

SEÇÃO: AGRONOMIA

PRODUÇÃO DE ANTI-SOROS PARA DIAGNOSE DE PECTOBACTÉRIAS CAUSADORAS DE PODRIDÃO MOLE EM BATATA

JOSÉ RICARDO PFEIFER SILVEIRA¹, LUIS ANTÔNIO SUITA DE CASTRO², MERY ELIZABETH OLIVEIRA COUTO³, OLINDA MARIA MARTINS⁴, VALMOR BARNI⁵

RESUMO - Foram produzidos anti-soros a partir de células inteiras e não tratadas de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pca), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) e *P. chrysanthemi* (Pch). Utilizou-se como antígeno 2 ml de suspensão bacteriana na concentração de 6 a 7×10^7 UFC/ml, emulsificada com igual volume de adjuvante completo de Freund, fazendo quatro aplicações em coelhos, com intervalos semanais. Os anti-soros obtidos (título 1:640) foram específicos em relação aos antígenos utilizados e não reagiram com outras bactérias, vírus e fungos fitopatogênicos, bem como, com extratos de plantas de batata, fumo e tomateiro. Concluiu-se que apenas antígenos presentes nas estruturas celulares de Pca, Pcc e Pch são identificados pelos anticorpos produzidos e que o teste de aglutinação em látex pode ser realizado com diluições do antígeno nas proporções de 1:1 e 1:10, partindo-se da concentração padrão (50%T; 550 nm).

Palavras chave: *Pectobacterium, carotovorum, atrosepticum, chrysanthemi*, imunologia, sorologia, *solanum tuberosum*

PRODUCTION OF ANTISERA FOR DIAGNOSIS OF SOFT-ROTTING PECTOBACTERIAS IN POTATO

ABSTRACT - Polyclonal antisera against *Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum* (Pca), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) and *P. chrysanthemi* (Pch) were produced from intact, untreated cells. Bacterial suspensions with 6 to 7×10^7 CFU/ml (2 ml), emulsified with an equal volume of complete Freund's adjuvant were used as antigens to immunize rabbits. The antigens were injected four times at weekly intervals. The antisera obtained (1:640 titer) were specific against the antigens used and did not exhibit any reaction toward other phytopathogenic bacteria, virus and fungi, as well as potato, tomato, and tobacco plant extracts. Only antigens presents in the cellular structures of Pca, Pcc and Pch are identified by the antibodies and that the latex agglutination test can be used with dilutions of the antigens in order of 1:1 and 1:10 of the initial concentration (50% T, 550 nm).

Key words: *Pectobacterium, carotovorum, atrosepticum, chrysanthemi*, immunology, serology, *Solanum tuberosum*

¹Engenheiro Agrônomo, Doutor Pesquisador da FEPAGRO/Laboratório de Fitopatologia. Rua Gonçalves Dias 570, Bairro Menino Deus. CEP 90130-060, Porto Alegre/RS. E-mail: pfeifer@fepagro.rs.gov.br. Autor para correspondência

²Engenheiro Agrônomo, MSc., Pesquisador da EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas/RS

³Engenheira Agrônoma, Convênio EMATER/RS - EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado

⁴Engenheira Agrônoma, Ph.D. Pesquisadora da EMBRAPA/Centro Nacional de Recursos Genéticos, Brasília/DF

⁵Engenheiro Agrônomo, MSc. Pesquisador da FEPAGRO/Centro de Pesquisa de Agroindústria, Caxias do Sul/RS

Recebido para publicação em 01-01-2002

INTRODUÇÃO

A análise de seqüências do DNA ribossomal da região 16S de vários membros da família Enterobacteriaceae, resultou na separação do gênero *Erwinia* em três grupos filogenéticos, estabelecendo três diferentes gêneros: *Erwinia*, *Pectobacterium* e *Brenneria* (HAUBEN et al., 1998).

O gênero *Pectobacterium*, no qual são classificadas as pectobactérias causadoras de podridões moles, é constituído por quatro espécies: *P. carotovorum*, *P. chrysanthemi*, *P. cacticida* e *P. Cypripedii*. Sendo a espécie *Pectobacterium carotovorum*, subdividida em cinco subespécies: *P. c.* subsp. *atrosepticum*, *P. c.* subsp. *carotovorum*, *P. c.* subsp. *betavasculorum*, *P. c.* subsp. *odoriferum* e *P. c.* subsp. *wasabie* (DUARTE e EL TASSA, 2003).

As pectobactérias são causadoras de podridão mole em diversas espécies de plantas. Dentre estas, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* e *Pectobacterium chrysanthemi* são causadoras de podridão mole em batata (*Solanum tuberosum* L.). O sintoma de podridão mole é resultante da capacidade do patógeno produzir enzimas tais como pectinases, poligalacturonases, celulasas e proteases, que atacam componentes da parede celular do hospedeiro (SALMOND, 1994).

As bactérias pertencentes ao gênero *Pectobacterium* são descritas como bastonetes retos, medindo de 0,5-1,0 X 1,0-3,0 micra, com presença de flagelos peritricos, Gram negativas, anaeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, oxidase negativas e catalase positivas (DE BOER e KELMAN, 2001). Possuem uma distribuição geográfica e climática que reflete sua adaptabilidade a diferentes hospedeiros e temperaturas. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* esta relacionada a batata cultivada em regiões temperadas, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* é patogênica a diversas espécies

hospedeiras em regiões temperadas e tropicais e *P. chrysanthemi* também é patogênica a diversas espécies e está distribuída em zonas tropicais, subtropicais e temperadas (PÉROMBELON e KELMAN, 1987). Em lavouras de batata, o tubérculo semente se constitui em uma importante fonte de inóculo. As plantas também podem ser infectadas pelas raízes, em solos contaminados, ou pela água de irrigação (PEROMBÉLON e KELMAN, 1980).

Tem-se observado a sobrevivência de *Pectobacterium* spp. no solo, na água e em associação com a rizosfera de várias espécies invasoras de campos cultivados e, embora ocorram de forma endêmica em alguns solos, podem não ser encontradas em outros. Estudos sobre a ecologia das *Pectobacterium* spp. causadoras de podridão mole em batata têm resultados contraditórios sobre a habilidade dessas bactérias sobreviverem no solo (BURR e SCHROTH, 1977; POWELSON e APPLE, 1984). Alguns autores atribuem estas diferenças à ineficiência das técnicas para detecção do patógeno. Os meios seletivos, utilizados para isolamento, têm alcançado resultados com diferentes graus de sucesso (CUPPLES e KELMAN, 1974).

Vários métodos sorológicos têm sido utilizados na detecção de bactérias fitopatogênicas, por serem os anti-soros altamente específicos e sensíveis. Na produção de anti-soros para bactérias, geralmente usam-se células fixadas com gluteraldeído ou formalina (DE BOER et al., 1979). Porém, células bacterianas não tratadas podem ser utilizadas como antígenos, produzindo anticorpos policlonais que tendem a reagir com lipopolissacarídeos (somente para bactérias Gram negativas), proteínas expostas, incluindo a flagelina e polissacarídeos extracelulares (BALL et al., 1990).

A utilidade da sorologia para identificação de pectobactérias em espécies e subespécies é limitada. Os anticorpos produzidos a partir de lipopolissacarídeos são altamente específicos, no entanto, a existência de muitos sorogrupos para

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* tornam a identificação desta subespécie impraticável. De modo oposto, a maioria das estirpes de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* pertencem ao sorogrupo I, sendo que anticorpos monoclonais específicos a um sorogrupo são úteis para a identificação desta subespécie (DE BOER e KELMAN, 2001).

Entre os testes sorológicos utilizados para diagnose de bactérias fitopatogênicas, destacam-se a difusão dupla em ágar, microaglutinação, imunofluorescência, aglutinação de látex e ELISA (SCHAAD, 1988; DE BOER e KELMAN, 2001).

O teste de aglutinação de látex utiliza partículas uniformes de látex (esferas de poliestireno com 810 nm de diâmetro), revestidas com anticorpos por adsorção ou ligações covalentes; o látex sensibilizado é misturado com o antígeno (bactérias) ocorrendo a aglutinação dentro de poucos minutos. Além da rapidez e sensibilidade, a reação pode ser observada sem qualquer equipamento. Utilizado inicialmente para estudos de viroses, o método tem demonstrado sua utilidade também com procariontes (SLACK e BALL, 1990).

Métodos rápidos e efetivos para a identificação de bactérias fitopatogênicas, tais como as *Pectobacterium* spp., facilitariam os estudos ecológicos e o controle desses organismos, pois os testes bioquímicos e fisiológicos rotineiramente utilizados não são inteiramente satisfatórios, por serem trabalhosos, de difícil interpretação e muito demorados (SCHAAD, 1988). De acordo com DE BOER e KELMAN (2001) é estimado que um terço das estirpes de *Pectobacterium carotovorum* isoladas de batata possam ser classificadas em um dos quarenta sorogrupos descritos. Algumas estirpes de outros hospedeiros também pertencem a estes sorogrupos, porém a diversidade sorológica de estirpes de outros hospedeiros que não a batata, não é conhecido.

O presente trabalho teve como objetivo adaptar e desenvolver tecnologia na produção de anti-soros policlonais a partir de células inteiras

e não tratadas de *Pectobacterium* spp., causadoras de podridão mole. Para avaliar os anti-soros utilizou-se o método de aglutinação de látex, adaptando-se o procedimento descrito por FRIBOURG (1981) para sensibilização de látex, e obter um título adequado de modo a viabilizar o teste. O desenvolvimento de técnicas rápidas, e de fácil interpretação, poderá auxiliar os estudos sobre a ecologia das pectobactérias causadoras de podridão mole, em programas de produção de batata de elevada sanidade no Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e avaliação dos antígenos - Três isolados de *Pectobacterium* spp. foram utilizados como antígenos: *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, obtida de *Allium cepa*, proveniente da coleção de bactérias da Universidade Federal de Viçosa; *P. carotovorum* subsp. *atroseptica*, obtida de *Solanum tuberosum*, proveniente da coleção de bactérias da EMBRAPA/CPACT; e *P. chrysanthemi*, obtida de *Arracacia xanthorrhiza*, proveniente da coleção de bactérias da EMBRAPA/CNPH.

As bactérias utilizadas como antígeno foram confirmadas em nível de gênero pelos testes de Gram e de crescimento em meio anaeróbico, e em nível de espécie e subespécie pelos testes de crescimento à 37 °C, formação de fosfatase, produção de substâncias redutoras de sacarose e produção de ácidos a partir dos carboidratos alfa-metil-glucosídeo, lactose, trealose e maltose (JABUONSKI et al., 1986; SCHAAD, 1988). A patogenicidade foi testada em frutos verdes de pimentão e em plantas de batata (TAKATSU et al., 1981; JABUONSKI et al., 1986).

Produção dos anti-soros - Culturas de bactérias em meio 523 (KADO e HESKETT, 1970) foram lavadas das placas de Petri com jatos de seringa hipodérmica, contendo solução salina (NaCl 0,85%), e submetidas à centrifugação (500 g; 5 min), descartando-se o precipitado. O

sobrenadante foi centrifugado três vezes (3000 g; 20 min; centrífuga JOUAN MD CR 11.4), usando-se 6 ml da solução salina para ressuspender os precipitados obtidos. As suspensões bacterianas foram padronizadas em 62,5% T; 550 nm (espectrofotômetro MICRONAL MD B 382), para se obter uma concentração aproximada de $6 \text{ a } 7 \times 10^7$ UFC/ml, conforme determinação prévia obtida através de diluições e contagem de colônias em placas. Alíquotas de 2 ml foram congeladas (-20 °C) para posterior imunização de coelhos da raça Nova Zelândia. Cada coelho recebeu quatro injeções intramusculares de 2 ml da suspensão bacteriana e 2 ml de adjuvante completo de Freund, em intervalos semanais. Uma semana após a última injeção iniciaram-se as sangrias periódicas, através de corte da veia marginal da orelha. O sangue coletado foi deixado coagular por uma hora à temperatura ambiente, descolado das paredes do Becker com uma agulha hipodérmica e deixado por 15 h sob refrigeração (5 °C). O soro obtido foi então centrifugado (2000 rpm; 15 min; centrífuga FANEM MD 204-NR) e o sobrenadante separado em alíquotas de 3 ml para armazenamento em freezer (-20 °C).

Para purificação da gama-globulina (FRIBOURG, 1981), precipitou-se com sulfato de amônio saturado, na proporção de 1 ml da solução do sal, para 0,3 ml do soro diluído a 1:5 em solução salina. A mistura foi deixada por 30 min para precipitação e centrifugada a 7000 g; 20 min. Os precipitados foram suspensos em 3 ml de solução tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 e submetidos a 18 horas de diálise, seguindo-se uma centrifugação de 10000 g; 30 min. A gama-globulina foi armazenada sob refrigeração (5 °C).

Na determinação do título dos anti-soros, o látex foi sensibilizado com diferentes diluições da gama-globulina. Para isto, fez-se oito diluições em série (fator 2) da gama-globulina em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2, partindo de 1:20 até 1:5120. Em 1 ml de cada diluição acrescentou-se 1 ml de látex (0,8 micron SIGMA) diluído a 1:60. O processo de sensibilização constou de três centrifugações de 6000 g; 20 min. Os pre-

cipitados foram ressuspensos em 2 ml da solução tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,2 acrescido de 0,02% de polivinilpirrolidone (PVP-40). Após a última centrifugação os precipitados foram ressuspensos em apenas 1 ml do tampão.

O látex sensibilizado foi armazenado em frascos de vidro, etiquetado e conservado à 5 °C para posterior utilização. De um total de oito sangrias para cada isolado, foram testados os anti-soros provenientes da segunda e sétima sangrias, dos três isolados.

Avaliação do título dos anti-soros - O látex sensibilizado com as diluições da gama-globulina foi testado contra o respectivo antígeno na diluição padrão (62,5% T; 550 nm) e seriada (fator 10) de 1:1 a 1:10000, em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, acrescido de 1% mercaptoetanol. Cada diluição dos diferentes anti-soros foi testada contra as diferentes concentrações de seu respectivo antígeno. O título foi padronizado pela diluição mais elevada do antígeno em que as reações apresentaram-se características para o teste.

Especificidade dos anti-soros - Para avaliar a especificidade dos anti-soros, estes foram testados inicialmente em relação aos inóculos utilizados na produção dos demais anti-soros e, posteriormente, contra vários tipos de antígenos, tentando-se determinar reações não específicas nos testes a serem realizados rotineiramente. Foram testados os extratos de plantas de batata, tomate e fumo; plantas de batata contendo os principais vírus que incidem na cultura (vírus X, S, Y e Enrolamento da Folha); fungos patogênicos à cultura da batata, como *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Phomopsis* spp., *Phytophthora infestans* e *Rizoctonia solani* e bactérias fitopatogênicas, como *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas corrugata*, *P. rubrilineans*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* e *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, cultivados em meio de cultura. O extrato das plantas, e as suspensões de células bacterianas e de fungos foram testados conforme processo descrito na etapa de avaliação do título dos anti-soros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação dos antígenos - Os isolados de *Pectobacterium* spp. utilizados para imunização dos coelhos apresentaram as características do gênero, ou seja, foram Gram negativos e fermentativos em meio anaeróbico. As características culturais corresponderam às de *Pectobacterium* spp., com crescimento rápido, colônias opacas, brancas, apigmentadas, de tonalidade cinza ou levemente esverdeada e bordos irregulares. Foram também confirmadas em nível de espécie e subespécie pelas características bioquímicas e fisiológicas (JABUONSKI et al., 1986).

Os resultados obtidos em frutos de pimentão e plantas de batata foram satisfatórios, devido à severidade com que os isolados causaram os sintomas. Tais informações concordam com JABUONSKI et al. (1986), que avaliaram a patogenicidade de 152 isolados de *Pectobacterium carotovorum*, obtidos de plantas de batata, tomateiro e 27 outras espécies hospedeiras, e concluíram que, independente da classificação taxonômica e do hospedeiro de origem, 80 e 84% dos isolados foram patogênicos respectivamente, a tubérculos de batata e frutos de pimentão.

Produção dos anti-soros - Nas sangrias semanais dos coelhos imunizados foi possível obter aproximadamente 20 ml de sangue e, após a separação do coágulo, aproximadamente 9 ml de soro. Foram produzidos 3 ml de anti-soro dialisado para a segunda e sétima sangrias e 1 ml de látex sensibilizado nas nove diferentes diluições de cada anti-soro.

O esquema de imunização variou em relação a outros trabalhos quanto à concentração de antígeno utilizado (10^9 a 3×10^{11} UFC/ml), número de injeções (7 a 10) e local de aplicação (intramuscular, subcutânea ou a combinação destas) (DE BOER et al., 1979; POWELSON e APPLE, 1984; DICKEY et al., 1984). Porém, Não se observaram problemas de intoxicação nos coelhos imu-

nizados, o que, segundo DE BOER et al. (1979), é comum no gênero *Pectobacterium*.

O método utilizado por FRIBOURG (1981), para sensibilização de látex com gama-globulina na identificação de viroses, foi adequado para a detecção de *Pectobacterium* spp. nos experimentos realizados nesse trabalho.

Título dos anti-soros - O título obtido para os anti-soros Pcc, Pca e Pch na segunda sangria, foi de 1: 640. Na sétima sangria foi de 1:640 para os anti-soros Pcc e Pch e 1:320 para Pca. Foi possível detectar o antígeno, partindo-se da concentração padrão (62,5% T; 550 nm), até a diluição 1:100. Entretanto, as melhores reações ocorreram nas diluições 1:1 e 1:10.

DE BOER et al. (1979) produziram anti-soros com células não tratadas e células fixadas com gluteraldeído, obtendo títulos que variaram em ambos os tratamentos entre 1:256 e 1:16384. As diferenças em títulos, segundo os autores, devem-se à variação na sensibilidade dos animais e não às diferenças antigênicas das estirpes bacterianas. De acordo com DE BOER e KELMAN (2001), anti-soros policlonais produzidos a partir de células fixadas com gluteraldeído contém, normalmente, um título elevado de anticorpos para lipopolissacarídeos e são muito úteis para tipificação sorológica.

Os títulos dos anti-soros produzidos neste trabalho apresentaram-se acima do padrão mínimo (1:512) estabelecido por SLACK e BALL (1990). Porém, foram inferiores aos títulos alcançados por DE BOER et al. (1979), devido à diferença do método utilizado para padronização dos anti-soros. DE BOER et al. (1979) utilizaram a técnica de microprecipitação e determinaram os títulos considerando somente a diluição dos anti-soros em relação ao inóculo padrão utilizado para imunização. No presente trabalho o inóculo padrão foi diluído até 1:10000 em tampão Tris-HCl 0,05 M; pH 8,0 mais 1% mercaptoetanol e o título determinado pela reação característica do teste de aglutinação de látex, na mais elevada diluição do antígeno.

Especificidade dos anti-soros - Os anti-soros obtidos reagiram especificamente com os antígenos utilizados, não se obtendo reações cruzadas entre os mesmos. Do mesmo modo não houve reações positivas nos testes realizados com plantas de batata, tomateiro e fumo, bem como para antígenos de fungos, bactérias e vírus fitopatogênicos. Os resultados obtidos concordam com ALLAN e KELMAN (1977), que avaliaram a especificidade de um anti-soro produzido para *P. c. subsp. atrosepticum* em relação a 16 isolados do gênero *Pectobacterium* e 60 isolados de outras espécies de bactérias.

VRUGGINK e MAAGEESTERANUS (1975) utilizando anti-soros para *P. c. subsp. atrosepticum* não encontraram reações positivas com *P. chrysanthemi*, nem com estirpes do gênero *Erwinia*, tais como *E. Amylovora* e *E. herbicola*. Entretanto, um grande número de isolados de *P. c. subsp. carotovorum* reagiu positivamente com anti-soros para *P. c. subsp. atrosepticum* em testes de aglutinação (30), tanto quanto em testes de difusão dupla em ágar (35). Posteriormente DE BOER et al. (1979) confirmaram estarem Pcc e Pca sorologicamente relacionadas. Atualmente são conhecidos mais de quarenta sorogrupos (DE BOER e KELMAN, 2001).

Apesar da alta proporção de antígenos serem comuns tanto para Pca como para Pcc, a especificidade é conferida por componentes da parede celular, principalmente, lipopolissacarídeos (antígeno O). Dos nove sorogrupos de Pca, baseado em antígeno de superfície, o sorogrupo I representa mais de 90% dos isolados da maioria dos países onde foi testado (DUARTE e EL TASSA, 2003).

Procedimentos sorológicos são úteis para a identificação preliminar de culturas bacterianas purificadas ou presentes em amostras de planta ou solo, se anticorpos específicos aos sorogrupos, ao qual pertencem as estirpes bacterianas, estiverem presentes. Os lipopolissacarídeos são importantes determinantes antigênicos para a maioria

das bactérias Gram negativas incluindo as pectobactérias e, deste modo, os anticorpos podem ser utilizados para diferenciar as estirpes. No entanto, a utilidade da sorologia para identificar pectobactérias em nível de espécies e/ou subespécies é limitada, devido à existência de muitos sorogrupos.

A utilização de anti-soros para pectobactérias de diferentes sorogrupos pode ser útil em trabalhos ecológicos. No Rio Grande do Sul, de 408 isolados obtidos em um levantamento de pectobactérias associadas à canela preta em lavouras de batata, 224 foram consideradas como Pca, 173 como Pcc e 8 como Pch. No entanto, diversos isolados foram considerados variantes de Pcc e Pca, pelos testes bioquímicos e fisiológicos (OLIVIERA, 2001). A ocorrência de formas intermediárias, com características bioquímicas e fisiológicas comuns a Pca, Pcc e Pch, também tem sido relatada por outros autores (STANGHELLINI e MENELEY, 1975; THOMSON et al. 1981; JABOUNSKI, et al.1986), e a caracterização destas estirpes em sorogrupos pode facilitar os trabalhos ecológicos.

CONCLUSÕES

Os anti-soros produzidos para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* e *Pectobacterium chrysanthemi*, a partir de células inteiras e não tratadas, apresentaram especificidade em relação ao antígeno utilizado para imunização de coelhos e apenas antígenos presentes nas estruturas celulares de Pca, Pcc e Pch são identificados pelos anticorpos produzidos.

Seguindo-se a metodologia utilizada para produção de anti-soros para Pca, Pcc e Pch, o teste de aglutinação de látex pode ser realizado com diluições do antígeno nas proporções de 1:1 e 1:10 (antígeno/solução tampão), partindo-se da concentração padrão $6 \text{ a } 7 \times 10^7$ UFC/ml (62,5%T; 550 nm).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, E.; KELMAN, A. Immunofluorescent stain procedures for detection and identification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Phytopathology*, St. Paul, v.67, p.1305-1312, 1977.
- BALL, E.M.; HAMPTON, R.O.; DE BOER, S.; SCHAAD, N. Polyclonal antibodies. In: HAMPTON, R.; BALL, E.; DE BOER, S. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. St. Paul: APS, 1990. p.33-54.
- BURR, T.J.; SCHROTH, M.N. Occurrence of soft-rot *Erwinia* spp. in soil and plant material. *Phytopathology*, St. Paul, v.67, p.1382-1387, 1977.
- CUPPLES, D.; KELMAN, A. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology*, St. Paul, v.64, n.4, p.468-475, 1974.
- DE BOER, S.H.; KELMAN, A. *Erwinia* soft rot group. In: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. (Eds.) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. St. Paul: APS, 2001. p.56-72.
- DE BOER, S.; COPEMAN, R.; VRUGGINK, H. Serogroups of *Erwinia carotovora* potato strains determined with diffusible somatic antigens. *Phytopathology*, St. Paul, v.69, n.4, p.316-319, 1979.
- DICKEY, R.; ROBERT, S.; ZUMOFF, C.H.; UYEMOTO, J.K. *Erwinia chrysanthemi*: serological relationship among strains from several hosts. *Phytopathology*, St. Paul, v.74, n.11, p.1388-1394, 1984.
- DUARTE, V.; EL TASSA, S.O.M. Taxonomia do gênero *Pectobacterium*. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESSES, A.M.; PICCININI, E.C. (Eds.) *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo, v.11, p.1-37, 2003.
- FRIBOURG, C. *Procedure for látex sensitisation*. Lima: Centro Internacional de la Papa, 1981. 4 p. (Laboratory Practical Guide).
- HAUBEN, L.; MOORE, E.R.B.; 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.
- JABUONSKI, R.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F. Avaliação da patogenicidade de bactérias do gênero *Erwinia* isoladas de batatinha, tomateiro e de outras plantas hospedeiras. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.11, p.587-597, 1986.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, p.969-976, 1970.
- OLIVEIRA, A.M.R. Incidência e variabilidade genética de erwinias pectolíticas associadas à Canela Preta em lavouras de batata no Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 83p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 2001.
- PEROMBÉLON, M.; KELMAN, A. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: proposal for revision of terminology. *Plant Disease*, St. Paul, v.71, n.3, p.283-285, 1987.
- PEROMBÉLON, M.; KELMAN, A. Ecology of the soft rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.18, p.361-387, 1980.
- POWELSON, N.; APPLE, J. Soil and seed tubers as sources of inoculum of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* for stem soft rot of potatoes. *Phytopathology*, St. Paul, v.74, p.429-432, 1984.
- SALMOND, G.P.C. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.32, p.181-200, 1994.
- SCHAAD, N.W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 2.ed. St. Paul: APS, 1988. 164 p.
- SLACK, S.A.; BALL, E.M. Latex agglutination for viruses and bacteria. In: HAMPTON, R.; BALL, E.; DE BOER, S. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. St. Paul: APS, 1990. p.307-312.
- STANGHELINI, M.E.; MENELEY, J.C. Identification of soft-rot *Erwinia* associated with blackleg in Arizona. *Phytopathology*, St. Paul, v.65, n.1, p.86-87, 1975.
- TAKATSU, A.; MELLO, S.; GARCIA, E.J. Fruto do pimentão como meio parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. *Fitopatologia Brasileira*, v.6, p.550-551, 1981.
- THOMSON, S.V.; HIDELBRAND, D.C.; SCHROTH, M.N. Identification and nutritional differentiation of the *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology*, St. Paul, v.71, n.6, p.1037-1042, 1981.
- VRUGGINK, H.; MAAGEESTERANUS, H. Serological recognition of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, the causal organism of potato blackleg. *Potato Research*, Wagenigen, v.18, p.546-555, 1975.