

# **Boletim de Pesquisa 236** **e Desenvolvimento**

ISSN 1676 - 340

Dezembro, 2008



**Adequação de técnicas  
moleculares imuno-enzimáticas para  
a diagnose da bacteriose  
da goiabeira**

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

## **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 236**

### **Adequação de técnicas molecular-imuno-enzimáticas para o diagnóstico de *Erwinia psidii* em goiabeira**

Claudênia F. Silva  
Naiara Pontes D. Oliveira  
Priscila Torres

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

**Presidente:** *Miguel Borges*

**Secretária-Executiva:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** *Diva Maria de Alencar Dusi*

*Luiz Adriano Maia Cordeiro*

*José Roberto de Alencar Moreira*

*Regina Maria Dechechi G. Carneiro*

*Samuel Rezende Paiva*

**Suplentes:** *João Batista Tavares da Silva*

*Margot Alves Nunes Dode*

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Normalização Bibliográfica:** *Rosameres Rocha Galvão*

**Editoração eletrônica:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2008):

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

---

A 232 Adequação de técnicas moleculares imuno-enzimáticas para a diagnose da bacteriose da goiabeira / Claudênia F. Silva... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.  
- p. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 236).

1. *Erwinia psidii* - bacteriose. 2. Goiaba. I. Silva, Glauênia F. II. Série.

634.421 – CDD 21

---

©Embrapa 2008

# Adequação de técnicas molecular-imuno-enzimáticas para o diagnóstico de *Erwinia psidii* em goiabeira

---

Claudênia F. Silva<sup>1</sup>

Naiara Pontes D. Oliveira<sup>2</sup>

Priscila Torres<sup>3</sup>

Marisa Álvares S.V. Ferreira<sup>4</sup>

Abi S. A. Marques<sup>5</sup>

## Resumo

A produção de goiaba no Brasil é afetada pela seca-dos-ponteiros, uma das principais doenças da cultura causada pela bactéria *Erwinia psidii*, cuja disseminação é favorecida por mudas contaminadas. O desenvolvimento de métodos diagnósticos mais eficazes poderia reduzir a disseminação da bactéria nas áreas produtoras. O objetivo desse trabalho foi otimizar os métodos imunocaptura-PCR (IC-PCR) e PCR-ELISA, que aliam o princípio e algumas etapas da técnica sorológica ELISA à técnica molecular PCR, os quais preconizam aumentar a eficiência da detecção. Para a IC-PCR, foi utilizado o antissoro policlonal As15.1, produzido contra a estirpe-tipo da bactéria IBSBF 435, previamente avaliado quanto à sua eficiência e especificidade. A IC-PCR constou dos seguintes passos: diluição do antissoro, sensibilização da microplaca de polipropileno, adição das suspensões bacterianas em diferentes concentrações e realização da PCR, utilizando-se, tanto os iniciadores E65L/E301R quanto Ep2L/Ep2R, desenhados para detecção específica de *E. psidii*. A PCR-ELISA constou dos seguintes passos: realização da PCR e verificação das amplificações em gel de agarose; hibridação do produto PCR com a sonda marcada com digoxigenina (DIG); adição da sonda marcada com biotina à placa sensibilizada com estreptavidina; adição da solução contendo o produto da hibridação à placa; adição do conjugado contendo o anticorpo anti-DIG marcado à peroxidase; adição do substrato revelador da peroxidase; repouso para desenvolvimento da cor e leitura do resultado. A melhor diluição do antissoro para a imunocaptura foi de 1:200, obtendo-se amplificação até a concentração de  $10^4$  ufc/mL da suspensão bacteriana. O método foi avaliado para detecção de *E. psidii* em folhas de goiabeira inoculadas com diferentes concentrações da bactéria. Inicialmente não se obteve amplificação, indicando a possível presença de inibidores da PCR, provavelmente os taninos

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, Faculdades Juscelino Kubitschek (JK)

<sup>2</sup> Eng Agr., graduanda, Universidade de Brasília (UnB)

<sup>3</sup> Eng Agr., Universidade de Brasília (UnB)

<sup>4</sup> Eng. Agr., D.Sc., Universidade de Brasília (UnB)

<sup>5</sup> Eng. Agr., D.Sc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

existentes nas folhas de goiabeira. O problema foi resolvido com uso de tampão de extração contendo antioxidantes. O método da revelação colorimétrica dos produtos de PCR não foi completamente otimizado, em parte pela dificuldade na aquisição dos produtos e reagentes. Os ensaios realizados, entretanto, indicam perspectivas promissoras na utilização da mesma, juntamente com a IC-PCR, para o diagnóstico precoce da bacteriose da goiabeira.

## Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>4</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>7</b>
<b>Material e Métodos .....</b>	<b>8</b>
<b>Conclusões .....</b>	<b>13</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>10</b>
<b>Referências .....</b>	<b>14</b>

## Introdução

A bacteriose da goiabeira causada por *Erwinia psidii* encontra-se disseminada em seis estados brasileiros e atinge 52,6% dos pomares no Distrito Federal (MARQUES et al., 2007). A detecção da bactéria é realizada a partir de plantas sintomáticas, através do isolamento direto de tecidos de brotos, nervuras de folhas ou pedúnculos de frutos mumificados. Por sua vez, a certificação de mudas é baseada na análise visual das plantas quanto ao aparecimento de sintomas, o que é subjetivo. Levando-se em conta que mudas contaminadas, mas aparentemente saudáveis, apresentarão sintomas da bacteriose após dois anos de sua instalação no pomar, a análise visual não garante a aquisição de mudas livres de *E. psidii*. Desta maneira, são necessários outros métodos de detecção mais eficientes e sensíveis.

Os métodos sorológicos empregam anticorpos policlonais ou monoclonais sendo bastante utilizados na diagnose de fitobacterioses. As técnicas mais utilizadas são as imuno-enzimáticas, onde os antígenos são imobilizados sobre um suporte e revelados com a ajuda de anticorpos marcados ou não (AVRAMEAS, 1969).

A PCR (amplificação *in vitro* de seqüências conhecidas ou não de DNA) tem sido amplamente utilizada em estudos de caracterização da diversidade genética e detecção de bactérias fitopatogênicas (LOUWS et al., 1999; MARQUES et al., 2000; TRINDADE et al., 2005). Métodos diagnósticos baseados em PCR apresentam várias vantagens em relação aos demais, entre elas a alta sensibilidade, permitindo reduzir o limiar de detecção dos fitopatógenos.

Cada uma dessas técnicas apresenta suas limitações, mas a combinação das mesmas pode melhorar a performance do diagnóstico. A combinação imunologia e PCR gera a imunocaptura-PCR (IC-PCR) o torna a detecção mais simples e mais sensível (KHOODOO et al., 2005). Outras formas de detecção dos produtos amplificados, que não somente as eletroforeses em gel de agarose, podem reduzir os efeitos falso-positivo ou negativo. Esse é o princípio da técnica PCR-ELISA onde a detecção dos produtos de PCR se faz por uma reação imuno-enzimática (MERIGHI et al., 2000; LEPOIVRE, 2003).

O objetivo deste trabalho foi otimizar os métodos conhecidos como imunocaptura-PCR (IC-PCR) e PCR-ELISA, visando aumentar a eficiência da detecção de *E. psidii*. Esses métodos aliam o princípio e algumas etapas da técnica sorológica ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) à técnica molecular PCR (reação em cadeia da polimerase) e preconizam melhorar a eficácia do diagnóstico.

## Material e Métodos

### Antissoro e isolados bacterianos

Foi utilizado o antissoro policlonal As15.1, produzido contra a estirpe-tipo da bactéria IBSBF 435, avaliado previamente quanto à sua eficiência e especificidade e testado na identificação de diversos isolados de *E. psidii*. Os isolados bacterianos utilizados nos testes foram Emb.A18-7, proveniente do DF e, como referência o isolado-tipo, acima mencionado.

### Imunocaptura PCR (IC-PCR)

O protocolo geral da IC-PCR constou dos passos seguintes: sensibilização da microplaca de polipropileno, com 100 µL de antissoro diluído no tampão de cobertura na proporção 1:200 (diluição definida em ensaio preliminar) por 3 h a 37°C; preparo da amostra no tampão de extração, seja suspensão de células ou extrato de folhas; lavagem da microplaca com PBS-Tween 0,2%; adição das suspensões da amostra nas diferentes concentrações à microplaca sensibilizada; nova incubação a 37°C por 3 h; nova lavagem das microplacas com PBS-Tween; adição da mistura da PCR, utilizando-se os iniciadores E65L/E301R ou Ep2L/Ep2R; realização da PCR em termociclador MJ Research PT-100 ou Eppendorf Mastercycler (condições específicas para cada par de iniciadores utilizado) e eletroforese dos produtos PCR em gel de agarose a 1%. Foram avaliadas as diluições do antissoro 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400. Alternativamente, o ensaio foi repetido e os períodos de três horas em estufa a 37°C foram substituídos por permanência de 12-16 h em geladeira. As condições de PCR foram as seguintes: 1 µM de cada iniciador Ep2L/Ep2R ou E65L/E301R, 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub> (1,25 mM para Ep2L/Ep2R) 200 µM de cada dNTP (250 µM para Ep2L/Ep2R), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, tampão da enzima 1x em um volume final de 25 µL. O programa de amplificação foi o seguinte: 95°C/3 min, 32 ciclos de 94°C/1 min, 62°C/1 min (56 °C para Ep2L/Ep2R) e 72°C/2 min finalizando com 72°C/5 min. DNA purificado do isolado Emb.A18-7 foi usado como controle positivo da PCR. A extração do DNA genômico desse isolado foi realizada utilizando-se o kit Promega (Wizard Genomic, DNA Purification Kit) após prévia multiplicação da cultura em meio 523 líquido por, aproximadamente, 18 h a 28°C. Ao final do processo de extração, o DNA resultante foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop Spectrophotometer ND-100) obtendo-se 1.607,0 ng/µL, dissolvido em água purificada estéril (Milli Q) e diluído para a concentração de 10 ng/µL. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

No processo de otimização da técnica foram realizados três ensaios:

**Ensaio 1** - avaliação preliminar do método utilizando-se *E. psidii* em cultura pura. Foi preparada uma suspensão da bactéria, multiplicada no meio 523 por 48 h, a qual foi ajustada para, aproximadamente, 10<sup>8</sup> ufc/mL, correspondendo a uma transmitância de 8% a um comprimento de onda de 590 nm (Espectrofotômetro digital Jasco, V-530). Foram feitas diluições seriadas da suspensão, de 10<sup>8</sup> a 10 ufc/mL e preparadas duas reações PCR por diluição. Seguindo-se o



protocolo acima descrito, as suspensões bacterianas foram aplicadas à placa previamente sensibilizada. A partir dessa etapa do trabalho, duas reações de PCR com DNA purificado foi usado em todos os ensaios como controle positivo.

**Ensaio 2** - detecção de *E. psidii* em folhas inoculadas. Folhas de brotações novas de goiabeira cv. Paluma, mantidas em casa de vegetação, foram inoculadas com suspensão bacteriana do isolado Emb.A18-7, nas concentrações de  $10^3$ ,  $10^5$  e  $10^7$  ufc/mL, estabelecendo-se cinco repetições por tratamento. Sete dias após as inoculações, amostras foram coletadas para análise por IC-PCR. Foi necessário repetir o ensaio duas vezes, alterando-se a forma de preparo da amostra: 1- folhas fortemente esmagadas com auxílio de pistilo de porcelana; 2- folhas levemente esmagadas com auxílio de homogeneizador (Stomacher Bag Mixer, Intercience) por 30 s. Nos dois casos usou-se o tampão de extração PBS-Tween 0,2% na proporção de 2 mL/g de tecido. O líquido resultante foi diluído em série e foram realizados plaqueamentos para contagem da população bacteriana, assim como IC-PCR. As diferentes formas de preparo da amostra foram feitas subsequentemente, após cada realização da PCR e verificação da ausência de amplificação pelo método anteriormente aplicado.

**Ensaio 3** - detecção de *E. psidii* em folhas com suspensão bacteriana. Após a realização do ensaio anterior, verificou-se que a população bacteriana nas folhas inoculadas não apresentava homogeneidade. Foi instalado este terceiro ensaio, utilizando-se folhas sadias de goiabeira, às quais se adicionou suspensão bacteriana de concentração conhecida, na mesma proporção de 2 mL/g de tecido (TEIXEIRA et al., 2008). As amostras foram preparadas de duas formas: 1- por esmagamento leve das folhas em contato com a suspensão bacteriana com auxílio do homogeneizador (Stomacher Bag Mixer, Intercience) por 30 s. 2- folhas não esmagadas, mas colocadas em contato com a suspensão sob agitação a 140 rpm, por 30 min. Os passos seguintes foram idênticos aos do ensaio 2: após esmagamento ou lavagem, diluição, plaqueamento e IC-PCR. Após verificar-se que não havia amplificação nas amostras resultantes de folhas esmagadas, o tampão de extração utilizado nos ensaios anteriores foi substituído pelo tampão contendo sulfito de sódio (1,3 g/L), PVP (polivinilpirrolidone MW 24-40.000) (20 g/L), azida sódica (0,2 g/L), albumina de ovo (2,0 g/L) e Tween 20 (20 g/L).

#### **Revelação colorimétrica dos produtos da PCR (PCR-ELISA)**

A PCR-ELISA foi conduzida com auxílio do kit "*PCR-ELISA DIG detection*" (Boehringer Mannheim GmbH) e constou dos seguintes passos: realização da PCR e verificação da presença de amplificações em gel de agarose; hibridação do produto PCR com a sonda marcada com digoxigenina (DIG), por 3 h em banho-maria a 52°C, usando-se o iniciador Ep2L, marcado em 3'; adição da sonda marcada com biotina em 5', (sonda de captura, iniciador Ep2R) à placa sensibilizada com estreptavidina; adição da solução contendo o produto de hibridização à placa; adição do conjugado contendo o anticorpo anti-DIG marcado à peroxidase; adição do substrato revelador da peroxidase (10 mM dietanolamine – HCl, pH 9,5 + 0,7 mg/mL de PNPP); repouso

para desenvolvimento da cor e leitura do resultado (MARINHO et al., 2003). Considerando ser esta a primeira tentativa de utilização da técnica neste laboratório, o procedimento foi realizado com DNA purificado e em quantidades diferentes por reação, de 0,03 a 10 ng/reação. Foram usados dois controles negativos, o da PCR (amplificação com água em lugar da amostra) e o da revelação (usando-se água em lugar do produto PCR). Foi utilizado o controle positivo fornecido no kit.

## Resultados

**IC-PCR** - A melhor diluição do antissoro para a imunocaptura foi de 1:200. No primeiro ensaio *E. psidii* foi detectada por IC-PCR até a concentração de  $10^5$  ufc/mL (Figura 1), a partir de suspensões de cultura pura da bactéria.

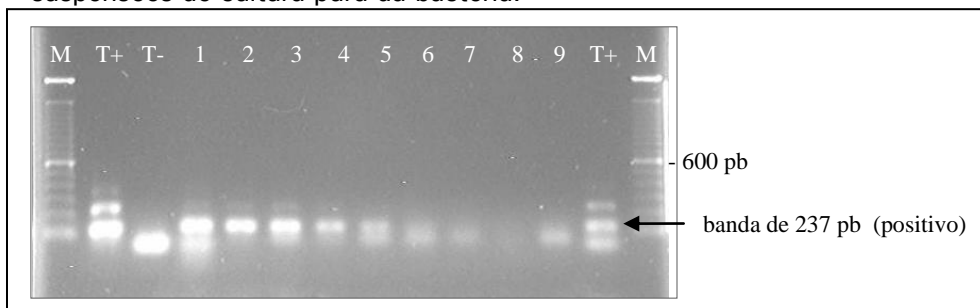


Figura 1 – Avaliação da IC-PCR para detecção de *Erwinia psidii*, utilizando-se suspensões de cultura pura da bactéria e os iniciadores E65L/E301R: pistas 1 a 9, correspondem a suspensões nas concentrações de  $10^9$  a  $10^5$  ufc/mL. Controles positivos (T+) utilizando-se DNA purificado da bactéria. Marcador de 100 pb.

No segundo ensaio, o método foi avaliado para detecção de *E. psidii* em sistema complexo, utilizando-se folhas jovens de goiabeira inoculadas com diferentes concentrações da bactéria. Esse experimento não apresentou resultados uniformes e as contagens mostraram populações bacterianas não consistentes com as inoculações. Entretanto, foram feitas observações, utilizadas posteriormente no decorrer do trabalho. Observou-se, nas duas primeiras formas de extração por esmagamento acentuado e leve, que houve deposição de um pigmento escuro resultante da rápida oxidação ocorrida após o esmagamento das folhas de goiabeira, nas microplacas e não houve amplificação em nenhum dos casos. Passou-se, então, à terceira forma de extração, pela lavagem das folhas por agitação simples, que apresentou resultado positivo (Figura 2). A IC-PCR foi repetida com os três extratos, realizando em paralelo o mesmo procedimento com suspensão bacteriana. Concluiu-se que poderia ter havido inibição da PCR por componentes do extrato das folhas, provavelmente a grande quantidade de taninos existentes nas folhas de goiabeira, além das discrepâncias na população bacteriana presente (Figura 3). O terceiro ensaio foi realizado para completar a otimização do método, sem a interferência da não homogeneidade das folhas inoculadas. Optou-se por utilizar folhas sadias de goiabeira, às

quais se adicionou suspensão bacteriana de concentração conhecida. As amostras foram preparadas por esmagamento leve das folhas em contato com a suspensão bacteriana em homogeneizador. Os resultados da enumeração das populações bacterianas foram consistentes com a concentração das suspensões utilizadas, mas persistiu a ausência de amplificação nas amostras obtidas de folhas esmagadas, mesmo que levemente. O resultado positivo foi obtido na repetição do procedimento utilizando-se o tampão contendo sulfito de sódio, PVP, azida sódica e albumina, havendo amplificação no lote de amostras processadas com esse tampão (Figura 4).

**PCR-ELISA** - O método da revelação colorimétrica dos produtos de PCR não foi completamente otimizado, em parte pela dificuldade na aquisição dos produtos e reagentes. Os ensaios realizados, entretanto, indicam perspectivas promissoras na utilização da mesma, juntamente com a IC-PCR, para o diagnóstico precoce da bacteriose da goiabeira (Figura 5). Observa-se que, embora nenhuma das reações tenha reagido positivamente, há ligeiro desenvolvimento de cor, mas nas menores concentrações do DNA da bactéria na reação PCR.

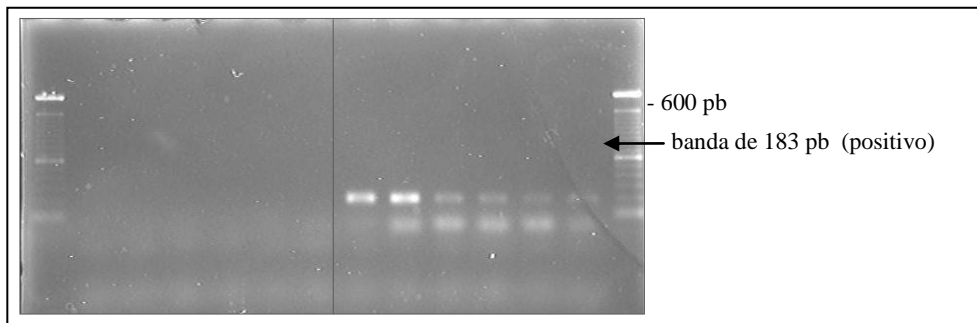


Figura 2 – Comparação entre métodos de extração de *Erwinia psidii* de folhas de goiabeira para detecção por IC-PCR, com os iniciadores E65L/E301R: pistas 1 a 6 correspondem a amostras de folhas esmagadas em contato com a suspensão bacteriana e de 7 a 12 a folhas lavadas. As concentrações bacterianas são 10<sup>7</sup> (pistas 7 e 8), 10<sup>6</sup> (pistas 9 e 10) e 10<sup>5</sup> (pistas 11 e 12). Marcador de 100 pb.

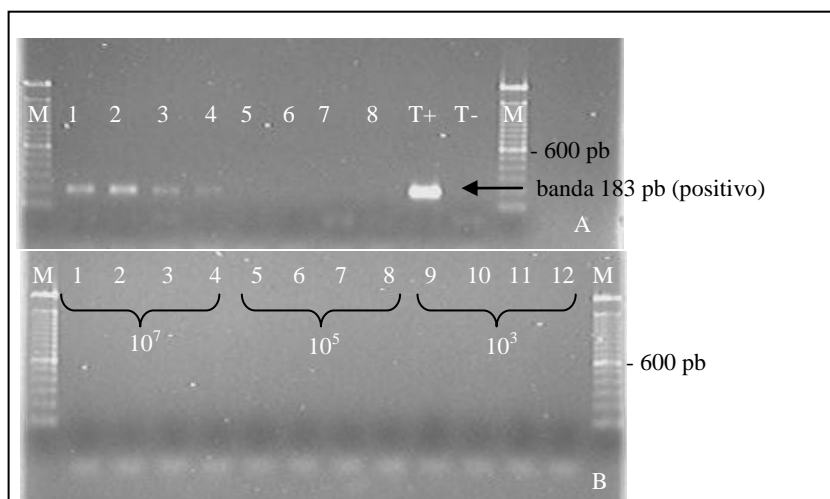


Figura 3 – Comparação da IC-PCR para detecção de *Erwinia psidii*: A - utilizando-se suspensões de cultura pura da bactéria e os iniciadores Ep2L/Ep2R. Pistas 1 a 8, correspondem a suspensões nas concentrações de  $10^8$  a  $10^0$  ufc/mL. B – utilizando-se extratos de folhas inoculadas, na concentração original e diluída 10x. Pistas 1 a 12 correspondem às concentrações  $10^7$ ,  $10^5$  e  $10^3$  ufc/mL diluições 0 e  $10^{-1}$ , duas pistas por diluição, quatro pistas por concentração bacteriana. Controle positivo (T+) utilizando-se DNA extraído da bactéria. Marcador de 100 pb.

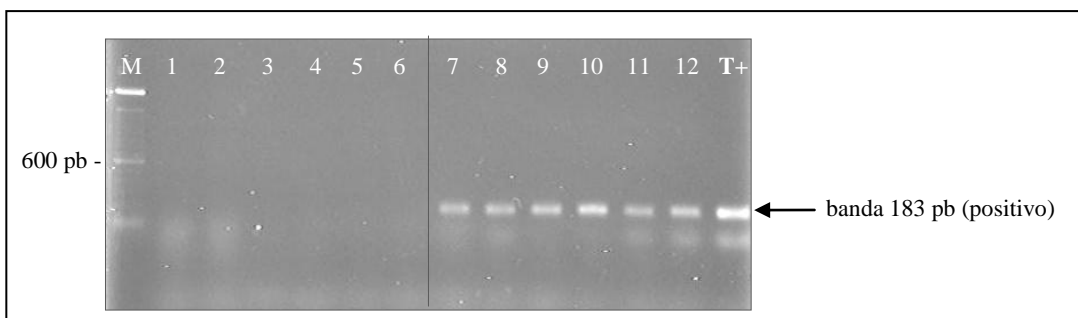


Figura 4 – Otimização da IC-PCR para detecção de *Erwinia psidii*, utilizando-se dois tipos de tampão de extração para preparo das amostras e os iniciadores Ep2L/Ep2R: pistas 1 a 6, correspondem às amostras preparadas em PBST e 7 a 12, amostras preparadas no tampão contendo sulfito de sódio, PVP, azida sódica e albumina. Controle positivo utilizando-se DNA extraído da bactéria. Marcador de 100 pb.

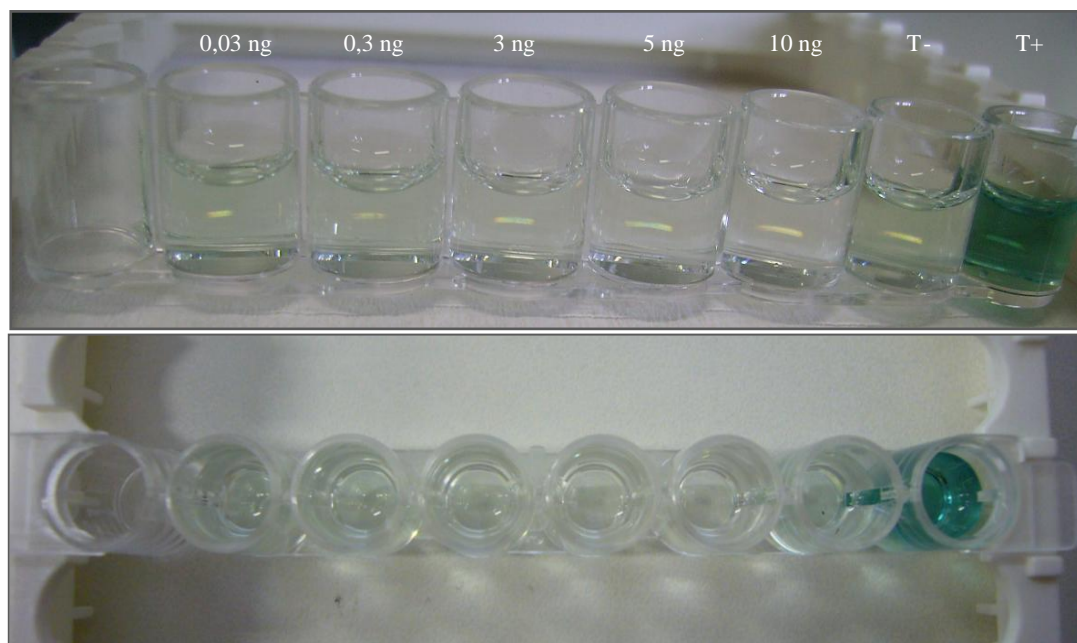


Figura 5 – Revelação colorimétrica da PCR com DNA purificado de *Erwinia psidii* e os iniciadores Ep2L/Ep2R. Da esquerda para a direita, reações de PCR realizadas com quantidades crescentes de DNA do isolado Emb.A18-7, expresso em ng DNA/reacção. T + : controle positivo, T-: controle negativo da revelação.

## Conclusões

A primeira etapa da adequação da IC-PCR para detecção de *E. psidii* foi concluída, observando-se os parâmetros seguintes: a melhor diluição do antissoro utilizado (As15.1) para a imunocaptura foi de 1:200, sendo que é necessário testar essa diluição a cada lote de antissoro obtido; o limiar de detecção permaneceu em torno de  $10^4$  ufc/mL da bactéria pura em suspensão; a eficácia da utilização do método, para detecção de *E. psidii* em folhas de goiabeira, depende da utilização de um tampão de extração que contorne a presença de inibidores da PCR no extrato de folhas. Acredita-se que a revelação colorimétrica da PCR (PCR-ELISA) seja um método promissor, por ser muito mais sensível que a utilização de géis de agarose para a visualização dos produtos da PCR. Esse método traz ainda a vantagem de não empregar brometo de etídio (EtBr), altamente tóxico, utilizado na coloração dos fragmentos de DNA nos géis de agarose. Mesmo com a conclusão do projeto, os ensaios para a otimização da técnica deverão ter continuidade, visando quantificar o desempenho da mesma e a elaboração de um protocolo operacional para o diagnóstico da seca dos ponteiros da goiabeira.

## Referências

- AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde, use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. **Immunochemistry**, Oxford, GB, v. 6, p. 43-52, 1969.
- KHOODOO, M. H. R.; SAHIN, F.; JAUFEEERALLY FAKIM, Y. Sensitive detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* on *Anthurium andreanum* by immunocapture-PCR (IC-PCR) using primers designed from sequence characterized amplified regions (SCAR) of the blight pathogen. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, NL, v. 112, p. 379-390, 2005.
- LEPOIVRE, P. (Ed.). **Phytopathologie**: bases moléculaires et biologiques des pathosytèmes et fondamentes des stratégies de lutte. 1. ed. Bruxelles: De Boeck & Larcier, 2003. 427 p.
- LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, US, v. 37, p. 81-125, 1999.
- MARINHO, V. L. A.; DANIELS, J.; KUMMERT, J.; CHANDELIER, A.; LEPOIVRE, P. RT-PCR-ELISA for detection of *Apple stem grooving virus* in apple trees. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, p. 374-379, 2003.
- MARQUES, A. S. A.; COELHO, M. V. S.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, J. P.; MENDES, A. P.; VIEIRA, T. M. Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, BA, v. 29, p. 488-493, 2007.
- MARQUES, A. S. A.; CORBIÈRE, R.; GARDAN, L.; TOURTE, C.; MANCEAU, C.; TAYLOR, J. D.; SAMSON, R. Multiphasic approach for the identification of the different classification levels of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, NL, v. 106, p. 715-734, 2000.
- MERIGHI, M.; SANDRINI, A.; LANDINI, S.; GHINI, S.; GIROTTI, S.; MALAGUTI, S.; BAZZI, C. Chemiluminescent and colorimetric detection of *Erwinia amylovora* by immunoenzymatic determination of PCR amplicons from plasmid pEA29. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 84, p. 49-54, 2000.
- TEIXEIRA, A. C. O.; FERREIRA, M. A. S. V.; MARQUES, A. S. A. Detecção de *Erwinia psidii* via enriquecimento em extrato de folhas de goiabeira e imunodifusão radial dupla. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, p. 212-218, 2008.
- TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 46-54, 2005.