virulência perante as cultivares, diferindo estatisticamente das demais espécies, exceto para *P. carotovorum* nas cultivares Asterix e Cupido. De um modo geral, *P. carotovorum* comportou-se de maneira intermediária com relação as demais espécies.

Tubérculos da cultivar Ágata apresentaram-se com menor resistência parcial às bactérias pectinolíticas estudadas, permitindo maior capacidade de maceramento (Tabela 5). Atlantic e Cupido comportaram-se de forma intermediária não diferindo estatisticamente entre si. Diferentemente, tubérculos das cultivares Asterix e Emeraude comportaram-se como as mais resistentes, apresentando os menores valores de maceramento. A Figura 2 representa as curvas de progresso do maceramento de tubérculos usadas para cálculo da AACPD. As Figuras 3-7 ilustram o experimento de maceramento de tubérculos para as cultivares Ágata, Asterix, Atlantic, Emeraude e Cupido, respectivamente.

**Tabela 5.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença, para o maceramento de tubérculos das diferentes cultivares de batata, inoculadas com bactérias incitadoras de podridão-mole.

Cultivares	Bactérias			
	Dc	Pa	Pbr	Pc
Ágata	0,73 D ba	128,12 B a	144,95 A a	84,83 C a
Asterix	0,00 B b	41,83 A d	30,15 A c	7,44 B d
Atlantic	2,34 C ab	83,42 A b	85,20 A b	46,06 B b
Emeraude	0,02 C b	53,00 A cd	40,60 A c	17,01 B cd
Cupido	3,91B a	73,92 A bc	90,45 A b	31,98B bc

\*Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = 0,19. Dc, *D. chrysanthemi*; Pa, *P. atrosepticum*; PBr, *P. brasiliensis*; Pc, *P. carotovorum*.



**Figura 2.** Progresso do maceramento de tubérculos em cultivares de batata inoculadas com *Dickeya chrysanthemi* (Dc), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr) e *Pectobacterium carotovorum* (Pc). As barras representam o desvio padrão da média.

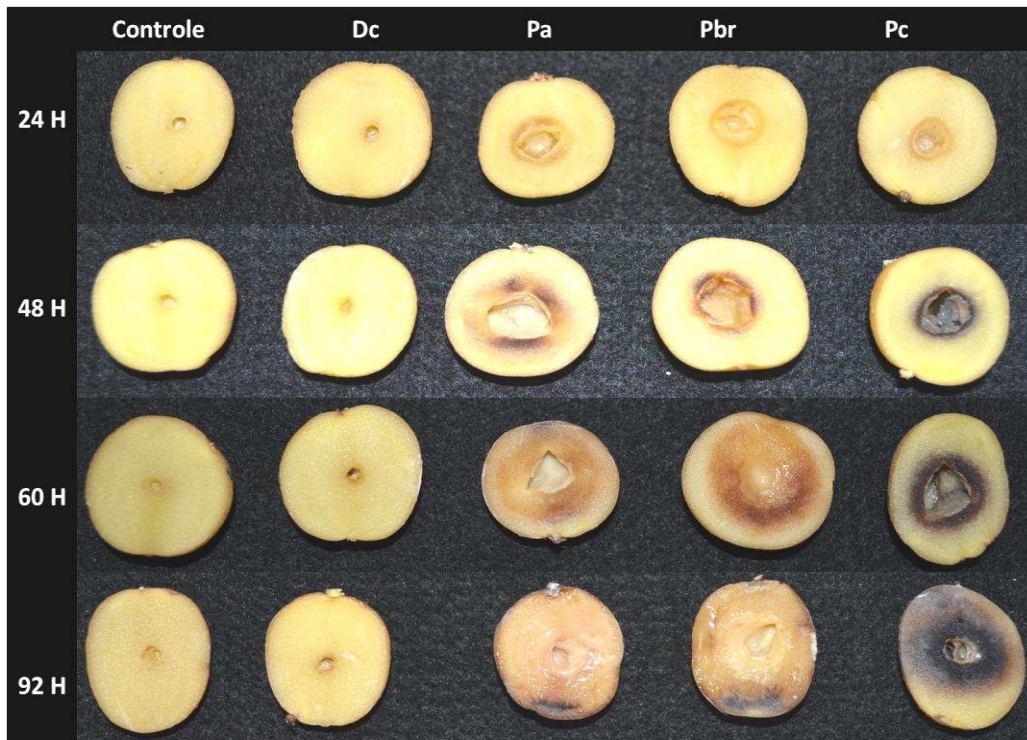
Os resultados de maceramento de tubérculos (avaliados como perda de massa) ao longo do tempo (nos períodos de 0, 24, 48, 60 e 92 horas após a inoculação), seguido do cálculo da AACPD, proporcionou uma melhor compreensão da complexidade da interação entre cultivares e espécies. Considerando a qualidade dos dados obtidos, pode-

se inferir que esta metodologia foi eficiente na avaliação dos diferentes níveis de resistência das cultivares.

De forma contraditória, *D. chrysanthemi* tem sido apontada como a espécie mais virulenta quando comparada a *P. carotovorum* e *P. atrosepticum* (Benelli et al., 2003). Entretanto, deve-se levar em consideração as diferentes condições ambientais na condução dos experimentos, as diferentes cultivares testadas e, principalmente, o fato de que *D. chrysanthemi* foi decomposta em seis outras espécies (Tabela 1). Portanto, é plausível a possibilidade de que em tais experimentos foram utilizadas espécies diferentes. Até o presente momento, não temos informação sobre as espécies de *Dickeya* presentes no Brasil.

As características físico-químicas das diferentes cultivares são atributos importantes que podem ter papel nas respostas diferenciadas observadas aqui. As cultivares selecionadas para este estudo apresentam teores matéria seca e amido diferenciados, podendo assim influenciar os diferentes aspectos da interação batata-pectobactérias.

O termo “sólidos solúveis” agrupa diferentes compostos em água presentes nos tubérculos, como por exemplo, açúcares, amido e aminoácidos que servem como fonte de nutrientes para as bactérias (Chitarra & Chitarra, 1990). Deve-se levar em conta que em uma mesma planta pode-se encontrar tubérculos em diferentes fases de desenvolvimento os quais variam no seu teor de sólidos solúveis, incluindo o amido (Heemest, 1986; Públio, 2008). Contudo, os experimentos aqui apresentados foram conduzidos usando mini-tubérculos com idade fisiológica padronizada. Especula-se que quanto maior o teor de sólidos solúveis que compõe o tubérculo de uma variedade, maior a sua suscetibilidade a podridão-mole, mas ainda faltam dados na literatura para dar suporte a esta visão.



**Figura 3.** Maceramento de tubérculos em função do tempo na cultivar *Ágata*, inoculados com *Dickeya chrysanthemi* (Dc), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr) e *Pectobacterium carotovorum* (Pc).



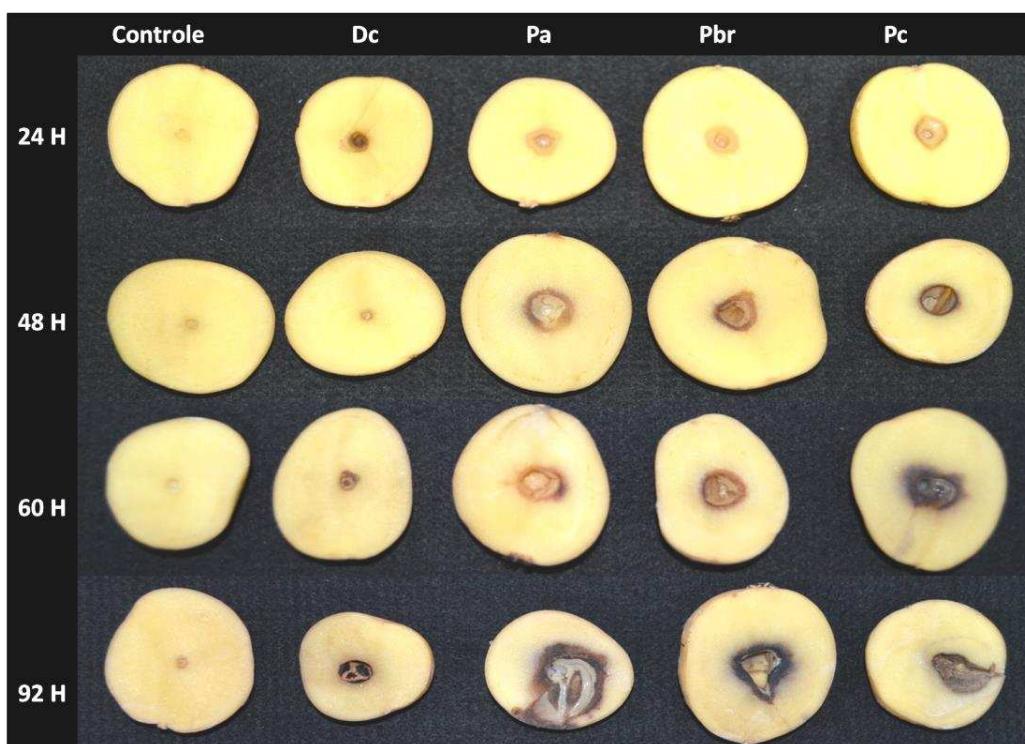
**Figura 4.** Maceramento de tubérculos em função do tempo na cultivar *Asterix*, inoculados com *Dickeya chrysanthemi* (Dc), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr) e *Pectobacterium carotovorum* (Pc).



**Figura 5.** Maceramento de tubérculos em função do tempo na cultivar **Atlantic**, inoculados com *Dickeya chrysanthemi* (Dc), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr) e *Pectobacterium carotovorum* (Pc).



**Figura 6.** Maceramento de tubérculos em função do tempo na cultivar **Emeraude**, inoculados com *Dickeya chrysanthemi* (Dc), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr) e *Pectobacterium carotovorum* (Pc).



**Figura 7.** Maceramento de tubérculos em função do tempo na cultivar **Cupido**, inoculados com *Dickeya chrysanthemi* (Dc), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr) e *Pectobacterium carotovorum* (Pc).

### 3.3. Teste de patogenicidade em haste

De maneira similar, a análise de variância da AACPD para comprimento de lesão indicou que houve uma interação significativa entre cultivares de batata e as espécies bacterianas estudadas (Tabela 6) dando suporte aos resultados obtidos com de maceramento de tubérculos.

Através da análise dos comprimentos das lesões, calculados como AACPD, pode-se afirmar que, assim como em tubérculo, as espécies *P. brasilliensis* e *P. atrosepticum* foram as mais virulentas (Tabela 6). De um modo geral, *P. brasilliensis* foi mais virulenta que *P. atrosepticum*, sendo que seus dados de comprimento de lesão foram significativamente superiores, exceto para as cultivares Asterix e Emeraude. Em contrapartida, *D. chrysanthemi* apresentou os menores comprimentos de lesão, diferindo estatisticamente das demais espécies, exceto para *P. carotovorum* nas cultivares Asterix e Cupido. A similaridade dos resultados apresentados, no que se refere à inoculação de tubérculos e hastes, sugere que a virulência de um determinado isolado independe do

órgão vegetal infectado. Mesmo não sendo conclusivo, é possível notar que *D. chrysanthemi* apresentou uma maior capacidade de colonização das hastes quando comparada aos tubérculos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença, para o comprimento de lesões em hastes das diferentes cultivares de batata, inoculadas com bactérias incitadoras de podridão-mole.

Cultivares	Bactérias			
	Dc	Pa	Pbr	Pc
<b>Ágata</b>	13,67 C b	38,13 B b	67,27 A b	34,47 B b
<b>Asterix</b>	24,20 B b	63,07 A a	68,87 A b	37,27 B b
<b>Atlantic</b>	16,00 C b	61,60 B a	114,90 A a	50,87 Ba b
<b>Emeraude</b>	19,60 C b	46,60 A b	67,27 A b	51,13 Ba b
<b>Cupido</b>	44,47 C a	69,33 B a	113,07 A a	61,67 BC a

\*Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = 0,11. Dc, *D. chrysanthemi*; Pa, *P. atrosepticum*; PBr, *P. brasiliensis*; Pc, *P. carotovorum*.

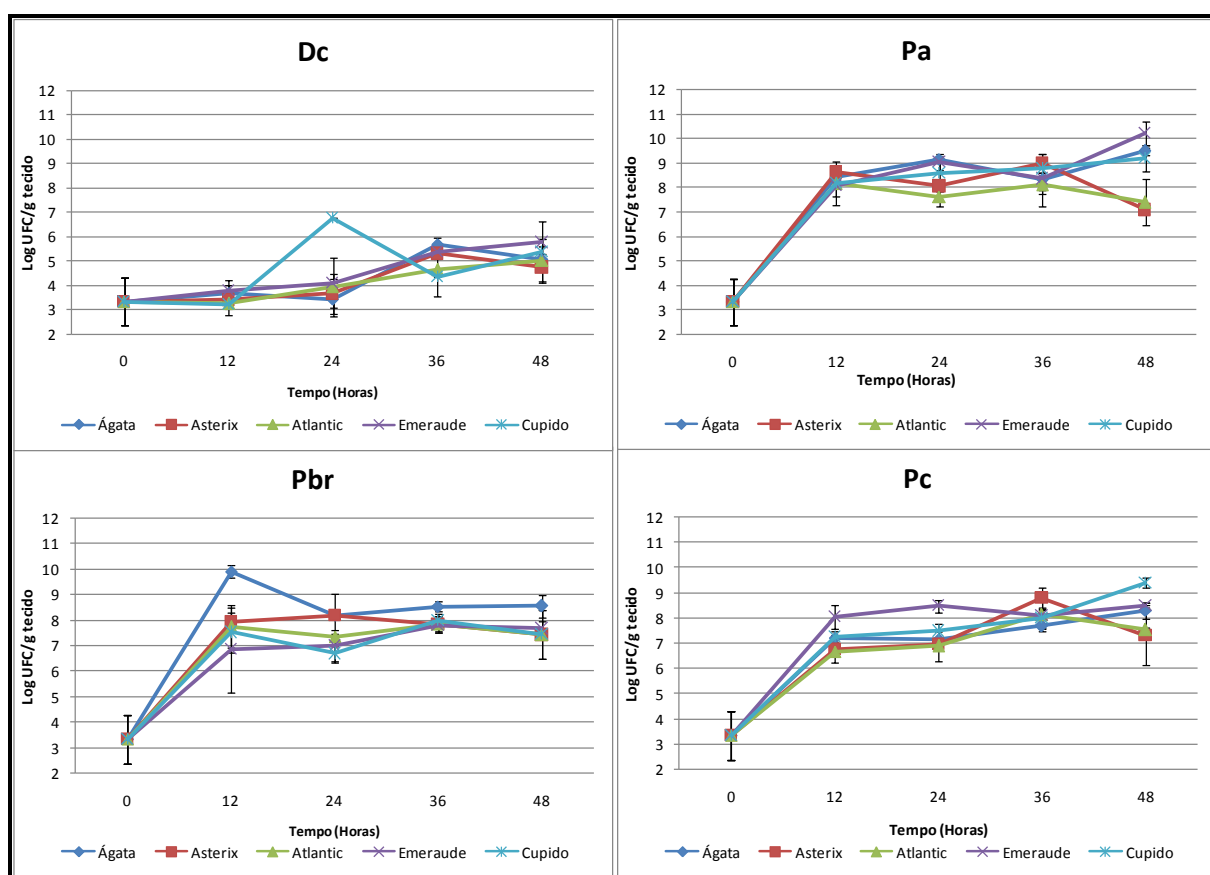
Com relação à resposta das cultivares em relação às espécies estudadas, observou-se que a cultivar Cupido foi a menos resistente à canela-preta, seguida da cultivar Atlantic, as quais diferiram estatisticamente somente com relação à infecção por *D. chrysanthemi*. Em contraste, cultivar Ágata apresentou a maior resistência parcial à doença não diferindo significativamente de Emerald e Asterix, sendo a última significativamente diferente apenas com relação a *P. atrosepticum*.

Como um todo, baseado tanto nos resultados de patogenicidade em tubérculo quanto em haste, pode-se inferir que as diferenças na resistência parcial das cultivares dependem, em grande parte, do tecido vegetal infectado. Em outras palavras, as cultivares apresentaram respostas diferenciadas quando analisado podridão-mole em tubérculos e canela-preta em hastes. Uma explicação para esta observação seria devido a diferenças físico-químicas apresentadas pelas diferentes cultivares. No entanto, até o momento, inexistem estudos analisando esta correlação, visto que muitos trabalhos publicados estão voltados para o estudo das respostas de tubérculos, parte comercializável da planta.

A análise da curva de crescimento bacteriano nas hastes suporta os resultados observados, mostrando uma menor capacidade de crescimento de *D. chrysanthemi* (Figura 8), quando comparado com as outras espécies. Com exceção de *D.*

*chrysanthemi*, as demais espécies apresentaram um crescimento exponencial nas primeiras 12 horas, atingindo após este período uma população da ordem de 8 a 9 na escala logarítmica. Aparentemente, o crescimento populacional nos tecidos não correlacionou com o comprimento de lesão, sendo que as curvas de crescimento de cada espécie nas diferentes cultivares são praticamente semelhantes.

As Figuras 9 a 13 representam o padrão de comprimento de lesões as 48 hai, para as diferentes cultivares.



**Figura 8.** Curvas de Crescimento bacteriano, no período de 0 a 48 horas após a inoculação, nas cultivares Ágata, Asterix, Atlantic, Emeraude e Cupido. *Dickeya chrysanthemi* (Dc), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr) e *Pectobacterium carotovorum* (Pc). As barras representam o desvio padrão da média.



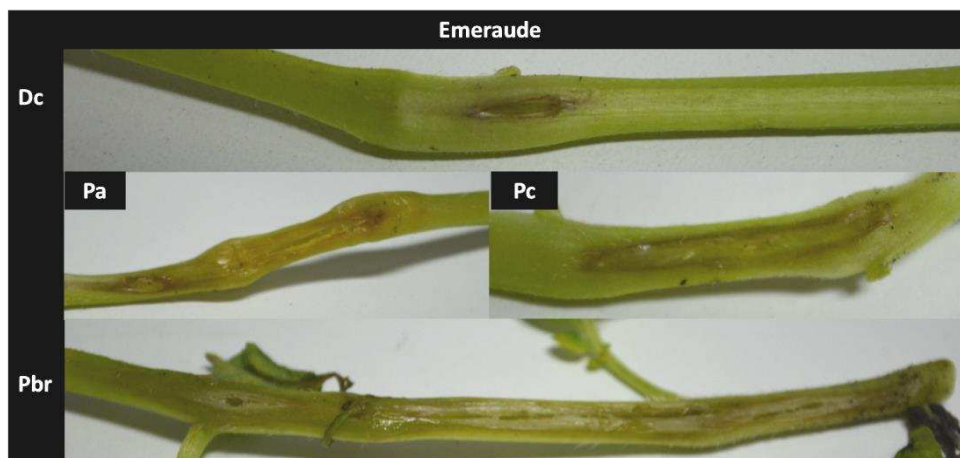
**Figura 9.** Expressão dos sintomas de canela-preta em hastes da cultivar **Ágata** 48 horas após inoculação com *Dickeya chrysanthemi* (Dc), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr) e *Pectobacterium carotovorum* (Pc).



**Figura 10.** Expressão dos sintomas de canela-preta em hastes da cultivar **Asterix** 48 horas após inoculação com *Dickeya chrysanthemi* (Dc), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr) e *Pectobacterium carotovorum* (Pc).



**Figura 11.** Expressão dos sintomas de canela-preta em hastes da cultivar **Atlantic** 48 horas após inoculação com *Dickeya chrysanthemi* (Dc), *Pectobacterium atrosepticum*(Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr) e *Pectobacterium carotovorum* (Pc).



**Figura 12.** Expressão dos sintomas de canela-preta em hastes da cultivar **Emeraude** 48 horas após inoculação com *Dickeya chrysanthemi* (Dc), *Pectobacterium atrosepticum*(Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr) e *Pectobacterium carotovorum* (Pc).



**Figura 13.** Expressão dos sintomas de canela-preta em hastes da cultivar **Cupido** 48 horas após inoculação com *Dickeya chrysanthemi* (Dc), *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Pectobacterium brasiliensis* (Pbr) e *Pectobacterium carotovorum* (Pc).

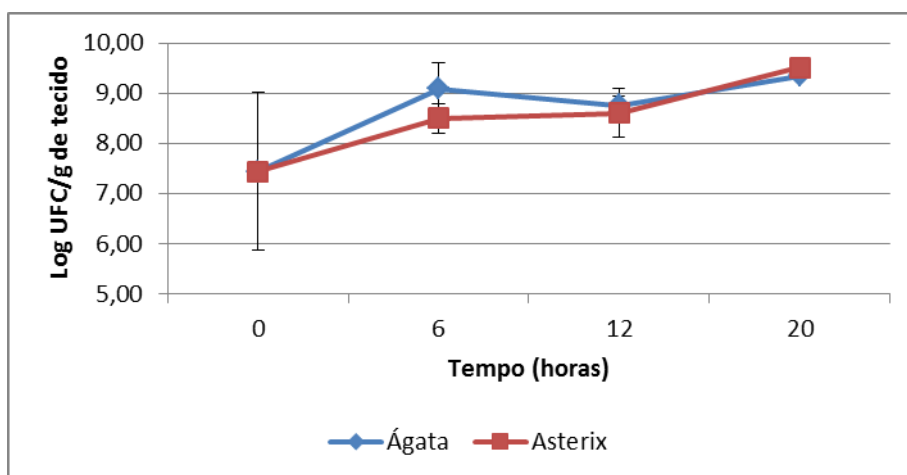
### 3.4. Perfil da expressão dos genes de defesa

No caso específico do patossistema estudado aqui, encontra-se, de um lado, as espécies bacterianas até então caracterizadas, amplamente disseminadas em todas as áreas produtoras de batata ao redor do mundo; e do outro as diferentes cultivares de batata comercialmente plantadas, as quais respondem diferentemente ao apodrecimento pelas diferentes espécies de bactérias pectinolíticas. Mesmo diante da grande importância que esta doença apresenta para a sustentabilidade da cultura da batata, pouco se sabe sobre as bases moleculares das respostas de defesa das cultivares brasileiras em relação às diferentes espécies. Portanto, para avançar o conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares que atuam na interface da interação, um total de 24 genes marcadores de defesa, com papel conhecido em respostas a estresses bióticos e abióticos em plantas de batata foram selecionados para estudo (Tabela 4). Apenas 5 dos 24 genes seguiram na elucidação das hipóteses deste trabalho, uma vez que apresentaram melhor especificidade à amplificação, observados pela curva de dissociação, ou ainda, porque os demais genes não ajudaram no entendimento do patossistema em questão. Em estudos posteriores, pretende-se fazer uma análise mais detalhada sobre o papel destes genes na interação. Apesar de muitos destes genes terem

sido relatados atuarem nas respostas de cultivares de batata a estresses bióticos, não se conhece até o momento o seu papel nas respostas da interação batata-pectobactérias.

Até o momento, não existem variedades de batata resistentes à podridão-mole e a canela-preta para as condições brasileiras. Portanto, a busca por respostas moleculares envolvidas nesta interação leva em conta um patossistema compatível, mesmo considerando as diferenças físico-químicas observadas para as variedades (Tabela 3).

Para a interpretação correta do perfil de expressão dos genes marcadores, procedeu-se a quantificação da população bacteriana nos tecidos das plantas, eliminando-se assim a possibilidade de diferenças no perfil de expressão devido a diferenças na taxa de crescimento nas diferentes variedades (Figura 14). Como a curva de crescimento bacteriano mostrou o mesmo padrão de crescimento para ambas as variedades estudadas, ou seja, atingiu praticamente o mesmo nível populacional em todos os horários de avaliação, pode-se concluir a existência de variações na expressão gênica entre as duas variedades como um resultado devido as diferenças genéticas entre ambas.



**Figura 14.** Curva de Crescimento de *Pectobacterium brasiliensis* nas variedades Ágata e Asterix, no intervalo de 0 a 20 horas após a inoculação. Subamostras de tecidos de hastes utilizadas para estudo do perfil de expressão gênica foram utilizados para determinação da densidade populacional nas duas variedades. As barras representam o desvio padrão da média.

Os mecanismos moleculares de resposta de defesa de plantas a patógenos dependem em grande parte do balanço hormonal nos tecidos, os quais funcionam como moléculas sinalizadoras para o reconhecimento e ativação de defesas (Dong, 1998 ; Robert-Seilaniantz et al, 2011). Uma maneira utilizada pelas bactérias fitopatogênicas para manipular esta regulação a seu favor, é através da secreção de enzimas e proteínas

efetoras no início do processo infeccioso. O balanço hormonal assim como as relações entre eles é de fundamental importância para o resultado final da interação, resistência ou doença. Entre os hormônios com função bem estabelecida o ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET) tem papel direto nas principais vias de resposta (Jones & Dangl, 2006; Pieterse et al., 2009). Estes hormônios atuam de forma quantitativa e qualitativa nas respostas de defesa a patógenos, como por exemplo, o AS está geralmente associado a respostas de defesa a patógenos biotróficos e hemibiotróficos, ao passo que o JA/ET tem um papel essencial nas respostas de defesa a patógenos necrotróficos (Bari & Jones, 2009). Adicionalmente, estes hormônios podem apresentar antagonismo, como por exemplo, ativação das rotas do AS suprimem as respostas mediadas por JA/ET, e vice-versa. Em outras palavras, um ajuste fino destas moléculas é determinante para a interação. Por isso, genes marcadores das diferentes rotas hormonais foram selecionados para análise, como por exemplo ERF3 (ET), JAZ (JA), PR-1 (AS), PDF1.2 (JA/ET).

Baseado na análise de RT-qPCR (Figura 15), os cinco genes estudados PR-3 (Aghabozorgy & Mohammad, 2009), PR-5 (Wang et al., 2008), ERF3 (Gallou et al., 2011), JAZ (Kerchev et al., 2012) e MAPK, foram superexpressos na interação quando comparados ao controle não inoculado. Como espécies de *Pectobacterium* e *Dickeya* são classificadas como patógenos necrotróficos, os resultados da expressão relativa dos genes ERF3 e JAZ, para *P. brasiliensis*, apontam um papel crítico nas regulações de defesa dependentes das rotas sinalizadas por JA e AS, na interação.

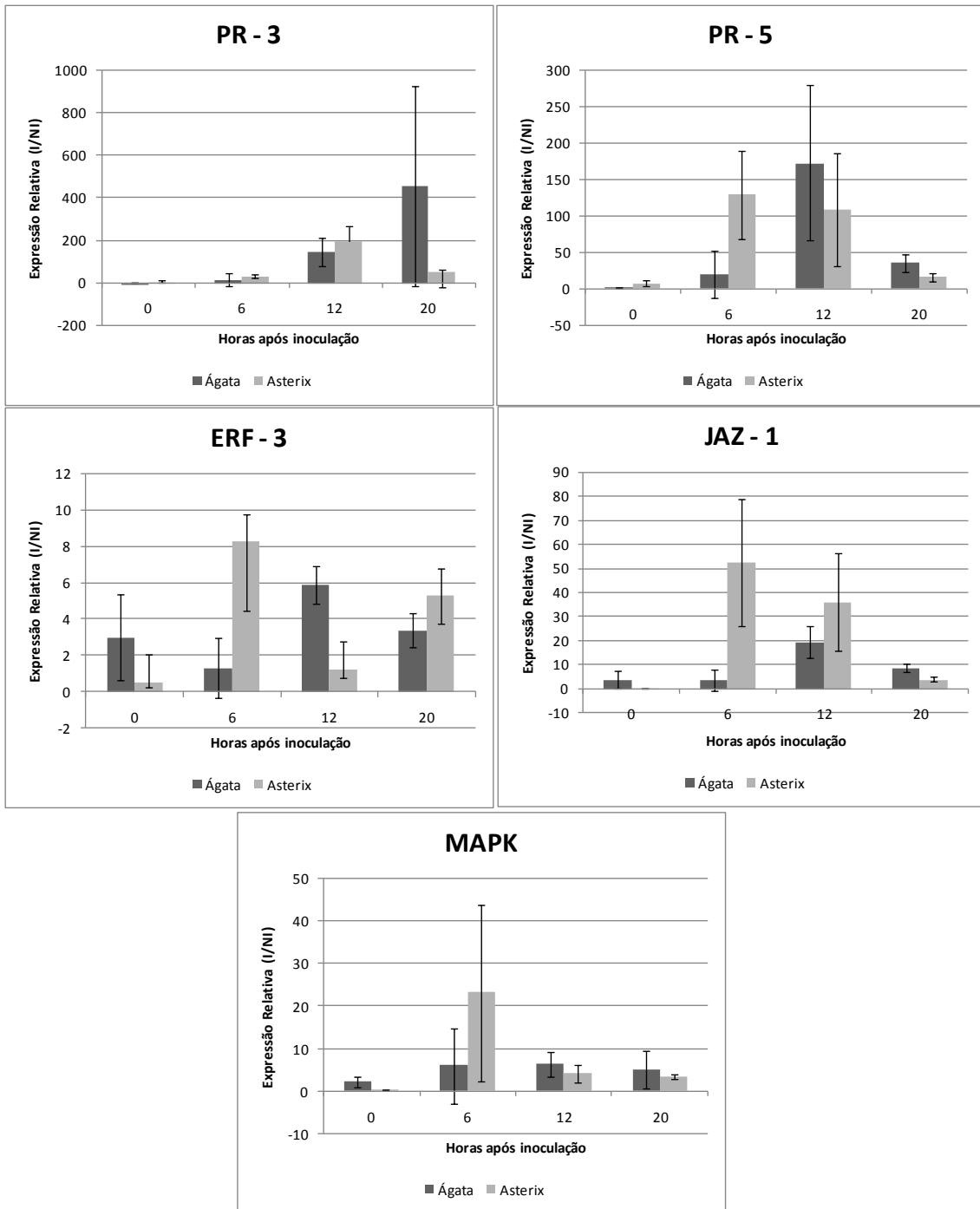
Muitos dos processos biológicos de regulação da maquinaria de transcrição celular são regulados de forma negativa, ou seja, por proteínas repressoras. Isto implica que a ativação dos mecanismos negativamente regulados por esta molécula depende de estímulos específicos que levam a sua degradação, resultando na consequente ativação das rotas “downstream”. Especificamente, este é o caso das proteínas JAZ, em que a sua degradação induzida pela toxina coratina, secretada por isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, leva a um aumento da expressão de JA, antagonizando as rotas do SA essenciais para a defesa da planta contra estas bactérias (Thines et al., 2007; Pauwels & Goossens, 2011). Esta via de sinalização é bem caracterizada em diversas interações abrangendo desde a ação de herbívoros (Schilmiller; Howe, 2005), plantas e ferimentos (Thines et al., 2007; Pauwels & Goossens, 2011).

A expressão de genes codificando proteínas JAZ foi induzida por *P. brasiliensis* a partir da 6<sup>ha</sup> e sendo reduzida após as 12<sup>ha</sup>, de forma maior na cultivar Asterix. Considerando que bactérias pectinolíticas são patógenos necrotróficos, ativando assim defesas baseadas em JA, e que proteínas JAZ são repressoras, a superexpressão observada (20-50 vezes) indica um possível mecanismo de supressão de defesas induzido por *P. brasiliensis* através do aumento da expressão de genes codificadores de proteínas JAZ (Fig. 14). Como estes estudos são em interações compatíveis, em que a partir das 6<sup>ha</sup> a população de *P. brasiliensis* já tenha se estabelecido (Fig. 13), observa-se uma redução nos níveis de expressão provavelmente como resultado da supressão das defesas. Estes resultados são reforçados pela superexpressão dos fatores de transcrição ERF3 (4-8 vezes) em ambas as cultivares, os quais aparentemente tem um papel positivo na regulação de defesas (Brown et al., 2003; Champion et al., 2009). Estes fatores de transcrição (TFs) conhecidos como Ethylene Response Factor (ERF) atuam na regulação dos vários processos fisiológicos das plantas, incluindo a regulação de respostas de defesa. Diversos relatos apontam estes TFs como moléculas importantes na defesa de plantas, conferindo resistência tanto a estresses bióticos quanto abióticos (Park et al., 2001; Pan et al., 2010). Portanto, as rotas hormonais dependentes da sinalização por JA e ET parecem desempenhar um papel importante nas respostas de defesa de batata a bactérias pectinolíticas.

Os genes codificadores das proteínas PR-3 e PR-5 apresentaram expressão significativa para ambas as variedades. Estas proteínas conhecidas como proteínas relacionadas a patogênese (PR proteins) atuam de forma direta e indireta na respostas de defesa de plantas a diversos patógenos (Sudisha et al., 2012). Estas proteínas estão diretamente relacionadas com a patogenicidade sendo assim abundantemente expressas, explicando assim a superexpressão observada neste trabalho a níveis superiores aos demais genes estudados. Estas proteínas são encontradas internamente nas células vegetais, compartimentalizadas nos vacúolos, assim como algumas são secretadas nos sítios de infecção e em tecidos distantes (resistência sistêmica adquirida) atuando de forma direta sobre os patógenos (Sticher et al., 1997). As proteínas PR-3, também conhecidas como endoquitinases, são codificadas por uma família de genes e agrupadas em diferentes classes (I-VII). Diversos relatos apontam a atuação direta das quitinases sobre fungos (Guzzo, 2003), mas também contra patógenos bacterianos (Guan & Chye,

2008). Assim como as proteínas PR-3, PR-5 também apresentam atividade antimicrobiana atuando, como por exemplo, proteínas inibidoras de proteases.

Por último, altos níveis de expressão de MAPK foram observados em tecidos infectados quando comparado a não infectados (Figura 15). As proteínas quinases ativas por mitógenos (MAPK) são universalmente ativas nas respostas de sinalização iniciais e processos de estresses bióticos e abióticos. São consideradas como moléculas transdutoras de sinais atuando na sinalização e respostas que vai ativar a expressão de genes de defesa, incluindo as proteínas PR (Montesano et al., 2001). Em resumo, estes resultados nos permite compreender melhor as bases moleculares envolvidas na resposta de batata a bactérias pectinolíticas. De um modo geral, pode-se observar que as respostas induzidas e suprimidas nesta interação enquadra nos resultados já relatados para outros patossistemas necrotróficos, em que a sinalização mediada pelos hormônios JA/ET e MAPKs assim como a posterior expressão de proteínas PR tem papel relevante na interação.



**Figura 15.** Expressão relativa de genes de defesa selecionados para estudo da interação batata-pectobactéria, por RT-qPCR, nas cultivares Ágata e Asterix, inoculadas com *Pectobacterium brasiliensis* pelo método do palito e normalizadas com plantas destas mesmas cultivares não inoculadas, submetidas a análise temporal da expressão.

#### 4. Conclusões

Os estudos produziram resultados que nos permite compreender melhor as respostas que as cultivares de batata brasileiras apresentam à infecção por pelas diferentes espécies do complexo causador da podridão-mole e canela-preta. Sendo assim:

- A cultivar Ágata foi a menos resistente a nível de tubérculo mas não a nível de haste;
- A resistência parcial das diferentes cultivares é dependente do órgão vegetal infectado;
- *P. brasiliensis* apresentou-se como a espécie mais virulenta em todas as cultivares, independente do órgão infectado;
- A virulência das diferentes espécies bacterianas independe da cultivar analisada.
- A respostas de defesa de batata a pectobactérias depende da ação coordenada da sinalização hormonal a nível de JA/ET e da expressão de proteínas PR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 922 p., 2005.
- AGHABOZORGY, S.; NIAKAN, M. Specific maceration and induction of PR-3 gene in potato tuber tissue by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* type III secretion system mutants. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 24, p. 1576-1580, 2009.
- BAIN, R.A.; PÉROMBELON, M.C.M.; TSROR, L.; NACHMIAS, A. Blackleg development and tuber yielded in relation to numbers of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on seed potatoes. **Plant Pathology**, v. 39, p. 125-133, 1990.
- BARI, R.; JONES, J.D.G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Mol Biol**, v. 69, p. 473–488, 2009.
- BENELLI, A.I.H.; DENARDIN, D.N.; FORCELINI, C.A.; DUARTE, V. Reação de cultivares de batata à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p. 155-129, 2003.
- BROWN, R.L. et al. A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF 1.2 gene of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 132, n. 2, p. 1020-1032, 2003.
- CALVIN, N.M; HANAWALT, P.C. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. **J. Bacteriol**, v. 170, n. 6, p. 2796–2, 1988 .
- CARVALHO, J.B. Desenvolvimento e validação de qPCR para detecção de pectobactérias e *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata. **Tese de Doutorado**, UFRGS, 168 p., 2009.

- CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopath Mycol appl**, v. 20, p. 1-6, 1963.
- CHAMPION, A. et al. Molecular diversity and gene expression of cotton ERF transcription factors reveal that group IXa members are responsive to jasmonate, ethylene and *Xanthomonas*. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 4, p. 471-485, 2009.
- CHISHOLM, S.T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B.J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 4, 803-814, 2006.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. **Lavras: ESAL/FAEPE**, 293 p., 1990.
- COLSON, E.; DEVERALL, B. Helping plants fight their own disease battles. **Australian Cottongrower**, v. 17, p. 76-80, 1996.
- COSGROVE, D.J. Paredes celulares: estrutura, biogênese e expansão. In: **Taiz L, Zeiger E, (Eds.) Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p. 339-64, 2004.
- COSTA, A.B.; ELOY, M.; CRUZ, L.; JANSE, J.D.; OLIVEIRA, H. Studies on pectolytic *Erwinia* spp. in Portugal reveal unusual strains of *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. **Journal of Plant Pathology**, Edizioni ETS Pisa, v. 88, n. 2, p.161-169, 2006.
- CZAJKOWSKI, R.; DE BOER, W.J.; VAN VEEN, J.A.; VAN DER WOLF, J.M. Downward vascular translocation of a green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. (Biovar 3) from stem and leaf inoculation sites on potato, 2010.
- DANGL, J.L.; JONES, J.D., Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826 – 833, 2001.

- DELLAGI, A.; BIRCH, P.R.; HEIBRONN, J.; LYON, G.D.; TOTH, J.K. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*. **Microbiology**, v. 146 ( Pt 1), p. 165-71, 2000.
- DE BOER, S.H.; WARD, L.J. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. **Phytopathology**, v. 85, p. 854-858, 1995.
- DONG, X. SA, JA , ethylene, and disease resistance in plants. **Curr Opin Plant Biol**, v. 1, p. 316-323, 1998.
- DUARTE, V.; DE BOER, S.H.D.; WARD, L.J.; DE OLIVEIRA, A. M. R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 535–545. 2004.
- EL TASSA, S.O.M.; DUARTE, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 620-625. 2004.
- FESSEHAIE, A.; DE BOER, S.H.; LEVESQUE, C.A. Molecular characterization of DNA encoding 16S-23S rRNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. **Canadian Journal of Microbiology** v. 48, p. 387–398, 2002.
- FRÉCHON, D.; EXBRAYAT, P.; HELLAS, V.; HYMAN, L.J.; JOUAN, B., LLOP, P.; LOPEZ, M.M.; PAYET, N.; PÉROMBELON, M.C.M.; TOTH, I.K.; VAN BECKHOVEN, R.C.M.; VAN DER WOLF, J.M.; BERTHEAU, Y. Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. **Potato Research**, v. 41, p. 163-173, 1998.
- GALLOU, A.; CRANENBROUCK, S.; DECLERCK, S. *Trichoderma harziano* elicits defence response genes in roots of potato plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. **Eur J Plant Pathol**, v. 124, p. 219-230, 2009.

- GALLOU, A.; DECLERCK, S.; CRANENBROUCK, S. Transcriptional regulation of defence genes and involvement of the WRKY transcription factor in arbuscular mycorrhizal potato root colonization. **Funct Integr Genomics**, v. 12, p. 183-198, 2012.
- GARDAN, L.; GOUY, C.; CHRISTEN, R.; SAMSON, R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov., *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 381-391. 2003.
- GILCHRIST, D.G. Programmed cell death in plant disease - The purpose and promise of cellular suicide. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 36, p. 393-414, 1998.
- GONZALES-LAMOTHE, R.; BOYLE, P.; DULUDE, A.; ROY, V.; LEZIN-DOUMBOU, C.; KAUR, G.S.; BOUARAB, K.; DESPRÉS, C.; BRISSON, N. The transcriptional activator Pti4 is required for the recruitment of a repressosome nucleated by repressor SEBF at the potato PR-10a gene. **The Plant Cell**, v. 20, p. 3136-3147, 2008.
- GUAN, Y.; CHYE, M. A. *Brassica juncea* chitinase with two-chitin binding domains show anti-microbial properties against phytopathogens and Gram-negative bacteria. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 12, p. 1103-1105, 2008.
- GUZZO, S. D. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 283-332, 2003.
- HAMMOND-KOZACK, K.; JONES, J.D.G. Responses to Plant Pathogens. In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**, 2000.

- HAUBEN, L.; MOORE, E. R.; VAUTERIN, L.; STEENACKERS, M.; MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; SWINGS, J. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, p. 384-397, 1998.
- HEEMST, H.D.J. van. The distribution of dry matter during growth of potato crop. **Potato research**. Wageningen, v. 29, n. 1, p. 55-66, 1986.
- HONG, J.K.; B.K. HWANG. Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, *CAC<sub>hi</sub>2*, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the *CAC<sub>hi</sub>2*-overexpressing *Arabidopsis*. **Planta**, v. 223, p. 433-448, 2006.
- IBGE. 2010. Levantamento sistemático da produção agrícola em 2009. disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.
- KADO, C.J.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p. 969-976, 1970.
- KERCHEV, P.I.; FENTON, B.; FOYER, C. H.; HANCOCK, R.D. Infestation of potato (*Solanum tuberosum* L.) by the peach – potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) alters cellular redox status and is influenced by ascorbate. **Plant, Cell and Environment**, v. 35, p. 430-440, 2012.
- KOGOVSEK,P.; POMPE-NOVAK, M.; BAEBLER, S.; ROTTER, A.; GOW, L.; GRUDEN, K.; FOSTER, G.D.; BOONHAM, N.; RAVNIKAR, M. Aggressive and mild Potato virus Y isolates trigger different specific responses in susceptible potato plants. **Plant Pathology**, v. 59, p. 1121-1132, 2010.
- KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THOMELEY, R.N.F. Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1237-45, 1997.

- LEE, Y.K.; HWANG, B.K. Differential induction and accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms in the intercellular space and leaf tissues of pepper by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* infection. **Journal of Phytopathology**, 1996.
- LINDQVIST-KREUZE, H.; CARBAJULCA, D.; GONZALEZ-ESCOBEDO, G.; PÉREZ, W.; BONIERBALE, M. Comparison of transcript profiles in late blight-challenged *Solanum cajamarquense* and B3C1 potato clones. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 4, p. 513-530, 2010.
- MORAES, M.G. Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia Vegetal**, v.6, p. 261-284, 1998.
- MONTESANO, M.; KÕIV, V.; MÃE, A.; PALVA, T. Novel receptor-like protein induced by *Erwinia carotovora* and short oligogalacturonides in potato. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 6, p. 339-346, 2001.
- NGADZE, E.; ICISHAHAYO, D.; COUTINHO, T.A.; VAN DER WAALS, J.E.. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. **Plant Dis.**, v. 96, p. 186-192, 2012.
- NASSAR, A.; DARRASE, A.; LEMATRE, M.; KOTOUJANSKY A.; DERVIN, C.; VEDEL, R.; BERTHEAU, Y. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified fragments of *pel* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2228-2235. 1996.
- NIEHL, A.; LACOMME, C.; ERBAN, A.; KOPKA, J.; KRAMER, U.; FISAHN, J. Systemic Potato virus X infection induces defence gene expression and accumulation of  $\beta$ -phenylethylamine-alkaloids in potato. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 593-604, 2006.

- ORLOWSKA, E.; FIIL, A.; KIRK, H.; LLORENT, B.; CVITANICH, C. Differential gene induction in resistant and susceptible potato cultivars at early stages of infection by *Phytophthora infestans*. **Plant Cell Reports**, 2012.
- PAN, I. C. et al. Ectopic expression of an EAR motif deletion mutant of SIERF3 enhances tolerance to salt stress and *Ralstonia solanacearum* in tomato. **Planta**, v. 232, n. 5, p. 1075-1086, 2010.
- PARK, J.M. et al. Overexpression of the tobacco Tsi 1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. **The Plant Cell**, v. 13, n. 5, p. 1035-1046, 2001.
- PAUWELS, L.; GOOSSENS, A. The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. **Plant Cell**, v. 23, n.9, p. 3089-100, 2011.
- PEREIRA, S.A.; DANIELS, J. O cultivo da batata na região sul do Brasil. Brasília-DF. **EMBRAPA Informações Tecnológicas**. 567p. 2003.
- PÉROMBELON, M.C.M.; LOPEZ, M.M.; CARBONELL, J. et al. Effects of contamination by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica* of potato seed tubers and of cultivar resistance on blanking or non-emergence and blackleg development in Valencia, Spain. **Potato Res.**, v. 31, p. 591-9, 1988.
- PIETERSE, C.M.J.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S.C.M. Networking by small-molecules hormones in plant immunity. **Nat Chem Biol**, v. 5, p. 308–316, 2009.
- PÚBLIO, A.P.P.B. Características físico-químicas de tubérculos de batata submetidos a fontes e concentrações de potássio. **Dissertação de Mestrado**. Vitória da Conquista BA. Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, 2008.

- RESTREPO, S.; MYERS, K. L.; DEL POZO, O.; MARTIN, G. B.; HART, A. L.; BUELL, C. R., FRY, W. E.; SMART, C. D. Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. **The American Phytopathological Society**, v. 18, n. 9, p. 913-922. DOI: 10.1094/ MPMI -18-0913, 2005.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: Editora UFV. 279p., 2001.
- ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M.; JONES, J.D.G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just jasmonate salicylate antagonism. **Annu Rev Phytopathol**, v. 49, p. 317-43, 2001.
- SAMSON, R.; LEGENDRE, J .B.; CHRISTEN, R.; ACHOUAK, W.; GARDAN, L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1415-1427. 2005.
- SCHAAD, N. W. Serological identification of plant pathogenic bacteria. **Ann. Rev. Phytop athology**, v. 17, p. 123-147, 1979.
- SCHAAD, N.W. **Laboratory Guide for Identification of Plant pathogenic bacteria**. 2 ed. St. Paul: APS, 164p. 1988.
- SCHAAD, N. W., et al. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3 ed. St. Paul, 373p., 2001.
- SCHILMILLER, A.L.; HOWE, G.A. Systemic signaling in the wound response. **Curr Opin Plant Biol**, v. 8, n. 4, p. 369-377, 2005.

- SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1101–1108, 2008.
- SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: An organism perspective. **Plant Growth Regulation**, v. 12, p. 303-312, 1993.
- STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAÚX, J. P. Systemic acquired resistance. **Ann Rev Phytopathol**, v. 35, p. 235-270, 1997.
- SUDISHA, J.; SHARATHCHANDRA, R.G.; AMRUTHESH, K.N.; KUMAR, A.; SHETTY, H.S. **Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response Progress in Biological Control**, v. 12, p. 379-403, 2012.
- TAKATSU, A. Erwinias do grupo *carotovora* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 535-536, 1983.
- TAKKEN, F.L.W.; JOOSTEN, M.H.A.J. Plant resistance genes: their structure, function and evolution. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 8, p. 699-713, 2000.
- THINES, B.; KATSIR, L.; MELOTTO, M.; NIU Y.; MANDAOKAR, A.; LIU, G.; NOMURA, K.; HE, S.Y.; HOWE, G.A.; BROWSE, J. JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. **Nature**, 9 ed., v. 448, n. 7154, p. 661-5, 2007.
- TOTH, I.K.; VAN DER WOLF, J.M.; SADDLER, G.; LOJKOWSKA, E.; HELIAS, V.; PIRHONEN, M.; TSROR, L. (LAHKIM); ELPHINSTONE, J.G. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. **Plant Pathology**, v. 60, p. 385–399, 2011.

- TSOR L. (LAHKIM), ERLICH, O., LEBIUSH, S., HAZANOVSKY, M., ZIG, U., SLAWIAK, M., GRABE, G., VAN DER WOLF, J.M. & VAN DE HAAR, J.J. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *Eur J Plant Pathol* 123, 311–320, 2009.
- TUMELEIRO, A. I.. Identificação e quantificação de bactérias *Pectobacterium* sp. em tubérculos-semente de cultivares de batata. **Dissertação de Mestrado**. Passo Fundo RS. Universidade de Passo Fundo, 2003.
- VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753-765, 1997.
- WANG, X.; EL HADRAMI, A.; ADAM, L.R.; DAAYF, F. Differential activation and suppression of potato defence response by *Phytophthora infestans* isolates representing US-1 and US-8 genotypes. **Plant Pathology**, v. 57, p. 1026-1037, 2008.
- YAP, M.; BARAK, J.D.; CHARKOWSKI, A.O. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, V. 70, n. 5, P. 3013 - 3023, 2004.
- YI, T.; ZHIYI, X.; WENQIONG, C.; GLAZEBROOK, J.; BIN, H.; TONG, Z.; GUANGZHOU, Z.; FUMIAKI, K. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 2, p. 317-330, 2003.
- YOUNG, S. A.; GUO, A.; GUIKEMA, J. A.; WHITE, F. F.; LEACH, J. E. Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interaction with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Plant Physiol**, v. 107, p. 1333-1341, 1995.