



**SANDRA VALÉRIA DIAS CARDOSO**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE  
PODRIDÕES MOLES DE OCORRÊNCIA NOS ESTADOS DO  
PARÁ E MINAS GERAIS**

**LAVRAS - MG  
2019**

**SANDRA VALÉRIA DIAS CARDOSO**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE PODRIDÕES MOLES DE  
OCORRÊNCIA NOS ESTADOS DO PARÁ E MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia/Fitopatologia, área de  
concentração em Fitopatologia, para a  
obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza  
Orientador

Dra. Alessandra Keiko Nakasone Ishida  
Coorientadora

**LAVRAS - MG  
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pela própria autora.**

Cardoso, Sandra Valéria Dias.

Identificação de bactérias causadoras de podridões moles de  
ocorrência nos Estados do Pará e Minas Gerais / Sandra Valéria  
Dias Cardoso. - 2019.

59 p.

Orientador: Ricardo Megela de Souza.

Coorientadora: Alessandra Keiko Nakasone Ishida.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Bactérias pectinolíticas. 2. Filogenia. 3. Testes bioquímicos.  
I. de Souza, Ricardo Megela. II. Ishida, Alessandra Keiko  
Nakasone. III. Título.

**SANDRA VALÉRIA DIAS CARDOSO**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE PODRIDÕES MOLES DE  
OCORRÊNCIA NOS ESTADOS DO PARÁ E MINAS GERAIS  
IDENTIFICATION OF BACTERIA CAUSING SOFT ROT OCCURRING IN PARÁ  
AND MINAS GERAIS STATES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia/Fitopatologia, área de  
concentração em Fitopatologia, para a  
obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 01 de março de 2019.

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza UFLA  
Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros UFLA  
Prof. Dr. Cesar Augusto Brasil Pereira Pinto UFLA  
Dr. Daniel Henrique Ribeiro

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza  
Orientador

Dra. Alessandra Keiko Nakasone Ishida  
Coorientadora

**LAVRAS - MG  
2019**

*Aos meus amados pais, Maria Cardoso e Valfredo Soares (In Memoriam),*

*Ao meu avô, Manoel Ramos, meu maior exemplo de garra,*

*À minha avó de coração, Elizabete Soares,*

*Meus grandes inspiradores e incentivadores.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer presente em minha vida, me concedendo sabedoria, discernimento, força e consolo nos momentos difíceis, pois diante de cada obstáculo o seu nome era clamado e as minhas orações eram atendidas ao seu tempo. Sou grata a Ele por cada oportunidade e conquista alcançada.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade concedida.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos repassados e dedicação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Magela, pela confiança, compreensão e assistência na elaboração deste trabalho.

À Dra. Alessandra Ishida, pela co-orientação, conhecimentos transmitidos, confiança, paciência, e por me conceder a oportunidade de retornar ao laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental para executar uma parte do trabalho.

Aos técnicos e estagiários do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, pelos vários momentos de alegria e aprendizado. Em especial à técnica Clenilda Tolentino, pela ajuda nos experimentos, ensinando e auxiliando.

Aos colegas de Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia, em especial à Ana Maria, por toda ajuda nas práticas laboratoriais e pelas palavras de força e fé nos momentos difíceis. Obrigada por ser essa pessoa acolhedora.

À Bruna Pozzebon, pela sua contribuição nas correções e trocas de ideias.

À Sarah Costa, pela paciência, assistência e ensinamentos transmitidos.

Aos técnicos e estagiários do laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental, pela paciência e disponibilidade dos equipamentos sempre que necessário.

À minha amada mãe, Maria Olanda Dias Cardoso, minha eterna gratidão, a senhora é a minha fortaleza, sem o seu apoio e amor incondicional seria mais difícil suportar cada dificuldade. Mesmo que distante sinto a energia das suas orações direcionadas a mim, elas fazem toda diferença em minha vida.

Ao Aluísio de Lima Jr., por seu amor, sua amizade e companheirismo em todos os momentos, independente da distância. Por você acreditar em mim, fez o possível e o impossível para que eu não desistisse dos meus propósitos, pois você sabe o quanto foi difícil chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Paulo Soares, Waldecy Soares, Lílian Soares e Sandro Soares pelo apoio e incentivo.

À Fabiana Barros, uma amiga que considero como uma irmã, pois guardarei em minha memória todos os momentos em que você me estendeu a mão. Tenho absoluta certeza, que Deus te colocou como um anjo em minha vida aqui em Lavras, e serei eternamente grata a ti.

Às amigas, Sueny França e Thaissa Farias, por me recepcionarem em Lavras e pelas várias dicas de como sobreviver nessa vida de pós-graduação.

A todos aqueles que, embora não nomeados, de alguma forma contribuíram para este trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

As bactérias pectinolíticas causadoras de podridões moles são responsáveis por grandes perdas econômicas no cultivo de uma ampla gama de plantas hospedeiras, tanto no campo como na comercialização, principalmente em regiões de clima quente e úmido. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar diferentes isolados de bactérias causadoras de podridões moles em hortaliças, fruteiras e algumas espécies ornamentais por meio de testes bioquímicos, fisiológicos, moleculares e pelo sequenciamento da região 16S rDNA. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental e no Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA) entre os anos de 2017 e 2018. Foram obtidos 39 isolados de bactérias provenientes de municípios dos Estados do Pará e Minas Gerais. Os testes bioquímicos e fisiológicos realizados foram: Gram, catalase, oxidase, degradação de Pectato, isca biológica em tubérculo de batata e pimentão verde, anaerobiose, crescimento a 37°C em meio NA, crescimento em meio YDC e sensibilidade a eritromicina. Na técnica de reação em cadeia da polimerase foram utilizados os oligonucleotídeos 1491f/L1RA/L1RG para diferenciar *Pectobacterium carotovorum* de *Dickeya chrysanthemi*, Br1f/L1RA/L1RG específicos para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, ERWFOR e CHRREV para identificação da espécie *Dickeya chrysanthemi*. E para o *Nested-PCR*, utilizou-se o par de *primer* EXPCCR/EXPCCF e INPCCR/INPCCF na primeira e segunda reação, respectivamente, para detectar *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Para o sequenciamento da região 16S rDNA foram utilizados os primers 27F e 1492R. No geral, os métodos bioquímicos e moleculares não foram eficientes para a identificação dos isolados. Em contrapartida, pelo sequenciamento da região 16S rDNA foi possível realizar a identificação ao nível de gênero da maioria dos isolados causadores de podridões moles em estudo.

**Palavras-chave:** Testes bioquímicos. Testes fisiológicos. Detecção por PCR. 16S rDNA. Pectinolíticas

## ABSTRACT

The pectinolytic bacteria causing soft rot are responsible for large economic losses in the cultivation of a wide range of host plants, both in the field and in commercialization, especially in hot and humid climate regions. Thus, the present work aimed to identify different isolates of bacteria that cause soft rot in vegetables, fruit trees and some ornamental species using biochemical, physiological, molecular tests and sequencing of the 16S rDNA region. The experiments were performed at the Phytopathology Laboratory of Embrapa Amazônia Oriental and at the Laboratory of Plant Bacteriology of the Federal University of Lavras (DFP / UFLA) from 2017 to 2018. A total of 39 bacterial isolates were obtained from the states of Pará and Minas Gerais. The biochemical and physiological tests were: Gram, catalase, oxidase, Pectate degradation, potato and green pepper rot, anaerobiosis, growth at 37 ° C in NA medium, growth in YDC medium and sensitivity to erythromycin. In the polymerase chain reaction technique, oligonucleotides 1491f / L1RA / L1RG were used to differentiate *Pectobacterium carotovorum* from *Dickeya chrysanthemi*, Br1f / L1RA / L1RG specific for *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, ERWFOR and CHRREV for identification of the species *Dickeya chrysanthemi*. For the Nested-PCR, the primer pair EXPCCR / EXPCCF and INPCCR / INPCCF were used in the first and second reaction, respectively, to detect *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. For the sequencing of the 16S rDNA region primers 27F and 1492R were used. In general, biochemical and molecular methods were not efficient for the identification of the isolates. However, by the sequencing of the 16S rDNA region it was possible to identify the majority of isolates causing soft rot obtained in the study at the genus level.

**Keywords:** Biochemical tests. Physiological tests. PCR detection. 16S rDNA. Pectinolytics

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Sintomas da podridão bacteriana .....	25
<b>Figura 2</b> – Esquema para identificação e diferenciação das principais pectobactérias.....	26
<b>Figura 3</b> – Sintoma produzido nos testes de patogenicidade pelos isolados bacterianos obtidos de materiais vegetais com sintomas de podridão mole .....	35
<b>Figura 4</b> – Resultados de testes bioquímicos e fisiológicos para a caracterização de isolados de pectobactéria .....	36
<b>Figura 5</b> – Resultado do teste de degradação do meio pectato .....	39
<b>Figura 6</b> – Resultado do teste YDC .....	40
<b>Figura 7</b> – Sensibilidade dos isolados causadores de podridão mole a eritromicina .....	41
<b>Figura 8</b> – Isolado PMH21 submetido ao teste de crescimento a 37°C em meio NA .....	42
<b>Figura 9</b> – Resultado positivo do teste de isca biológica, apresentando maceração do tecido do tubérculo.....	42
<b>Figura 10</b> – Resultado com características típicas apresentadas pelos isolados positivos para o teste de isca biológica em pimentão verde .....	43
<b>Figura 11</b> – Eletroforese em gel de agarose para DNA amplificado por PCR de isolados causadores de podridões moles, utilizando-se o conjunto de <i>primers</i> desenvolvidos a partir da região IGS que separam <i>P. carotovorum</i> de <i>D. chrysanthemi</i> .....	44
<b>Figura 12</b> – Eletroforese em gel de agarose para DNA amplificado por PCR de isolados causadores de podridões moles, utilizando-se o conjunto de <i>primers</i> desenvolvidos a partir da região IGS, específicos para <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> .....	46
<b>Figura 13</b> – Eletroforese em gel de agarose para DNA amplificado por PCR de isolados causadores de podridões moles, utilizando-se o conjunto de <i>primers</i> desenvolvidos a partir da região do gene <i>pel</i> .....	47
<b>Figura 14</b> – Árvore de máxima parcimônia de espécies de fitobactérias causadoras de podridões moles baseada em sequências da região 16S rDNA.....	48

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Isolados bacterianos obtidos de materiais vegetais com sintomas típicos de podridão mole, nos Estados de Minas Gerais e Pará..... 24
- Tabela 2** – Sequências de referência de espécies da família *Enterobacteriaceae* depositadas no GenBank utilizadas na análise filogenética..... 33
- Tabela 3** – Características bioquímicas e fisiológicas dos isolados causadores de podridões moles oriundos de diversos hospedeiros. Lavras, MG. 2018..... 37

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1	Podridão Mole .....	17
2.2	Família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	17
2.3	Aspectos taxonômicos das principais enterobactérias causadoras de podridões moles	18
2.3.1	<i>Pectobacterium</i> .....	19
2.3.2	<i>Dickeya</i> .....	20
2.4	Técnicas para identificação e caracterização de pectobactérias .....	21
2.4.1	<i>Pectobacterium</i> .....	21
2.4.2	<i>Dickeya</i> .....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Locais de realização da pesquisa.....	23
3.2	Origem e obtenção dos isolados .....	23
3.2.1	Isolados tipos e referência.....	23
3.2.2	Isolados para estudo.....	23
3.3	Isolamento.....	25
3.4	Teste de patogenicidade .....	25
3.5	Cultivo e preservação dos isolados.....	25
3.6	Testes diagnósticos .....	26
3.6.1	Testes bioquímicos e fisiológicos .....	26
3.6.2	Testes moleculares.....	29
3.6.2.1	Extração de DNA.....	29
3.6.2.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR) com uso de primers específicos.....	30
3.6.2.2.1	Amplificação do gene <i>pel</i> específico ao gênero <i>Pectobacterium</i> spp.....	30
3.6.2.2.2	PCR Multiplex .....	30
3.6.2.2.3	Oligonucleotídeos específicos para identificação da espécie <i>D. chrysanthemi</i> .....	31
3.6.2.2.4	<i>Nested</i> -PCR .....	31
3.6.2.3	Corrida Eletroforética .....	31
3.6.2.4	Sequenciamento do gene 16S rDNA .....	32
3.6.2.4.1	Análise das sequencias obtidas.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
4.1	Obtenção dos isolados, isca biológica e característica da colônia .....	35
4.2	Caracterização bioquímica e fisiológica .....	35
4.3	Identificação por PCR .....	43

<b>4.4</b>	<b>Análise filogenética.....</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A família *Enterobacteriaceae* inclui alguns patógenos humanos e animais como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* (TOTH; PRITCHARD; BIRCH, 2006). Esta família também contém alguns patógenos de considerável importância econômica para o agronegócio, responsáveis por causarem a podridão mole bacteriana, a qual se destaca como uma das principais causas de perdas de pós-colheita de batatas (CAPPELLINI et al., 1984), alface (CEPONIS; CAPPELLINI; LIGHTNER, 1985), tomates (CEPONIS; CAPPELLINI; LIGHTNER, 1986), pimentas (CEPONIS; CAPPELLINI; LIGHTNER, 1987) e entre outras frutas e vegetais no mercado.

Segundo IBGE (2018), o Estado de Minas Gerais se destaca como o maior produtor de batata, com produção de 1.197,5 mil toneladas. No entanto, as bactérias causadoras de podridão mole estão entre os fitopatógenos responsáveis por causarem perdas elevadas à bataticultura. Em Minas Gerais, Cardoza, Duarte e Lopes (2017), constataram lote de batata-semente importado contaminado com bactérias pectinolíticas em um campo comercial, resultando em plantas doentes e tubérculos apodrecidos.

A ocorrência das bactérias causadoras de podridões moles no Estado do Pará se destaca, principalmente, pela condição climática da região, quente e úmido, a qual favorece a incidência de bactérias apodrecedoras no campo e na pós-colheita. Sendo este o fator limitante à produtividade, e conseqüentemente torna o abastecimento de hortaliças dependente da oferta de outras regiões produtoras do País em decorrência da baixa produção da região amazônica (BOARI et al., 2017).

As podridões moles são acometidas por um grupo de patógenos de plantas, inofensivo ao homem, onde se destacam os gêneros *Dickeya* e *Pectobacterium*, principalmente. Porém, alguns estudos recentes com base no sequenciamento de DNA comprovaram que outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* estão associados à doença.

Abu-Obeid, Khlaif e Salem (2017) comprovaram que isolados identificados bioquimicamente como *Pectobacterium carotovorum* subespécie *carotovorum* quando comparados por sequenciamento, apresentaram semelhança com diferentes gêneros, tais como, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. e *Klebsiella* spp., além de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Nesse sentido, as sequências do gene 16S rRNA são geralmente usadas como estrutura para classificação bacteriana. Portanto, o sequenciamento desse gene foi usado como uma primeira ferramenta de identificação (GARCIA-MARTINEZ et al., 2001). As relações de

muitos membros da família *Enterobacteriaceae* foram definidas com base na relação de DNA (WAYNE et al., 1987; FOX; WISOTZKEY; JURTSUK, 1992; STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

Além disso, outros métodos moleculares foram usados para a identificação de bactérias de podridão mole, mais precisamente para os gêneros *Dickeya* e *Pectobacterium*, como PCR convencional, RFLP, PCR em Tempo-real (TaqMan), LAMP, Nested-PCR e Multiplex (CZAJKOWSKI et al., 2015). Em contrapartida, os testes bioquímicos e fisiológicos demandam tempo, são trabalhosos e, além disso, a ocorrência de isolados que apresentam características que não correspondem a nenhuma espécie ou subespécie, também conhecidos como formas intermediárias, dificultam a interpretação dos resultados impossibilitando muitas vezes a identificação dos isolados (EL TASSA; DUARTE, 2006).

Diante do exposto, a identificação dos gêneros, espécies e subespécies das bactérias causadoras de podridões moles auxiliarão nas medidas preventivas de controle da doença, contribuindo assim no monitoramento no campo, na prevenção de infecções latentes e na disseminação do patógeno. Além disso, possibilita determinar métodos de detecção mais rápidos e eficientes, oferecendo maior segurança na certificação de sementes, e em consequência, diminuição de perdas de produtividade no campo e/ou na pós-colheita em decorrência da doença bacteriana.

O objetivo com este trabalho foi identificar e caracterizar bactérias causadoras de podridões moles com base em testes bioquímicos e fisiológicos, métodos moleculares e pelo sequenciamento da região 16S rDNA.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Podridão Mole

A podridão mole é de ocorrência frequente no Brasil, sendo causada principalmente por bactérias dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*, podendo ocorrer durante o crescimento da planta, na colheita, no armazenamento, transporte e comercialização. A importância econômica das perdas causadas por essas bactérias pode ser muito grande, dependendo da cultura e da severidade do ataque, subespécie envolvida, condições ambientais, potencial de inóculo e manejo da cultura (MARIANO et al., 2005).

O processo da doença é iniciado com a penetração da bactéria na planta, através de ferimentos ou aberturas naturais. Simultaneamente à penetração, ocorre a produção de enzimas pectinolíticas como mecanismo de ataque. As pectinases degradam enzimaticamente a lamela média, fazendo com que o tecido perca sua rigidez, tornando-se mole. Posteriormente, subsequentes fermentações e invasão por microrganismos saprófitas do tecido em colapso ocasionam o desprendimento de gases com odor desagradável, que originam o nome de podridões moles (ROMEIRO, 2005).

As pectobactérias são aparentemente adaptadas ao crescimento em tecidos de plantas ricos em nutrientes, sendo pouco hábeis para a competição com outros microrganismos em solos relativamente pobres, especialmente em alta temperatura (PÉROMBELON, 1992). As feridas e o estresse fisiológico ocasionado por outros patógenos, e os danos causados por insetos e nematóides também favorecem o desenvolvimento da doença (MARIANO et al., 2005).

### 2.2 Família *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* inclui atualmente mais de 210 espécies em 53 gêneros, e esses números continuam a aumentar (JENKINS et al., 2017).

Segundo as normas da *Public Health England* (2015) para identificação os membros da família *Enterobacteriaceae* são Gram negativos e não formadores de esporos. Alguns gêneros são móveis por meio de flagelos peritricosos, exceto *Tatumella*, espécies de *Shigella* e *Klebsiella* não são móveis. Eles são anaeróbios facultativos e a maioria das espécies crescem bem a 37 °C, embora algumas espécies cresçam melhor a 25-30 °C. Eles crescem bem em meios de peptona e extrato de carne. Alguns isolados crescem em D-glicose

como a única fonte de carbono e energia, mas outros isolados requerem vitaminas e ou aminoácidos. Apresentam resultado negativo para oxidase e as reações de catalase variam entre as enterobactérias. Os nitratos são reduzidos a nitritos, exceto por alguns isolados de *Erwinia*. Estes isolados são distribuídos em todo o mundo e podem ser encontrados no solo, água, plantas, seres humanos e animais (PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2015).

### 2.3 Aspectos taxonômicos das principais enterobactérias causadoras de podridões moles

De acordo com a 9ª edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994), as bactérias causadoras de podridão mole, inicialmente denominadas de *Erwinia*, pertencem ao Reino Procariota, Divisão Eubacteria, categoria I (eubactérias Gram negativas com parede celular), grupo 5 (bastonetes Gram negativos, aeróbicos facultativos), sub-grupo 1, Família *Enterobacteriaceae* (HOLT et al., 1994).

O gênero *Pectobacterium* foi inicialmente denominado de *Erwinia* por Winslow et al., em 1917 em homenagem a Erwin F. Smith, um dos fundadores da fitobacteriologia (PÉROMBELON, 1992). O gênero *Erwinia* foi proposto para agrupar as bactérias Gram negativas, não formadoras de endósporo peritríquias, fermentativas, com forma de bastonete, incluídas na família *Enterobacteriaceae*. Este gênero reuniu as bactérias associadas a plantas como patógenos, saprófitas e endófitas (KWON et al., 1997; 2000; TOTH; AVROVA; HYMAN, 2001).

O gênero *Erwinia*, inicialmente era formado pelos grupos: *Amylovora*, *Carotovora* e *Herbicola* (DYE, 1969). As espécies do gênero *Erwinia* pertencentes ao grupo *Carotovora*, as quais são capazes de produzir enzimas pectinolíticas passaram por um processo de reclassificação ao longo dos anos.

Posteriormente, Hauben et al. (1998) com base na análise de sequência do rDNA 16S de 29 estirpes de bactérias associadas a plantas, propuseram que as espécies do grupo *Carotovora* do gênero *Erwinia* fossem reunidas no gênero *Pectobacterium*, sendo então renomeadas: *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (van Hall) Dye para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (van Hall) Hauben et al.; *E. carotovora* subsp. *betavasculorum* Thomson et al. para *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum* (Thomson et al.) Hauben et al.; *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey et al. para *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al.; *E. carotovora* subsp. *odorifera* Gallois et al. para *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Gallois et al.) Hauben et al.; *E. carotovora* subsp. *wasabiae* Goto e Matsumoto para *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* (Goto ; Matsumoto)

Hauben et al.; *E. cacticida* Alcorn et al. para *P. cacticidum* Hauben et al.; *E. chrysanthemi* Burkholder et al. para *P. chrysanthemi* (Burkholder et al.) Brenner et al.; e *E. cyripedii* (Hori) Bergey et al. para *P. cyripedii* (Hori) Brenner et al.

Em 2003, considerando um estudo utilizando hibridação de DNA-DNA, taxonomia numérica de 120 características fenotípicas, sorologia e nova análise filogenética de sequências de rDNA 16S, previamente relatadas em base de dados, *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum* (Thomson et al.) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (van Hall) Hauben et al. e *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* (Goto ; Matsumoto) Hauben et al. foram elevadas ao nível de espécies e renomeadas em *P. betavasculorum* (Thomson et al.) Gardan et al., *P. atrosepticum* (van Hall) Gardan et al. e *P. wasabiae* (Goto and Matsumoto) Gardan et al, respectivamente (GARDAN et al., 2003).

Em trabalho realizado por Duarte et al. (2004), bactérias isoladas de cultivos de batata (*Solanum tuberosum* L.) com sintomas de canela-preta no Rio Grande do Sul, apresentaram perfis bioquímicos, fisiológicos, sorológicos e genéticos que não se enquadraram em nenhuma das espécies de *Pectobacterium*, sobretudo apresentaram características diferentes de *Pectobacterium atrosepticum*, principal agente causal de canela-preta em batata. Os isolados desse estudo apresentaram características semelhantes a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, levando a sugestão de uma nova subespécie de *P. carotovorum*, denominada de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* Duarte et al. Também Nabhan et al. (2012) através de hibridação DNA-DNA de isolados identificados em estudos anteriores como *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (DUARTE et al., 2004 NABHAN et al., 2011), confirmaram a proposta da nova subespécie, *brasiliensis*. Adicionalmente, Nabhan et al. (2013) propuseram a inserção de uma nova espécie causadora de podridão mole, infectando principalmente monocotiledôneas: *P. aroidearum* Nabhan et al.

Samson et al. (2005) baseados em análise filogenética da sequência de genes da região rDNA 16S de estirpes de *P. chrysanthemi*, propuseram a reclassificação da espécie para o gênero *Dickeya*.

### 2.3.1 *Pectobacterium*

O gênero *Pectobacterium*, com base em características fenotípicas diferenciadas é dividido em sete espécies: *cacticidium*, *carotovorum*, *atrosepticum*, *betavasculorum*, *wasabiae*, *cyripedii* e *aroidearum*, sendo que a espécie *P. carotovorum* possui três

subespécies: subsp. *carotovorum*, subsp. *brasiliensis* e subsp. *odoriferum* (HAUBEN et al., 1998; GARDEN et al., 2003; DUARTE et al., 2004; NABHAN et al., 2013).

Cepas de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* são encontradas em todo o mundo, enquanto que *P. atrosepticum* é encontrada em climas frios, tendo a sua gama de hospedeiros restrita geralmente a batata, cultura de clima frio, embora isolados idênticos ou relacionados possam ser encontrados, ocasionalmente, em outras culturas.

Em comparação com a ecologia e genética de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. atrosepticum*, pouco se conhece sobre a ecologia e genética de *P. betavasculorum*, *P. wasabiae* ou *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. A subespécie *brasiliensis* foi encontrada no Brasil, Israel, Estados Unidos, África do Sul, Canadá, Nova Zelândia, Holanda e Coreia, no entanto, é provável que tenha uma distribuição mais ampla (DICKY, 1979; MA, 2007; LEITE, et al., 2014; NTUSHELO; MAFOFO, 2017). Já a espécie *P. aroidearum* teve o primeiro relato por Moraes et al. (2017) causando podridão mole em abobrinha no Brasil.

Novas mudanças estão sendo realizadas na taxonomia das bactérias causadoras de podridão. Khayi et al (2016) combinaram dados genômicos e fenotípicos e reavaliaram a posição taxonômica da espécie *Pectobacterium wasabiae*. Com base na análise de sequência multi-locus foi observada a formação de um clado separado do isolado tipo *P. wasabiae* SR91 obtido de rábano (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes*) no Japão, propondo-se a transferência desses isolados para *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. Bioquimicamente o isolado de *P. parmentieri* RNS 08-42-1<sup>a</sup> se distinguiu de *P. wasabiae* SR91 pela capacidade de produzir ácido a partir de melibiose, rafinose, lactose e D-galactose.

### 2.3.2 *Dickeya*

O gênero *Dickeya* é dividido em oito espécies: *dadantii*, *zea*, *dianthicola*, *paradiasica*, *dieffenbachiae*, *chrysanthemi*, *aquatica* e *solani* (TOTH et al., 2001; SAMSON et al., 2005; PARKINSON et al., 2014). Os membros desse gênero são comumente encontrados em climas tropicais e subtropicais, onde são relatados como agentes causais da podridão do caule aéreo e murcha de batatas. Cepas de *D. dianthicola* são melhores adaptadas às condições de clima temperado, tornando-se um problema econômico da batata na Europa (SAMSON et al., 2005), enquanto que a espécie *D. chrysanthemi* é patogênica a muitos hospedeiros em regiões tropicais e subtropicais (DICKY, 1979).

## 2.4 Técnicas para identificação e caracterização de pectobactérias

### 2.4.1 *Pectobacterium*

As pectobactérias podem ser identificadas por meio de testes bioquímicos, fisiológicos e moleculares. O método mais preciso para determinação da patogenicidade de *Pectobacterium sp.* é a inoculação em tubérculos de batata (DICKY; KELMAN, 1988), porém, a isca de pimentão verde pode ser utilizada para determinar a patogenicidade de isolados pertencentes a espécie *Pectobacterium carotovorum* (BENELLI et al., 2004).

No entanto, em alguns casos, foram encontradas inconsistência na identificação de espécies, necessitando de métodos mais confiáveis, precisos e mais rápidos, como aqueles baseados em técnicas moleculares (ZHANG; FAN; LORIA, 2016).

Porém, muitos isolados com suspeitas de pectobactérias, ao serem submetidos aos testes tradicionais apresentam resultados característicos intermediários para os testes bioquímicos. Nessa perspectiva, os métodos moleculares como anticorpos monoclonais (DE BOER ; MC NAUGHTON, 1987), oligonucleotídeos iniciadores específicos (DE BOER ; WARD, 1995; BERTHEAU et al., 1998), RFLP (DARRASSE et al., 1996; SLEDS et al., 2000), AFLP (AVROVA et al., 2002), rep-PCR (TOTH et al., 1999), RAPD (MAKI-VALKAMA ; KARJALAINEN, 1994) e a análise das sequências de rDNA 16S (HAUBEN et al., 1998; AKRAMIPOUR et al., 2016) estão sendo mais usuais e precisos.

Baseado nos estudos de Zhang et al. (2016), sobre a estimativa de valores médios de identidade de nucleotídeos (ANI) e hibridização de DNA-DNA *silico* (DDH), em combinação com a filogenia baseada em genoma total de 895 genes usando 85 genomas, houve suporte para elevação das quatro subespécies de *Pectobacterium carotovorum* (*actinidiae*, *odoriferum*, *carotovorum* e *brasiliense*) ao nível de espécie. Também foi comprovado que algumas estirpes não podem ser atribuídas a nenhuma das espécies existentes, indicando que essas cepas representam espécies novas. Além disso, o estudo revelou que pelo menos dez genomas testados desses gêneros foram depositados errados no *GenBank*.

### 2.4.2 *Dickeya*

O gênero *Dickeya* está dividido em seis espécies, que correspondem a seis patovares, de acordo com a gama de hospedeiros, e nove biovares, com base em testes bioquímicos. Com o passar dos anos ocorreram várias mudanças em função da sua diversidade (YOUNG et

al., 1978; LELLIOTT ; DICKEY, 1984). Elas foram reclassificadas no ano de 2005, a partir de análise filogenética das sequências do gene 16S rDNA, o que fez desmembrá-las do grupos das espécies do gênero *Pectobacterium*. A reclassificação de *Erwinia* em *Dickeya* consistiu em: *D. chrysanthemi*, *D. paradisiacal*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae* e *D. zea* (SAMSON et al., 2005).

Em 2012 *Dickeya dieffenbachiae* foi reclassificada como *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* (BRADY et al., 2012). Já a espécie *Dickeya solani* foi validada pelo *International Journal of Systematic of Microbiologia Evolutiva* como uma nova espécie em 2014 (WOLF et al., 2014), porém, no Brasil a ocorrência desta bactéria em batata só foi publicado, com autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em janeiro de 2017 no periódico *Plant Disease* (CARDOZA; DUARTE; LOPES, 2017; CARDOZA; DUARTE; LOPES, 2017).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Locais de realização da pesquisa

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA), Minas Gerais, e no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, Pará, no período de abril de 2017 a dezembro de 2018.

### 3.2 Origem e obtenção dos isolados

#### 3.2.1 Isolados tipos e referência

Foram utilizados os isolados tipos 1692<sup>T</sup> Pcbr (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*) e 863<sup>T</sup> Pcc (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) obtidas da coleção do Instituto Biológico de Campinas como controle positivo nos testes de caracterização dos isolados causadores de podridão mole.

Também foram utilizados os isolados de referência 1131 Pcc (*Pectobacterium* subsp. *carotovorum*) e 1383 Pch (*Dickeya chrysanthemi*) adquiridos da coleção do Instituto Biológico de São Paulo, além dos isolados 46 (*Pectobacterium carotovorum*) e 55 (*Pectobacterium carotovorum*), identificados como pertencentes ao gênero *Pectobacterium* (HENZ; REIFSCHNEIDER; DUARTE, 2006).

#### 3.2.2 Isolados dos Estados de Minas Gerais e Pará

Para os estudos, as bactérias foram isoladas na clínica do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da UFLA de materiais vegetais de Minas Gerais com sintomas de podridão mole e de coletas em diferentes regiões produtoras de hortaliças no estado do Pará de materiais vegetais com sintomas típicos da doença (Figura 1). Foram utilizados também alguns isolados causadores de podridão mole ainda não identificados, pertencentes a coleção bacteriana da Embrapa Amazônia Oriental, o total de 39 isolados (Tabela 1).

**Tabela 1** - Isolados bacterianos obtidos de materiais vegetais com sintomas típicos de podridão mole, nos Estados de Minas Gerais e Pará.

<b>Identificação</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Localidade</b>
PMF1	<i>Ananas comosus</i>	PA
PMF2	<i>Euterpe oleracea</i>	Igarapé-mirí - PA
PMF3	<i>E. oleracea</i>	Tucuruí - PA
PMF4	<i>Hylocereus undatus</i>	Cpatu - PA
PMF5	<i>Musa</i> spp.	MG
PMH1	<i>Cichorium intybus intybus</i>	Altamira – PA
PMH2	<i>Lactuca sativa</i>	Altamira – PA
PMH3	<i>L. sativa</i>	Altamira – PA
PMH4	<i>Brassica oleracea</i>	Altamira – PA
PMH5	<i>Petroselinum crispum</i>	Altamira – PA
PMH6	<i>Amaranthus viridis</i>	Benevides – PA
PMH7	<i>B. oleracea</i>	Benevides – PA
PMH8	<i>L. sativa</i>	Ananindeua - PA
PMH10	<i>L. sativa</i>	Santa Izabel – PA
PMH12	<i>Acmella oleracea</i>	Santa Izabel – PA
PMH13	<i>B. oleracea</i>	Mojú – PA
PMH14	<i>A. viridis</i>	Belém – PA
PMH15	<i>Capsicum annuum</i>	Lavras – MG
PMH16	<i>Solanum tuberosum</i>	Lavras – MG
PMH17	<i>C. annuum</i>	Lavras – MG
PMH18	<i>Capsicum frutescens</i>	Lavras – MG
PMH19	<i>C. frutescens</i>	MG
PMH20	<i>S. tuberosum</i>	MG
PMH21	<i>Solanum lycopersicum</i>	MG
PMH22	<i>Allium sativum</i>	MG
PMH23	<i>S. tuberosum</i>	Presidente Olegário – MG
PMH24	<i>S. tuberosum</i>	MG
PMH25	<i>S. tuberosum</i>	MG
PMH26	<i>Cucurbita pepo</i>	MG
PMH27	<i>L. sativa</i>	MG
PMH28	<i>S. lycopersicum</i>	MG
PMH29	<i>L. sativa</i>	Castanhal – PA
PMH30	<i>B. oleracea</i>	Castanhal – PA
PMH31	<i>L. sativa</i>	Castanhal – PA
PMH32	<i>L. sativa</i>	Castanhal – PA
PMH33	<i>P. crispum</i>	Castanhal – PA
PMH34	<i>B. oleracea</i>	Castanhal – PA
PM2	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Perdões - MG
PM3	<i>Pennisetum purpureum</i>	MG

**Figura 1** - Sintomas da podridão bacteriana da couve (A) e do tubérculo de batata (B).



### 3.3 Isolamento

O isolamento foi realizado pelo método de isca biológica em tubérculo de batata. A avaliação da maceração foi realizada após 24 horas da inoculação. Havendo a maceração do tecido foi realizada a repicagem pelo método de estrias paralelas para placas de Petri contendo meio 523 de Kado e Heskett (1970) (MB1) (10 g de sacarose, 8 g de caseína hidrolisada, 4 g de extrato de levedura, 2 g de  $K_2HPO_4$ , 0,3g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15 g de ágar e 1 L de água destilada).

### 3.4 Teste de patogenicidade

Todos os isolados obtidos foram submetidos novamente ao teste de isca biológica em tubérculo de batata para confirmar a patogenicidade, porém, agora a partir da colônia bacteriana crescida após 24 horas em meio 523 de Kado e Heskett (1970).

### 3.5 Cultivo e preservação dos isolados

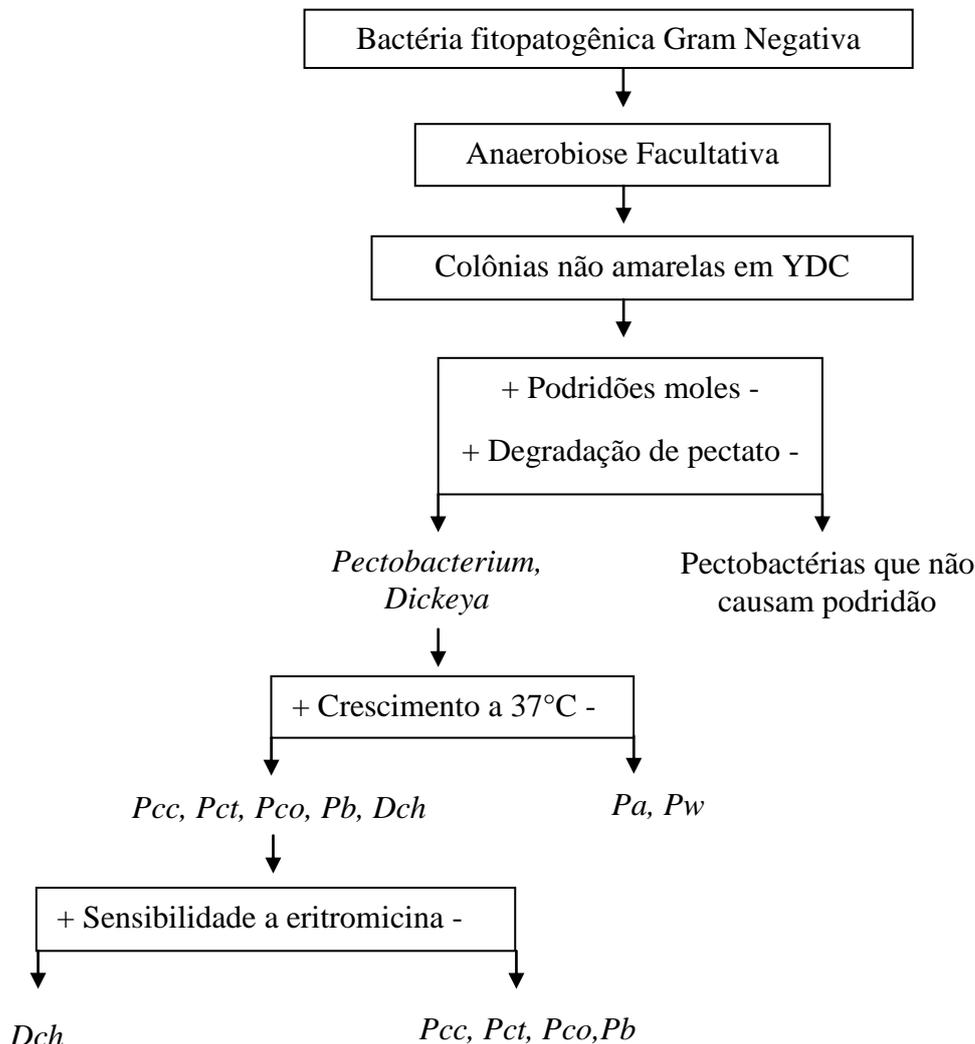
Para as realizações dos ensaios os isolados foram cultivados em meio 523 de Kado e Heskett (1970) pelo método de estrias paralelas e incubados em câmara de crescimento tipo BOD por 24 horas a 28°C. Os isolados foram preservados em tubos plásticos de criogenia (2,0 mL), contendo 1,0 mL de água destilada esterilizada, e em tubos de ensaio contendo meio 523 solidificado, ambos em condições de laboratório ( $25 \pm 2^\circ C$ ).

### 3.6 Testes diagnósticos

#### 3.6.1 Testes bioquímicos e fisiológicos

Para caracterização, os isolados foram submetidos aos seguintes testes: Gram, anaerobiose, catalase, oxidase, degradação de pectato, sensibilidade a eritromicina, crescimento em meio YDC, crescimento a 37°C por 72 horas em meio NA e isca biológica (SCHAAD et al., 2001, modificado). As avaliações para diferenciar as principais pectobactérias foram baseadas no fluxograma representado na Figura 2, considerando que as pectobactérias possuem as seguintes características: Gram negativas, catalase positiva, anaerobiose facultativa, oxidase positiva e não apresentam colônias amarelas em meio YDC (SCHAAD et al., 2001). Todos os testes tiveram no mínimo uma replicata e a patogenicidade dos isolados sempre era testada antes de submetê-los aos testes.

**Figura 2** - Esquema para identificação e diferenciação bioquímica/ fisiológica das principais pectobactérias (adaptado de SCHAAD; JONES; CHUN, 2001 e BLACK et al., 1996).



Legenda: +, 80% ou mais cepas positivas; - 80% ou mais de cepas negativas. *Pcc* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), *Pb* (*Pectobacterium betavasculorum*), *Pco* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*), *Pct* (*Pectobacterium cacticida*), *Pa* (*Pectobacterium antroseptica*), *Pw* (*Pectobacterium wasabiae*), *Dch* (*Dickeya chrysanthemi*).

## **Gram**

Para o teste de Gram foi utilizado o método de Ryu (MARIANO et al., 2000). Em uma lâmina de microscopia foi adicionada uma gota de KOH 3% e, em seguida foi adicionado uma porção do crescimento bacteriano sobre a gota. Após a homogeneização foi observado formação de viscosidade para bactérias Gram-negativas e ausências para Gram-positivas.

## **Oxidase**

Tiras de papel filtro estéreis foram imersas em solução de tetrametil parafenileno diamino dihidroclorato a 1%. Em seguida, coletou-se com um bastão de vidro pequena quantidade de células bacterianas cultivadas em meio 523 sólido, a 28°C por 72 horas e fez-se o esfregaço em papel imerso na solução. Bactérias oxidase positivo produzem a coloração roxa em um intervalo de 10 segundos e as oxidase negativo, após 60 segundos, mantêm o papel na coloração branca (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

## **Catalase**

O teste foi realizado colocando uma gota de solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3% em uma lâmina e, em seguida, adicionou-se uma porção do crescimento bacteriano sobre a gota. Foi considerado resultado positivo o qual houve a formação de borbulhamento ou efervescência da gota, devido à liberação do oxigênio (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

## **Anaerobiose**

O teste de anaerobiose foi realizado pelo método da lamínula em placa de Petri. As bactérias foram repicadas para meio MB1 líquido e incubadas em SHAKER por 24 horas a 28°C, com agitação constante de 360 rpm. Foi depositada uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana em placas contendo o meio MB1 solidificado, homogeneizada com alça de Drigalski, e adicionou-se sobre o meio uma lamínula esterilizada. A presença de crescimento bacteriano sob a lamínula caracterizou o organismo como anaeróbico facultativo, como é o caso das pectobactérias as quais são capazes de se desenvolverem na presença ou ausência de oxigênio. Bactérias aeróbias estritas crescem somente na presença de oxigênio (ROMEIRO, 2001).

### **Cultivo em meio de cultura YDC**

Todos isolados estudados foram repicados para o meio de cultura YDC solidificado (extrato de levedura 10 g, dextrose 20 g, carbonato de sódio 20 g, ágar 18 g, água destilada 1000 mL) (WILSON; ZEITOUN; FREDRICKSON, 1967) e em seguida foram incubados a 28 °C por 24 horas.

A avaliação foi realizada observando-se, visualmente, os aspectos morfológicos das colônias. Segundo Schaad, Jones e Chun (2001), o meio YDC possibilita a diferenciação de gêneros conforme a coloração das colônias. Pectobactérias apresentam colônias de coloração creme, com bordos irregulares e opacas em meio YDC (DUARTE; EL TASSA, 2003), enquanto bactérias do gênero *Pantoea* apresentam colônias de coloração amarelada (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

### **Isca biológica de tubérculo de batata e fruto de pimentão verde**

Para comprovação da ação pectinolítica, foram utilizados tubérculos de batatas e frutos verdes de pimentão (TAKATSU et al., 1978) aparentemente sadios. Os dois órgãos usados como isca biológica. Foram lavados em água corrente e desinfestados superficialmente com álcool 92,8% e em seguida foram flambados rapidamente. No tubérculo de batata, a inoculação foi realizada por picada com colônias bacterianas crescidas por 24 horas em meio 523 de Kado e Heskett (1970) de forma asséptica. No fruto de pimentão, após a confirmação da pureza dos preservados bacterianos, a inoculação foi realizada por picada com um estilete com a bactéria diretamente do preservado. E, por conseguinte, o tubérculo de batata foi mantido em câmara úmida em BOD por 24 horas à temperatura de 28°C, enquanto o fruto de pimentão foi incubado nas mesmas condições, porém, por 72 horas com avaliações diárias. (adaptado de ROMEIRO, 2001).

### **Degradação de Pectato**

Para a obtenção da seletividade das bactérias com atividade pectinolítica, foi utilizado o meio de cristal violeta pectato (CVP) (CUPPELS; KELMAN, 1974). As colônias bacterianas após 24 horas de crescimento foram repicadas para o meio de cultura, na forma de pontos de inoculação, e incubadas a 27°C, por um período de 1 a 6 dias. O resultado foi considerado positivo quando houve a degradação do pectato resultando em depressão no meio de cultura (MARIANO; SOUZA, 2016). Além disso, observou-se a formação de halo ou não no ponto de inoculação.

### **Crescimento a 37°C**

Para a realização desse teste, foram feitas repicagens dos isolados com crescimento de 24 horas para placas de Petri contendo meio nutriente ágar (NA) (extrato de carne 3 g, peptona 5 g, ágar 15 g, água destilada 1000 mL) (GERHARDT, 1994) com método de estrias paralelas. Após a repicagem, as placas foram levadas à câmara de crescimento tipo BOD a 37 °C por 72 h. A presença de crescimento bacteriano em meio de cultura NA foi considerado resultado positivo para o teste (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

### **Sensibilidade a Eritromicina**

Para verificar o efeito da eritromicina sobre o crescimento das pectobactérias, em cada placa de Petri contendo meio 523, acrescidos de 5 mL de meio 523 semi-sólido fundente, contendo 100 µL da suspensão bacteriana, foram adicionados 2 discos de papel de filtro equidistantes impregnados com 15 µg de eritromicina (MARIANO et al., 2000). As placas foram incubadas no escuro a 28°C por 24 horas. Foram considerados suscetíveis ao antibiótico os isolados que apresentaram a formação de halo de inibição.

## **3.6.2 Testes moleculares**

### **3.6.2.1 Extração de DNA**

Para a extração de DNA, alíquotas de 1,5 mL de cultura bacteriana foram centrifugadas e os precipitados ressuspensos com 567 µL de TE pH 8,0, 30 µL de SDS 20% e 3 µL de proteinase K 20 mg/mL. A mistura foi incubada em banho maria por 1 hora a 37°C. Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de CTAB 10%, a mistura foi incubada a 65°C. Após a extração com clorofórmio e isopropanol, o DNA foi ressuspensado em 90 µL de TE e 10 µL de RNase (AUSUBEL et al., 1987). A quantificação do DNA foi realizada utilizando-se o padrão de peso molecular *Low DNA mass ladder* (Invitrogen) e o programa LabImage 1D L340 (Loccus Biotecnologia).

### 3.6.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) com uso de primers específicos

#### 3.6.2.2.1 Amplificação do gene *pel* específico ao gênero *Pectobacterium* spp.

Os oligonucleotídeos Y1 (5' TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT 3')/Y2 (5' CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT 3') são específicos para determinação do gênero *Pectobacterium* (DARRASSE et al., 1994) amplificando fragmentos de 434 pb.

O volume final da reação foi de 25  $\mu$ L, contendo 10  $\mu$ L de DNA, 10  $\mu$ mol de cada primer, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de tampão de reação (Tris-HCl pH 8,3), 0,1 mM de cada desoxinucleótido (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen), 1 unidade de *Taq* polimerase (Promega) e água estéril (MilliQ). O programa de amplificação foi constituído de 4 min. de desnaturação inicial a 94°C, 35 ciclos de 1 min. a 94 °C, 58 °C a 1 min. e 72 °C a 2 min., e extensão final por 2 min. a 72°C.

#### 3.6.2.2.2 PCR Multiplex

Para a região espaçadora intergênica (IGS), as reações foram realizadas utilizando os seguintes oligonucleotídeos (5' – 3'): 1491f (GAAGTCGTAACAAGGTA)/ L1RA (CAAGGCATCCACCGT)/ L1RG (CAGGGCATCCACCGT), que produzem fragmentos de  $\approx$  510 pb e  $\approx$  550 pb para *P. carotovorum*, diferenciando de *D. chrysanthemi* ao apresentar um fragmento adicional de 480 pb (FESSEHAIE et al., 2002); e Br1f (GCGTGCCGGGTTTATGACCT)/L1RA/L1RG que produzem um fragmento de 322 pb e diferencia *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e algumas estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* das demais pectobactérias (DUARTE et al., 2004).

A reação foi realizada no volume final de 25  $\mu$ L, contendo 20 ng de DNA, 1X de tampão de reação (Tris-HCl pH 8,3), 0,1 mM de cada desoxinucleótido (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M dos oligonucleotídeos 1491f, L1RA e L1RG, e 0,5  $\mu$ M do oligonucleotídeo Br1f, 0,05 unidades de *Taq* polimerase (Promega) e água estéril (MilliQ) para completar o volume final. A amplificação por PCR foi realizada usando o seguinte perfil: um ciclo de 2 min. a 94 °C; 30 ciclos de 45 seg. a 94 °C, 45 seg. a 62 °C e 64 °C para as tríades 1491f/L1RA/L1RG e Br1f/L1RA/L1RG respectivamente, 1 min. e 30 seg. a 72 °C; e um ciclo de uma extensão final para 10 min. a 72 °C.

### 3.6.2.2.3 Oligonucleotídeos específicos para identificação da espécie *D. chrysanthemi*

Para a identificação da espécie *D. chrysanthemi* foi realizado PCR com os oligonucleotídeos ERWFOR (5'-ACGCATGAAATCGGCATGC-3') e CHRREV (5'-AGTGCTGCCGTACAGCACGT-3'), que amplificam fragmentos de 450 pb. A reação foi constituída por 20 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de tampão de reação (Tris-HCl pH 8,3), 0,5 mM de cada desoxinucleótido (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen), 1 μM de cada um dos oligonucleótidos, 1,25 unidade de *Taq* polimerase (Promega) e água estéril (MilliQ) para atingir o volume final de 25 μL. O programa de amplificação foi constituído de 4 min. de desnaturação inicial a 94°C, 30 ciclos de 1 min. a 94 °C, 56 °C a 1 min. e 72 °C a 2 min., e 1 ciclo final de 1 min. a 94 °C, 56 °C a 1 min. e 72°C por 10 min (SMID et al., 1995).

### 3.6.2.2.4 *Nested*-PCR

O *Nested*-PCR teve por finalidade identificar *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* com uso dos oligonucleotídeos EXPCCR (5'-GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3 ') e EXPCCF (5'- GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3'), concebidos para amplificar uma região de 550 pb no nucleotídeo. Para a segunda reação os oligonucleotídeos foram: INPCCR (5'-GGCCAAGCAGTGCCTGTATATCC-3') e INPCCF (5'-TTCGATCACGCAACCTGCATTACT-3') que geram fragmentos de 400 pb.

Ambas as reações foram realizadas em um volume final de 50 μL, contendo 20 ng de DNA, 1X de tampão de reação (Tris-HCl pH 8,3), 200 μM de cada desoxinucleótido (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 ng de iniciador e 2,5 unidades de *Taq* polimerase (Promega). As duas reações foram realizadas nas mesmas condições, porém com o uso de 2 μL do produto da PCR da primeira reação resultando na amplificação de uma região de 400 pb. A amplificação por *Nested*-PCR foi realizada usando o seguinte perfil: um ciclo de 4 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C, 2 min a 72 °C; um ciclo de uma extensão final para 7 min a 72 °C (KANG et al., 2003, modificado).

### 3.6.2.3 Corrida Eletroforética

Os produtos de amplificação foram analisados em géis de agarose a 1%, aplicando-se alíquotas de 5 μL de produtos de PCR com adição de 2 μL do corante GelRed (Biotium). Para os PCR's do gene 16S rDNA, da região IGS, gene *pele* do par de primers

ERWFOR/CHRREV, específico para *Dickeya chrysanthemi*, foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). No *Nested-PCR*, após a segunda fase de amplificação, foi aplicado alíquotas de 10 µL de produtos de PCR coradas com 2µL de GelRed (Biotium) em gel de agarose a 1 %. As amostras submetidas à eletroforese foram visualizadas e fotografadas em fotodocumentador. A eletroforese foi desenvolvida em 100 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

#### 3.6.2.4 Sequenciamento do gene 16S rDNA

A região do Gene 16S rDNA das bactérias pectinolíticas foram amplificadas com os oligonucleotídeos 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3')/ 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (LANE, 1991), e apresentaram um amplicon de aproximadamente 1450 pb. Para a reação de PCR com volume final de 25 µL, foram utilizados 0,3 mM de cada oligonucleotídeo, 30 ng de DNA, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5X de tampão de reação (Tris-HCl pH 8,3), 0,8 mM de cada desoxinucleótido (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 0,08 unidades de *Taq* polimerase e água estéril para completar o volume final (MilliQ).

As amostras foram amplificadas por meio de PCR, em Termociclador Therm 1000 Axigen Maxigene, utilizou-se: primeiros 9 ciclos seguidos de 94°C de desnaturação inicial por 45 seg., pareamento a 53°C por 45 seg., e extensão a 72°C por 1 min., e por conseguinte, 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 45 seg., pareamento a 48°C por 45 seg., e 72°C a 2 min., e extensão final por 5 min. a 72°C. Os produtos amplificados da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 1X corados com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®). O marcador utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Os produtos de PCR's foram purificados utilizando o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e enviados para o sequenciamento de ambos os sentidos, *forward* e *reverse*. Os sequenciamentos das amostras foram realizados pela empresa ACTGene Análise Moleculares.

##### 3.6.2.4.1 Análise das sequências obtidas

Os eletroferogramas foram analisados visualmente com o auxílio do programa SeqAssem (HEPPERLE, 2004) e as sequências consenso obtidas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information, NCBI, por

meio do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). No software MEGA 5 (TAMURA et al., 2011) foi realizado o alinhamento múltiplo das sequências, por meio do programa MUSCLE, bem como a análise filogenética pelo método de Máxima Parcimônia (MP). Foram utilizadas sequências das espécies *Mangroveibacter plantisponsor* e *Mangrovibacter yixingensis* como *outgroup* de acordo com Andrés-Barrao et al. (2017). Sequências da região 16S rRNA de material de referência obtidas do GenBank foram acrescentadas à análise (Tabela 2).

**Tabela 2-** Sequências de referência de espécies da família Enterobacteriaceae depositadas no GenBank utilizadas na análise filogenética.

<b>Código de acesso</b>	<b>Espécie</b>	<b>Acesso GenBank</b>
DES187T	<i>Cronobacter dublinensis</i>	EF059892
E825T	<i>Cronobacter malonaticus</i>	EF059881
ATCC 51329T	<i>Cronobacter muytjensii</i>	EF059845
ATCC 29544T	<i>Cronobacter sakazakii</i>	EF059843
z3032T	<i>Cronobacter turicensis</i>	EF059891
E797T	<i>Cronobacter universalis</i>	EF059877
ATCC 11663 T	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	NR_118856
JCM6051T	<i>Enterobacter asburiae</i>	AB004744
ATCC 13047T	<i>Enterobacter cloacae</i>	KX822725
CIP 107300T	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303
LMG 2683T	<i>Enterobacter dissolvens</i>	Z96079
CIP 103176T	<i>Enterobacter hermannii</i>	JN175345
CIP 103441T	<i>Enterobacter hormaechei</i>	AJ508302.1
DSM 13645T	<i>Enterobacter kobei</i>	LT547820
EN-119T	<i>Enterobacter ludwigii</i>	AJ853891
B36	<i>Enterobacter rogenkampii</i>	MF156911
YIM Hb-3T	<i>Enterobacter tabaci</i>	KP990658
W14T	<i>Klebsiella michiganensis</i>	NR_118335
ATCC 13182T	<i>Klebsiella oxytoca</i>	NR_119277
01A030T	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i>	HG933296
ATCC 13883T	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NR119278.1

F2R9T	<i>Klebsiella variicola</i>	AJ783916
MSSRF40T	<i>Mangroveibacter plantisponsor</i>	EF643377
TULL-AT	<i>Mangrovibacter yixingensis</i>	KM089834
CFBP 1526T	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	NR_118295
CFBP 2122T	<i>Pectobacterium betavascolorum</i>	NR_118292
CFBP2046T	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	NR_118227
212T	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i>	NR_118228
CFBP1878T	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>	NR_118225
CFBP 3304T	<i>Pectobacterium wasabiae</i>	NR_118294
CIP 103364T	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	U78182
ATCC 33531T	<i>Raoultella planticola</i>	AF129443
CIP 105435T	<i>Yokenella regensburgei</i>	NR_104934

T= isolado tipo

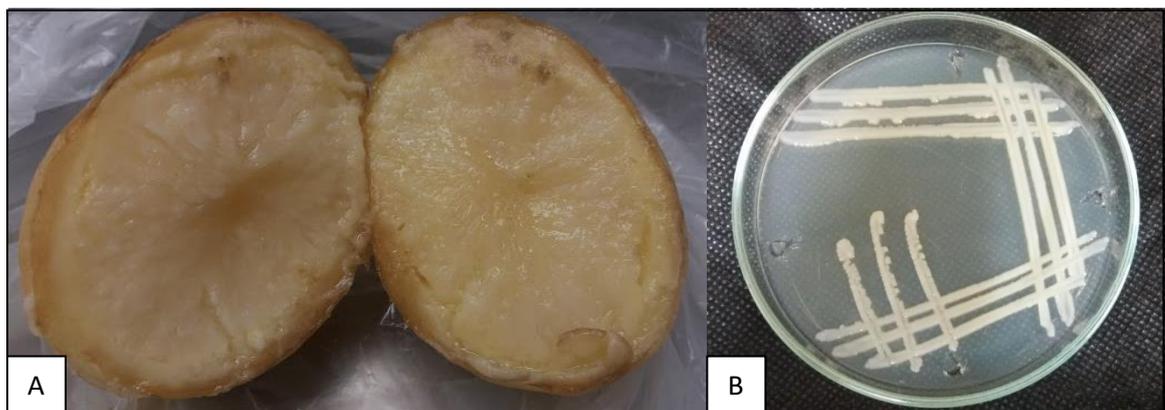
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção dos isolados, isca biológica e característica da colônia

Foram obtidos 39 isolados a partir de plantas, frutos e tubérculos com sintomas de podridão mole, provenientes da região metropolitana de Belém e do município de Altamira, do Estado do Pará, e dos municípios das mesorregiões do nordeste, sul e oeste do Estado de Minas Gerais, conforme apresentado na Tabela 1.

Todos os isolados causaram maceração no tubérculo de batata no teste de isca biológica, sendo considerado como “teste de patogenicidade” pela dificuldade de obtenção de mudas para realização do teste em todas as plantas hospedeiras em estudo. Observou-se maceração nos tubérculos de batata, bem como as características das colônias repicadas a partir do tubérculo macerado em meio 523 de Kado e Heskett (Figura 3. A e B, respectivamente).

**Figura 3** - Sintoma produzido nos testes de patogenicidade pelos isolados bacterianos obtidos de materiais vegetais com sintomas de podridão mole (A) e colônia bacteriana característica apresentada pela maioria dos isolados, a partir do isolamento da bactéria direto do tubérculo macerado (B).

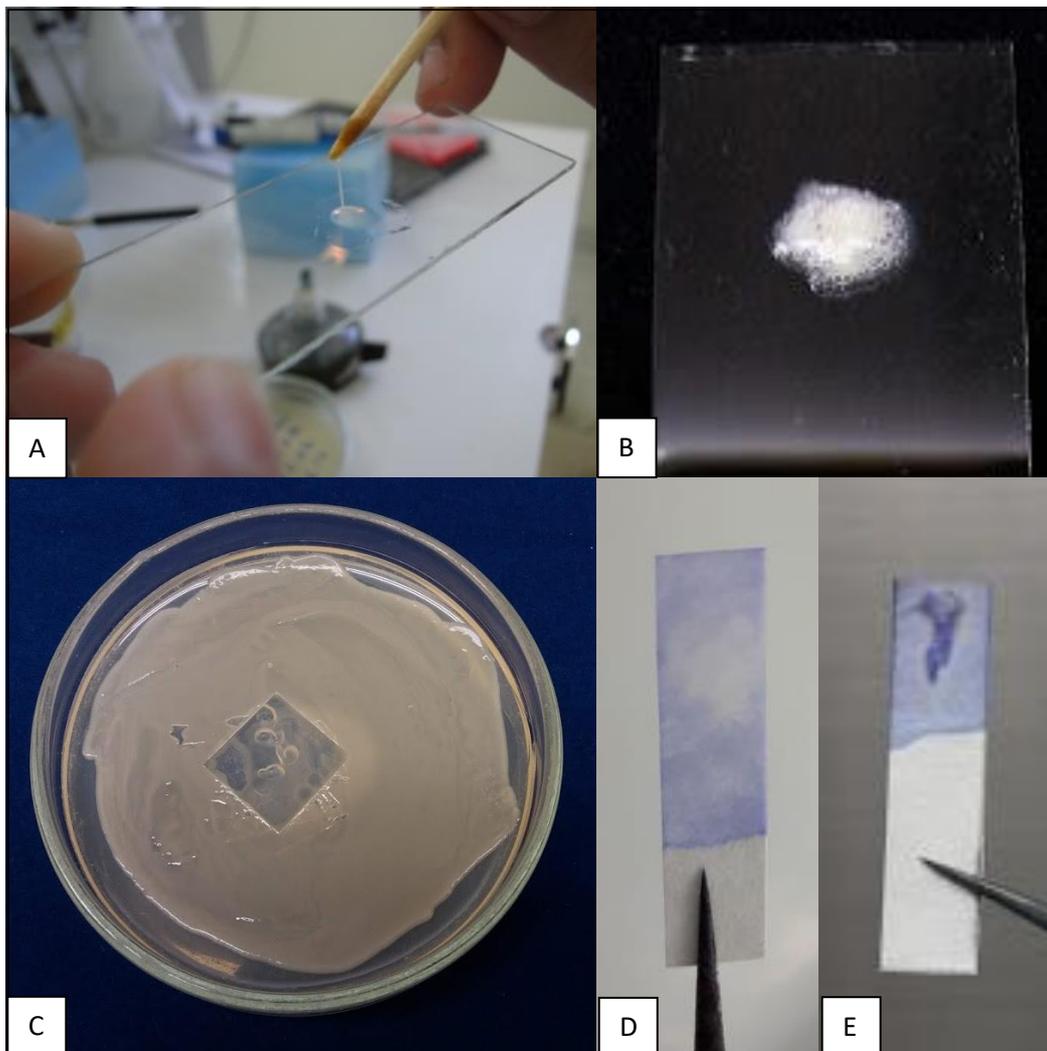


### 4.2 Caracterização bioquímica e fisiológica

Conforme os resultados das avaliações dos testes bioquímicos e fisiológicos apresentados na Tabela 3, todos os isolados foram Gram negativos, catalase positivos, anaerobiose facultativos e 35 isolados foram oxidase negativos e somente os isolados PMH12, PMH17, PMH31 e PMH32 foram positivos para oxidase, não sendo característica bioquímica comum à família *Enterobacteriaceae* (Figura. 4). De acordo com o fluxograma

dos testes (Figura 1), isolados oxidase positiva podem ser considerados pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, porém, não apresentam colônia fluorescente, típico do gênero.

**Figura 4** - Resultados de testes bioquímicos e fisiológicos para a caracterização de isolados de pectobactéria: Gram (A); catalase (B); anaerobiose (C); oxidase negativa (D); oxidase positiva (E).



**Tabela 3.** Características bioquímicas e fisiológicas dos isolados causadores de podridões moles oriundos de diversos hospedeiros. Lavras, MG. 2018.

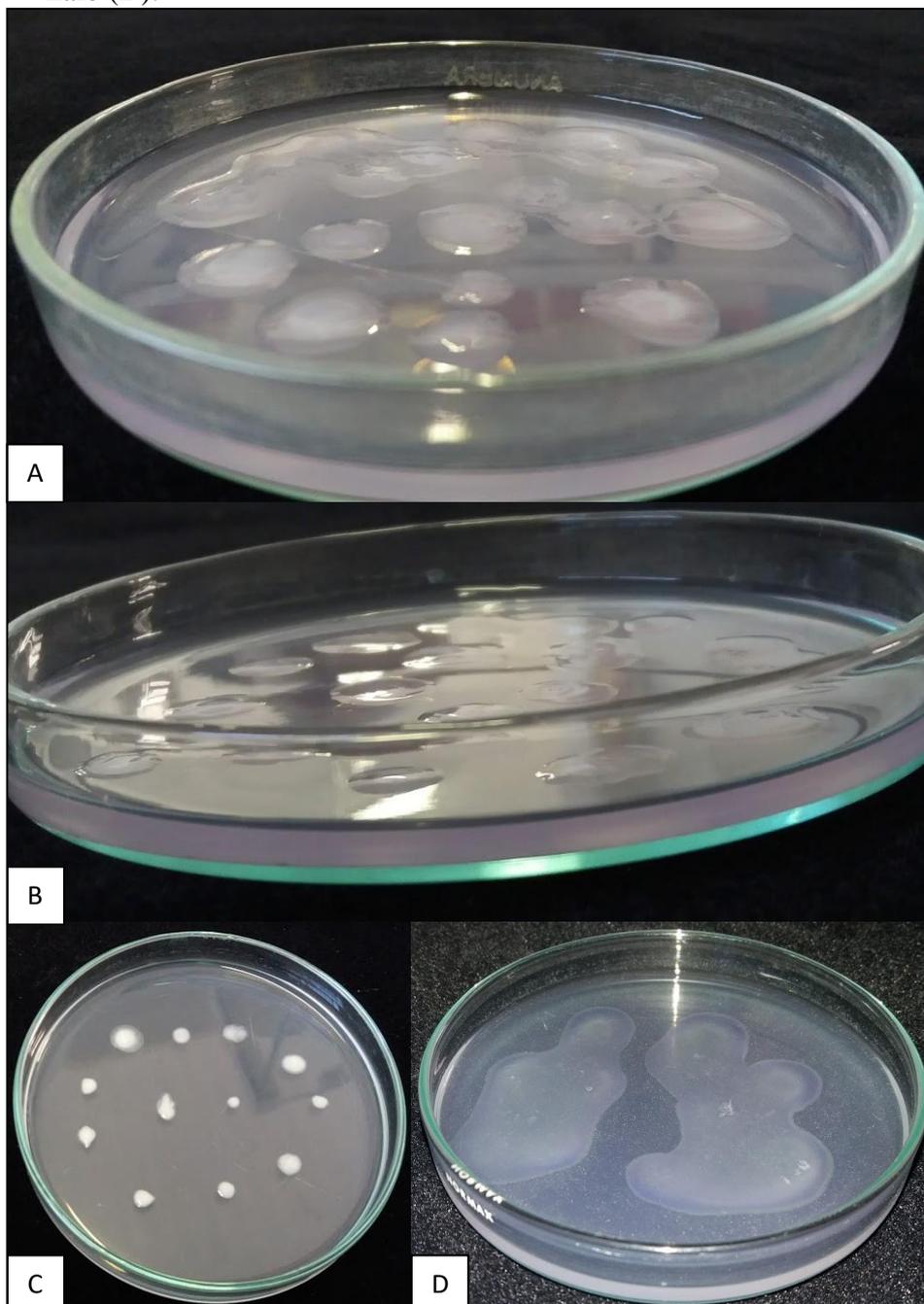
Isolados	Oxidase	Catalase	Gram	Anaerobiose	YDC	Crescimento a 37°C	Sensibilidade a eritromicina	Degradação de Pectato		Isca Biológica	
								Depressão	Halo	Pimentão	Batata
1131 Pcc <sup>R</sup>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
863 Pcc <sup>T</sup>	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
1383 Pch <sup>R</sup>	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
1692Pcbr <sup>T</sup>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
55	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
46	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
PMF1	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+
PMF2	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+
PMF3	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
PMF4	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMF5	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH1	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH2	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
PMH3	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH4	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH5	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH6	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
PMH7	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH8	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
PMH10	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
PMH12	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH13	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
PMH14	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH15	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
PMH16	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH17	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
PMH18	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+

PMH19	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
PMH20	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
PMH21	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH22	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
PMH23	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH24	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
PMH25	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
PMH26	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
PMH27	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
PMH28	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
PMH29	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH30	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PMH31	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
PMH32	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
PMH33	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
PMH34	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
PM2	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
PM3	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+

Legenda:<sup>T</sup> – Isolado tipo. <sup>R</sup> – Isolado referência. 1131 *Pcc* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), 863 *Pcc* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), 1692 *Pcbr* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*), 1383 *Pch* (*Dickeya chrysanthemi*), 46 (*Pectobacterium carotovorum*), 55 (*Pectobacterium carotovorum*).

No teste de degradação do pectato, dos 39 isolados, somente 21 degradaram o meio e apresentaram halo, enquanto 9 formaram apenas halo, e 9 não causaram depressão do meio de cultura e nem formaram halo (Figura 5) (Tabela 3). O presente teste também foi utilizado por Leite et al. (2014), para comprovar a ação pectinolítica de isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* na cultura batata.

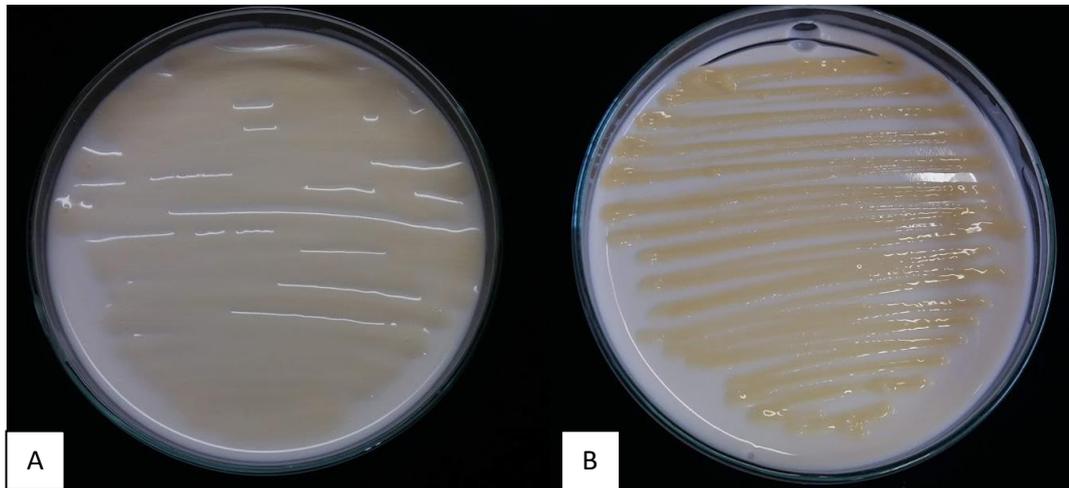
**Figura 5** - Resultado do teste de degradação do pectato. Isolado positivo para o teste, com depressão do meio de cultura violeta pectato e formação de halo (A), visão inclinada da depressão do meio (B), resultado negativo para o teste, sem depressão do meio e ausência de halo (C) e isolado com apenas formação de halo (D).



No teste de crescimento em YDC, 38 isolados apresentaram colônias de coloração creme, com bordos irregulares e opacas em meio YDC (DE BOER; KELMAN, 2001), características também descritas por El Tassa e Duarte (2004), que podem ser observadas na figura 6A.

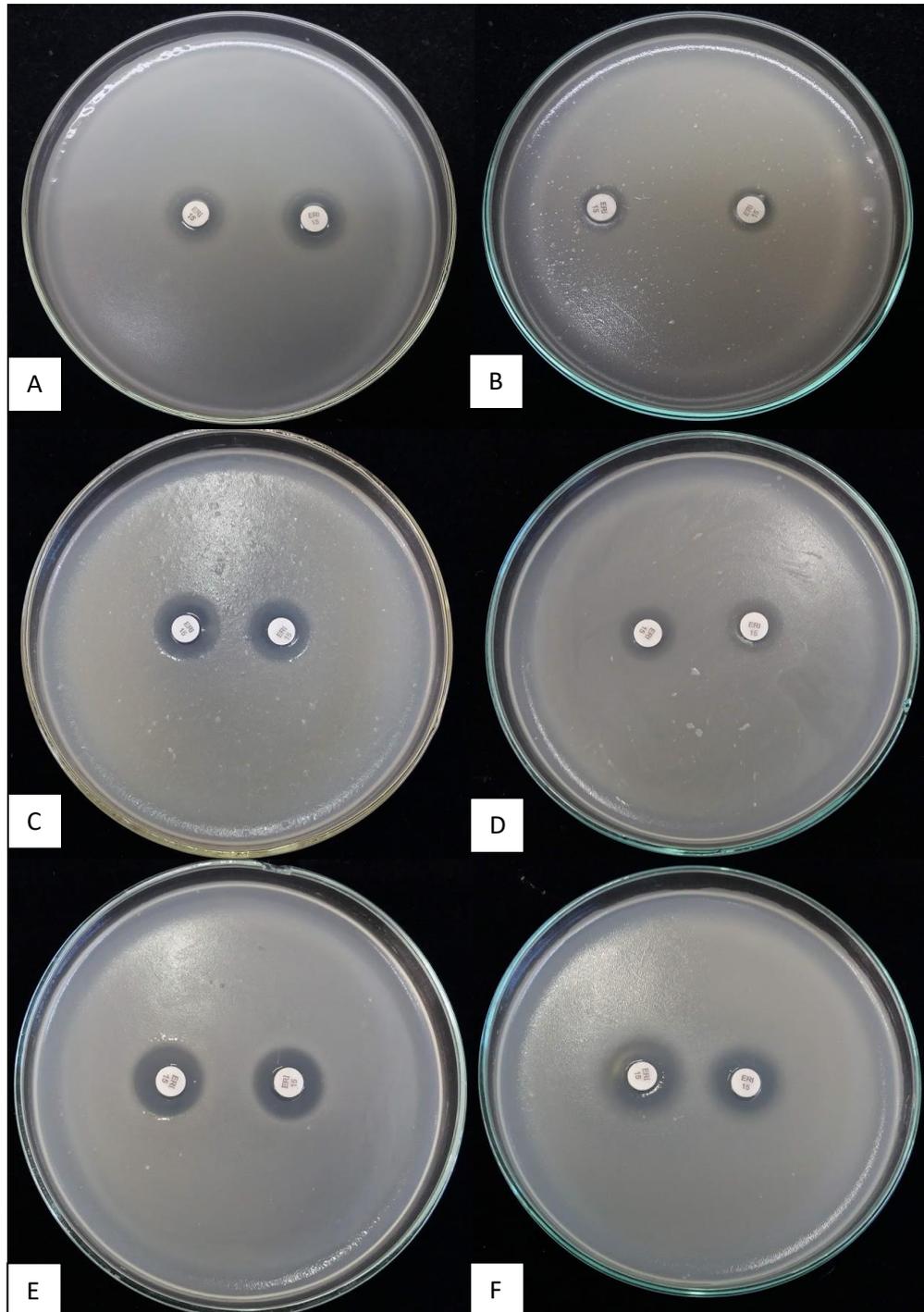
No entanto, apenas o isolado PMH13 apresentou colônias de coloração amarelada ao ser submetido ao teste de crescimento em YDC (Figura 6B), o que levanta a hipótese que o isolado seja do gênero *Pantoea*, já que ao apresentar crescimento anaeróbico facultativo descarta a possibilidade que seja *Xanthomonas* (SCHAAD et al., 2001).

**Figura 6** - Resultado do teste YDC. Característica da colônia bacteriana obtida pelos 38 isolados em estudo (A), aspecto da colônia bacteriana apresentada apenas pelo isolado PMH13 (B).



Nos testes para identificação ao nível de gênero, observou-se que seis isolados apresentaram sensibilidade a eritromicina (Tabela 3) levantando a hipótese de serem pectobactérias da espécie *D. chrysanthemi* conforme descrito por Schaad et al. (2001), com exceção do isolado PMH13 (Figura 7D) que ao ser cultivado em YDC apresentou colônias de coloração amarelada.

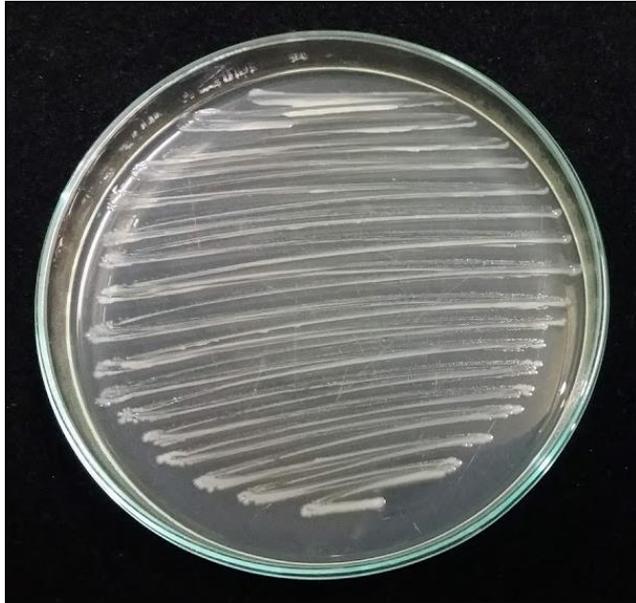
**Figura 7** - Sensibilidade dos isolados causadores de podridão mole a eritromicina. Isolado PMHF1 (A); PMHF2 (B); PMH8 (C); PMH13 (D); PMH22 (E); PMH24 (F).



A resistência bacteriana a eritromicina pode ser atribuída a uma alteração da região 23S rRNA por uma adenina específica, N-metiltransferase (Metilase) especificada por uma classe de genes com o nome *erm* (Metilação do ribossoma eritromicina) (WEISBLUM et al., 1995).

Todos os isolados apresentaram crescimento a 37° C (Figura 8), característica que os diferenciam de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (DE BOER; KELMAN, 2001).

**Figura 8** - Isolado PMH21 submetido ao teste de crescimento a 37°C em meio NA.

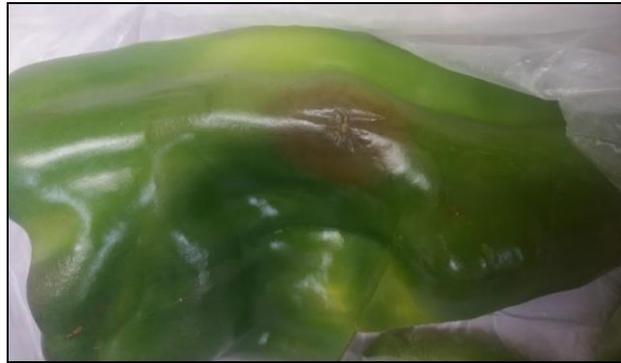


Todos isolados preservados foram submetidos ao teste de isca biológica com o tubérculo de batata e foram positivos, apresentando maceração do tecido causado pela ação pectinolítica das bactérias (Figura 9). No pimentão, os sintomas característicos observados para os isolados PMH15, PMH17, PMH18, PMH26 e PM3 foram formação de halo de maceração e escurecimento do tecido ao redor do ponto de inoculação da bactéria (Figura 10). Segundo trabalho de Benelli et al. (2004), a isca biológica de pimentão verde pode ser usado como um meio semi-seletivo para definir isolados pertencentes ao gênero *Pectobacterium* do grupo *carotovorum*.

**Figura 9** - Resultado positivo do teste de isca biológica apresentando maceração do tubérculo.



**Figura 10** - Resultado com características típicas apresentadas pelos isolados positivos para o teste de isca biológica em pimentão verde.



Com relação aos isolados referência utilizados para fins de comparação, todos os 6 foram submetidos às provas bioquímicas. Todos foram Gram negativos, catalase positivos, anaerobiose facultativos, negativos para oxidase, negativos para o crescimento em YDC, cresceram a 37°C e no teste de degradação do meio pectato todos apresentaram halo, mas apenas o isolado 46 não degradou o meio. Já no teste de isca biológica em pimentão verde o isolado 1131 Pcc foi o único com resultado positivo. Para o teste de sensibilidade a eritromicina somente os isolados 1131 Pcc e 1692 Pcbr foram negativos.

Diante desses resultados, é considerado que há possíveis falhas na caracterização dos isolados referências. Pois, sabe-se a dificuldade de caracterizar pectobactérias apenas por testes bioquímicos. Não consta na literatura e nem em banco de dados a caracterização genotípica dos isolados 1131 Pcc e 1383 Pch para comprovação das espécies.

### 4.3 Identificação por PCR

O resultado da eletroforese dos produtos do PCR realizado com os oligonucleotídeos da região IGS, demonstrou variabilidade genética entre os isolados em estudo. No uso da tríade de oligonucleotídeos 1491f/L1RA/L1RG houve amplificação do PCR para todos os 39 isolados, mas com resultados diferentes dos observados por Fessehaie et al. (2002) ao estudarem a relação taxonômica entre espécies e subespécies de pectobactérias procedentes de vários países e hospedeiros de diversas culturas.

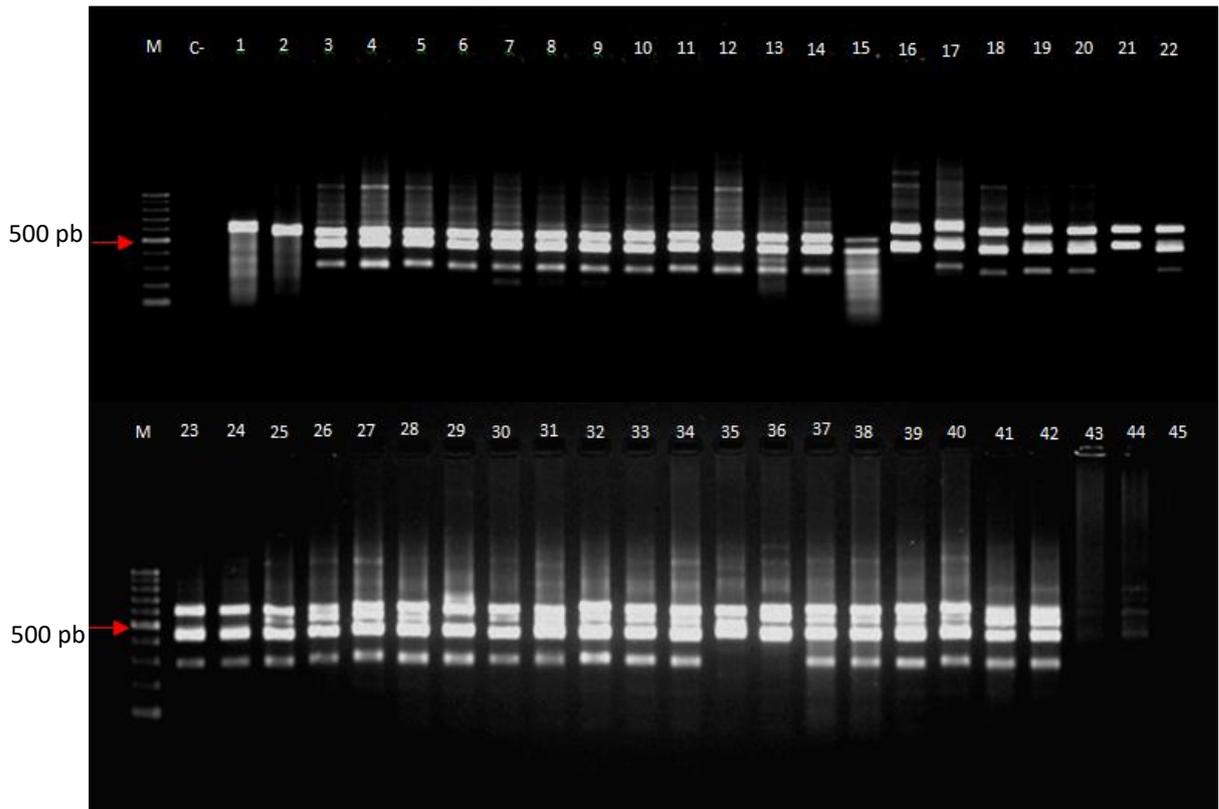
Em relação ao tamanho dos fragmentos gerados, Fessehaie et al. (2002) identificaram que estirpes de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, subsp. *carotovorum* e subsp. *betavasculatorum* geravam fragmentos de aproximadamente 510 e 550 pb, o que diferenciava de estirpes de *D. chrysanthemi* por apresentarem uma banda adicional de 480 pb.

No presente trabalho, 16 isolados apresentaram fragmentos de  $\approx 510$  e  $\approx 550$  pb e uma adicional de  $\approx 480$  pb (Figura 11). Considerando a proximidade dos fragmentos obtidos, os isolados possivelmente sejam pertencentes ao gênero *D. chrysanthemi*. No entanto, com exceção do isolado PMH13, as estirpes não apresentaram sensibilidade a eritromicina tornando o resultado inconclusivo. Já o PMH13 que apresentou sensibilidade a eritromicina e em seguida obteve os padrões de bandas para *D. chrysanthemi*, também não pode ser considerado pertencente à espécie por não apresentar coloração da colônia característica no teste de YDC.

Para o restante dos isolados, 12 obtiveram fragmentos de aproximadamente 510 e 480 pb e 8 isolados apresentaram  $\approx 550$  e  $\approx 480$  pb (Figura 11). Somente 3 isolados não apresentaram amplificação. Outro aspecto observado foi a presença de uma banda inespecífica com aproximadamente 300 pb em 33 isolados. Porém, os *primers* permitiram a diferenciação entre os isolados causadores de podridão do presente trabalho com os isolados referência, 1131 Pcc e 46 identificados como pertencentes ao gênero *Pectobacterium*.

Os tamanhos de bandas que diferiram daquelas citadas na literatura é um fator que torna o resultado inconclusivo, demonstrando a inespecificidade da tríade de *primers* e necessitando de mais estudos em decorrência das características intermediárias apresentadas pelos isolados em estudo. El Tassa e Duarte (2004) pontuam a carência de referências sobre a ocorrência de pectobactérias de formas intermediárias nas condições brasileiras.

**Figura 11** - Eletroforese em gel de agarose para DNA amplificado por PCR de isolados causadores de podridões moles, utilizando-se o conjunto de *primers* desenvolvidos a partir da região IGS que separam *P. carotovorum* de *D. chrysanthemi*. **M** – Marcador e peso molecular 100 pb; **C-** – Controle negativo; **1** – 1131 Pcc; **2** – 46; **3** – 1383 Pch; **4** – PMF5; **5** – PMH1; **6** – PMH3; **7** – PMH4; **8** – PMH5; **9** – PMH8; **10** – PMH15; **11** – PMH18; **12** – PMH21; **13** – PMH23; **14** – PMH29; **15** – PMH30; **16** – 55; **17** – PMF1; **18** – PMH10; **19** – PMH19; **20** – PMH20; **21** – PMH22; **22** – PMH24; **23** – PMH25; **24** – PMH27; **25** – PMH31; **26** – 863 Pcc; **27** – 1692 Pcbr; **28** – PMF2; **29** – PMF3; **30** – PMF4; **31** – PMH2; **32** – PMH6; **33** – PMH7; **34** – PMH12; **35** – PMH13; **36** – PMH14; **37** – PMH16; **38** – PMH17; **39** – PMH26; **40** – PMH28; **41** – PM2; **42** – PM3; **43** – PMH32; **44** – PMH33; **45** – PMH34.

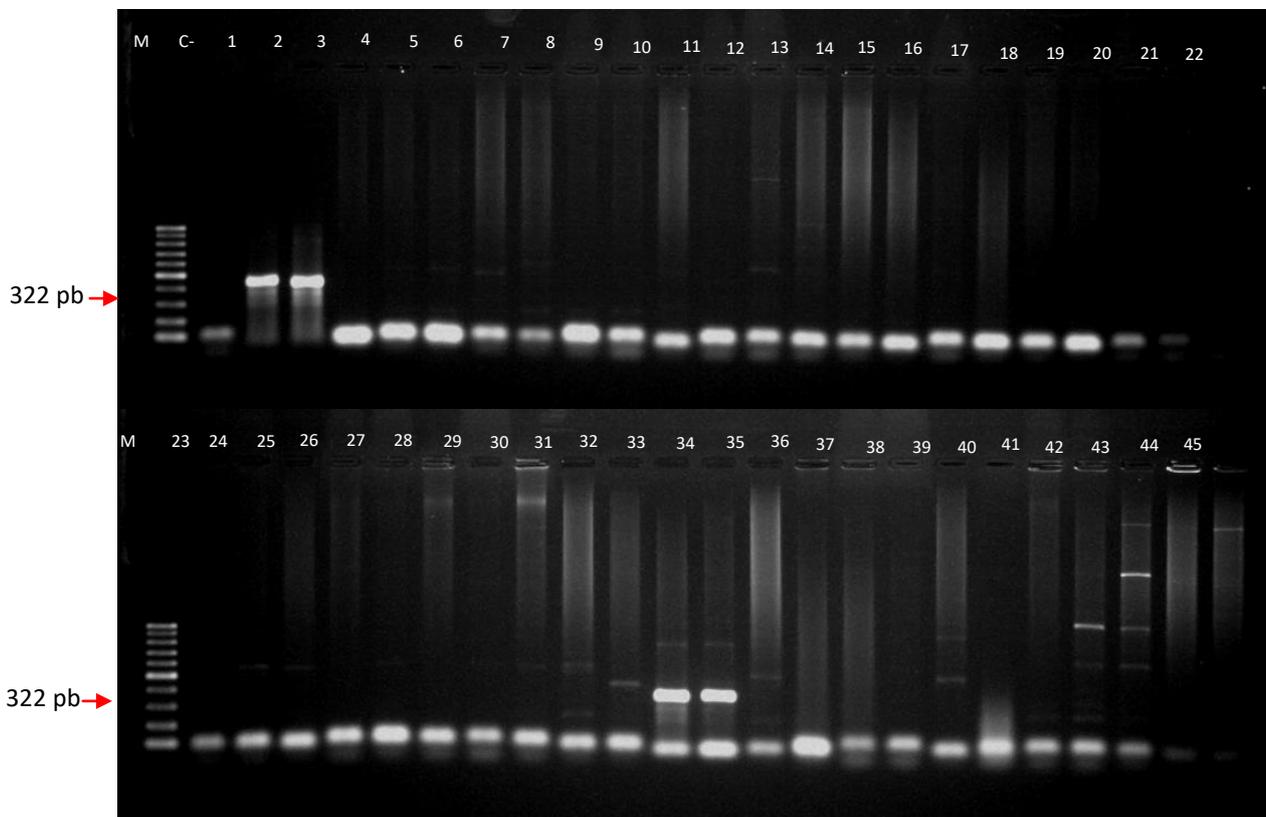


Na PCR usando os oligonucleotídeos Br1f/L1RA/L1RG específicos para *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, os isolados PMH16 e PMH17 foram os únicos que amplificaram fragmentos de 322 pb (Figura 12), além disso, apresentaram alta atividade macerativa e não foram sensíveis a eritromicina (Tabela 2), tais características também citadas por Segundo Duarte et al. (2004) ao caracterizarem bioquimicamente estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

Esta espécie foi identificada por El Tassa e Duarte (2004), utilizando os mesmos oligonucleotídeos para a região IGS, em tubérculos de batata-semente no Rio Grande do Sul com podridão.

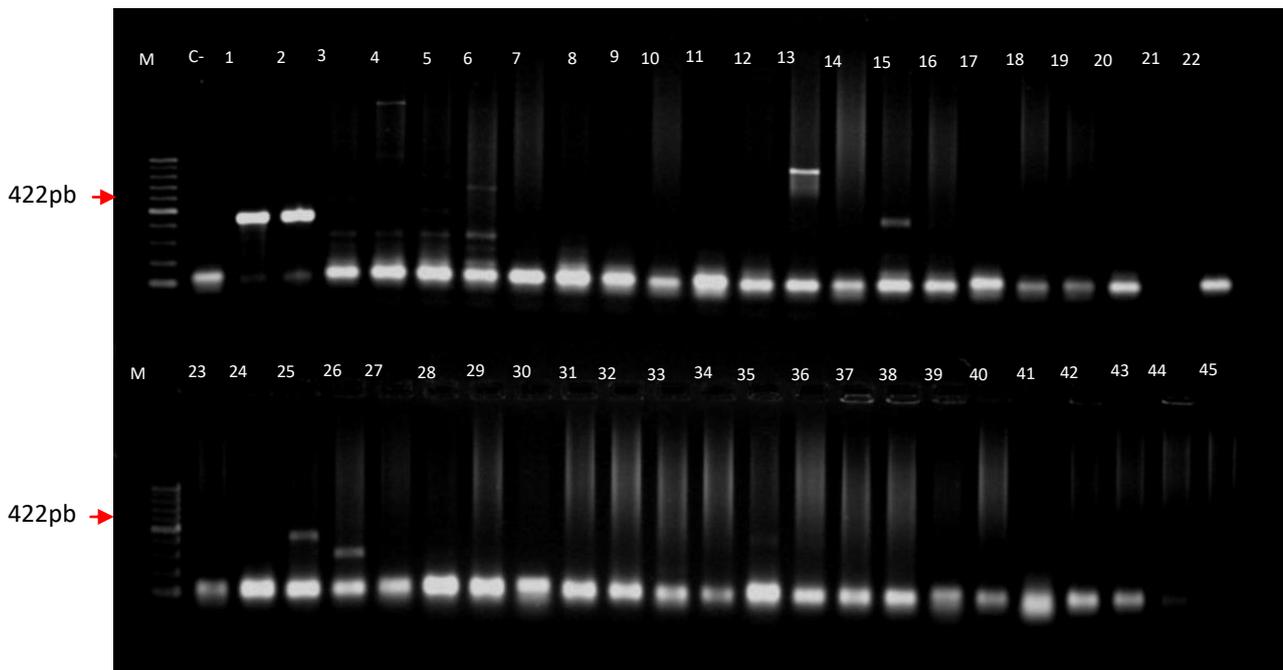
Recentemente, Moraes et al. (2017) confirmaram que a podridão mole em abobrinha no Brasil também é causada por *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Roskopf e Hong (2016) publicaram o primeiro relato de podridão bacteriana do caule de tomate, causada por *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* na Flórida, subespécie também identificada em outros países europeus como na Holanda (LEITE et al., 2014).

**Figura 12** - Eletroforese em gel de agarose para DNA amplificado por PCR de isolados causadores de podridões moles, utilizando-se o conjunto de *primes* desenvolvidos a partir da região IGS, específicos para *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. O *amplicon* do produto do PCR esperado é de 322 pb. **M** – Marcador e peso molecular 100 pb; **C** – Controle negativo; **1** – 1131 Pcc; **2** – 46; **3** – 55; **4** – 863 Pcc; **5** – 1692 Pcc; **6** – 1383 Pch; **7** – PMF5; **8** – PMH1; **9** – PMH3; **10** – PMH4; **11** – PMH5; **12** – PMH8; **13** – PMH15; **14** – PMH18; **15** – PMH21; **16** – PMH23; **17** – PMF1; **18** – PMH10; **19** – PMH20; **20** – PMH22; **21** – PMH24; **22** – PMH25; **23** – PMH27; **24** – PMF2; **25** – PMF3; **26** – PMF4; **27** – PMH2; **28** – PMH6; **29** – PMH7; **30** – PMH12; **31** – PMH13; **32** – PMH14; **33** – PMH16; **34** – PMH17; **35** – PMH26; **36** – PMH28; **37** – PM2; **38** – PM3; **39** – PMH19; **40** – PMH29; **41** – PMH30; **42** – PMH31; **43** – PMH32; **44** – PMH33; **45** – PMH34.



O gene *pel* é utilizado como um gene codificador de pectato-liase, e foi desenvolvido para teste de PCR com objetivo de identificar espécies do gênero *Pectobacterium carotovorum*. Dessa forma, foi observado no presente trabalho que entre os isolados, somente o isolado referência 1131 Pcc e a estirpe 46 apresentaram o tamanho de banda de 422 pb, comprovando que os isolados são pertencente ao gênero em questão. Eles também foram os únicos entre os isolados que apresentaram padrões de bandas diferenciados para a região IGS (Figura 11), com aproximadamente 600 e 550 pb. Resultado que também difere do observado por Fessehaie et al. (2002).

**Figura 13** - Eletroforese em gel de agarose para DNA amplificado por PCR de isolados causadores de podridões moles, utilizando-se o conjunto de *primes* desenvolvidos a partir da região gene *pel*. O *amplicon* do produto do PCR esperado é de 422 pb. **M** – Marcador de peso molecular 100 pb; **C-** – Controle negativo; **1** – 1131 Pcc; **2** – 46; **3** – 55; **4** – 863 Pcc; **5** – 1692 Pcbr; **6** – 1383 Pch; **7** – PMF5; **8** – PMH1; **9** – PMH3; **10** – PMH4; **11** – PMH5; **12** – PMH8; **13** – PMH15; **14** – PMH18; **15** – PMH21; **16** – PMH23; **17** – PMF1; **18** – PMH10; **19** – PMH20; **20** – PMH22; **21** – PMH24; **22** – PMH25; **23** – PMH27; **24** – PMF2; **25** – PMF3; **26** – PMF4; **27** – PMH2; **28** – PMH6; **29** – PMH7; **30** – PMH12; **31** – PMH13; **32** – PMH14; **33** – PMH16; **34** – PMH17; **35** – PMH26; **36** – PMH28; **37** – PM2; **38** – PM3; **39** – PMH19; **40** – PMH29; **41** – PMH30; **42** – PMH31; **43** – PMH32; **44** – PMH33; **45** – PMH34.



No *Nested-PCR* específico para identificação de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, não houve amplificação de DNA em nenhuma das duas reações para todos os isolados (Dados não apresentados), sendo confirmada a ausência desta espécie entre as estirpes.

No PCR realizado com os oligonucleotídeos ERWFOR e CHRREV (SMID et al., 1995) para identificação da espécie *Dickeya chrysanthemi*, não foram obtidos fragmentos de 450 pb determinados para a espécie. O produto da reação gerou várias bandas inespecíficas tornando o resultado inconclusivo (Dados não apresentados).

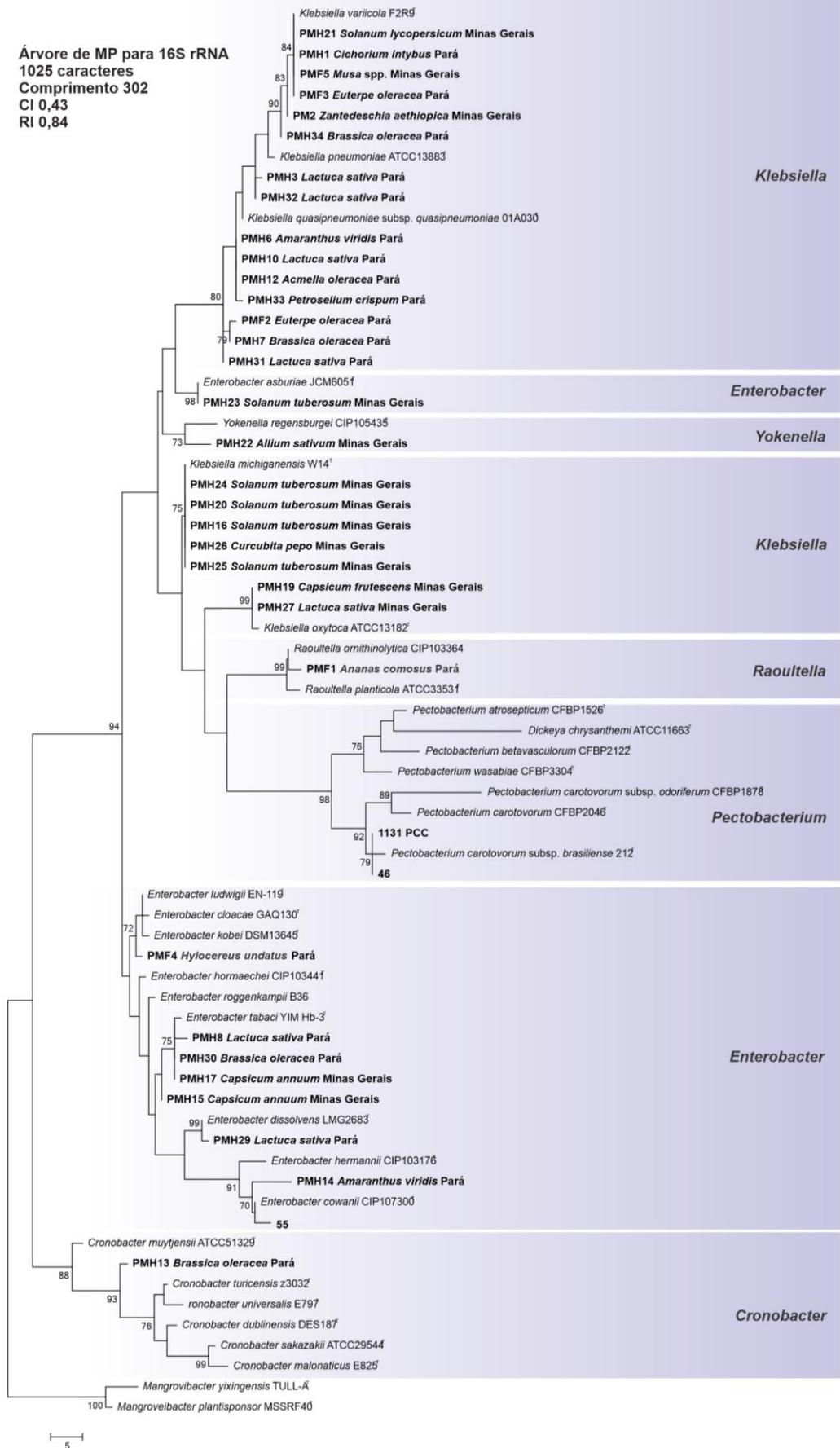
#### 4.4 Análise filogenética

O alinhamento das sequências da região 16S rRNA resultou em 1025 pb, destes 104 pb eram sítios variáveis e 88 pb sítios informativos. A análise filogenética de MP mostrou que

os isolados avaliados agruparam em seis gêneros distintos, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Raoultella*, *Yokenella*, *Pectobacterium* e *Cronobacter* (Figura 14).

**Figura 14** - Árvore de máxima parcimônia de espécies de fitobactérias causadoras de podridões moles baseada em sequências da região 16S rDNA. A árvore foi enraizada com sequências dos isolados das espécies *Mangroveibacter plantisponsor* e *Mangrovibacter yixingensis*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de *bootstrap* (1.000 replicações)  $\geq 70$  % são indicados nos internódios. Códigos dos isolados avaliados estão em negrito. T = isolado tipo; CI = Índice de consistência; RI = Índice de retenção.

Árvore de MP para 16S rRNA  
 1025 caracteres  
 Comprimento 302  
 CI 0,43  
 RI 0,84



A maioria dos isolados agruparam dentro de *Klebsiella* e formaram três clados que correspondem as espécies já descritas *K. variicola*, *K. oxytoca* e *K. michiganensis*.

5 isolados se agruparam ao clado de *Klebsiella michiganensis*, destes 4 foram isolados de batata (*Solanum tuberosum*) provenientes do Estado de Minas Gerais. A cultura da batata pode ser mais susceptível a essa espécie que outras culturas.

*Klebsiella michiganensis* foi identificada primeiramente no estado de Michigan, EUA, onde a estirpe tipo foi isolada de um porta-escovas de dentes durante um estudo de investigação dos pontos quentes microbianos em domicílio residencial (SAHA et al., 2004). Yu et al. (2017) mostraram que cepas de *Klebsiella michiganensis* produzem enzimas degradadoras da parede celular de plantas e colonizam as raízes do arroz, mas sem indícios de incitar podridão mole. Além disso, produzem sideróforos e contém os conjuntos de genes para síntese e transporte de yersiniabactin, que é um fator crítico de virulência para os patógenos de *Klebsiella* que causam doenças humanas (YU et al., 2017).

A espécie *Klebsiella variicola* foi a qual houve similaridade com um maior número de isolados de diferentes culturas e localidades. O que aponta que esta espécie está amplamente distribuído nos Estados do Pará e Minas Gerais e possuem uma ampla gama de hospedeiros.

*Klebsiella variicola* foi originalmente identificada como um endossimbionte benigno em plantas, mas desde então tem sido associada a doenças em humanos e bovinos (ROSENBLUETH et al., 2004). Recentemente, têm-se relatos desse patógeno causando podridão mole em banana na China (FAN et al., 2016) e em cenoura na Índia (CHANDRASHEKAR et al., 2018). Enquanto que *Klebsiella pneumoniae*, a espécie mais importante do gênero, já foi identificada causando podridão mole em bulbos de cebola na Venezuela (RODRÍGUEZ et al., 2015).

Em um grau muito menor, a *K. oxytoca* foi isolada de espécimes clínicos humanos nos Estados Unidos e na Europa (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Tal espécie também identificada neste trabalho causando podridão mole em 2 isolados do Estado de Minas Gerais.

Dentro de *Enterobacter* três grupos monofiléticos foram formados e correspondem as espécies *E. asburiae*, *E. tabaci* e *E. dissolvens*. Algumas espécies de *Enterobacter* já possuem vários estudos que comprovam que são causadores de doenças em vegetais, como a espécie *E. cloacae* relatada em milho, cenoura, cebola, mamão, orquídea e entre outras (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2018).

Os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* se mostraram polifiléticos na filogenia baseada na região 16S rDNA e alguns isolados que agruparam dentro desses gêneros não formaram

grupos monofiléticos por falta de polimorfismo na região analisada para discriminação de espécies.

A tríade de primer Br1f/L1RA/L1RG identificou dois isolados da espécie *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* associado a podridão mole das culturas da batata e do pimentão (*Capsicum annuum*) provenientes do município de Lavras, MG. No entanto o resultado não obteve suporte pelo estudo filogenético, pois os isolados PMH16 e PMH17 se agruparam em clados dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*, respectivamente, demonstrando a inespecificidade dos *primers*.

Apenas o isolado PMF1 procedente do Pará se agrupou ao clado com os acessos do gênero *Raoultella* spp., mas não foi possível a definição de espécie. Tal, gênero proposto por Drancourt et al. em 2001, inicialmente pertencente a ao gênero *Klebsiella*. As espécies *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* e *Raoultella terrigena* podem ser isolados da água, solo, plantas, insetos, peixes e ocasionalmente mucosas de mamíferos, incluindo espécimes humanos. (DRANCOURT et al., 2001; NAKASONE et al., 2015).

A primeira infecção humana causada por *R. ornithinolytica* foi relatada em 2009 (MORAIS et al. 2009; VOS; LAUREYS, 2009). Na última década, *R. ornithinolytica* emergiu como um agente causal de infecções humanas menos frequente, porém importante. No entanto, a identificação correta das espécies de *Raoultella* é muito difícil (NAKASONE et al., 2015). Até o presente momento, não se têm relatos de podridões moles incitados por essas espécies.

O isolado PMH13 foi o único que apresentou homologia ao gênero *Cronobacter* sp. No entanto, apesar dos altos valores de *bootstrap* do clado não foi possível definir a espécie do isolado em questão. Com base nos resultados fenotípicos da colônia realizado pelo teste YDC, o isolado apresentou colônia amarela contribuindo com a identificação genotípica, pois o gênero *Cronobacter* é produtor de pigmento amarelo (FARMER III, 2015).

A estirpe isolada de alho (*Allium sativum*) coletado no Estado de Minas Gerais se agrupou com a espécie *Yokenella regensburgei*, porém, a definição de espécie não é possível pelo baixo suporte do clado de 73% de *bootstrap*. A espécie *Yokenella regensburgei* já foi isolada de insetos, ambiente geral, como na água de poço e de fontes clínicas (KOSAKO et al., 1984; CHI, X.; LIU, M.; CHEN, Y., 2017; MEDINA et al., 2018) e também foi identificada em plantas como microrganismo endófito promotor de crescimento, sem causar sintomas aparentes ou imediatos de doença (PURI et al. 2018).

O isolado PMF1 não se agrupou com espécies já descritas de *Raoultella*, assim como o isolado PMH13 dentro gênero *Cronobacter* e PMH22 dentro de *Yokenella*. Provavelmente estes isolados podem ser representantes de novas espécies dentro destes gêneros.

Os isolados 863 Pcc (ICMP 5702) e 1692 Pcbr (ICMP 19479) não foram sequenciados, pois já possuem suas sequências depositadas no banco de dados *GenBank*. No entanto, dos quatros isolados referência submetidos ao sequenciamento, apenas 2 (1131 Pcc e 46) se agruparam com o isolado tipo de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, enquanto, o isolado 55 se agrupou ao clado do gênero *Enterobacter*.

Os 7 isolados, PMH2, PMH4, PMH5, PMH18 e PMH28, PM3 e 1383 Pch não foram possíveis identificá-los com base na filogenia da região 16S rDNA. Este fato pode ser explicado pela baixa qualidade das sequências ou pelo baixo polimorfismo da região estudada.

## 5. CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos obtidos de diferentes plantas hospedeiras com sintomas de podridões moles apresentaram características intermediárias, dificultando a identificação e caracterização em nível de gênero pelos testes bioquímicos utilizados.

Com relação aos métodos moleculares, os *primers* da região do gene *pel* foram eficientes na identificação dos isolados pertencentes à espécie *Pectobacterium carotovorum*.

O sequenciamento da região 16S rDNA, foi eficaz na definição dos gêneros da maioria dos isolados bacterianos causadores de podridões moles. Este foi o primeiro relato no Brasil dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Raoultella*, *Yokenella* e *Cronobacter* como fitopatógenos.

## REFERÊNCIAS

- ABU-OBEID, I.; KHLAIF, H.; SALEM, N. Detection and identification of bacterial soft rot of potato *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using specific PCR primers in Jordan. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 39, p. 2910-2918, 2017.
- AKRAMIPOUR, N. et al. Genetic diversity of some isolates of soft rot *Pectobacterium*, from different host plants in Fars province, Iran, using RAPD marker. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 1825-1835, 2016.
- ANDRÉS-BARRAO C. et al. Complete Genome Sequence Analysis of *Enterobacter* sp. SA187, a Plant Multi-Stress Tolerance Promoting Endophytic Bacterium. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 20-23, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.02023.
- AUSUBEL, F.M. et al. (Ed.). **Current Protocols in Molecular Biology**. Vol.1. New York: John Wiley and Sons, 1987.
- AVROVA, A. O.; HYMAN, J.; TOTH R. L; TOTH, I. K. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. **Journal Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1499–1508, 2002. 10.1128/AEM.68.4.1499-677 1508.2002
- BENELLI, A. I. H. et al. 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**. Vol. 29, n. 2 (mar./abr. 2004), p. 681 155-159, 2004.
- BERTHEAU, Y. et al. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: Pérombelon, M. C. M. & Van Der Wolf, J. M. (Eds.) Methods for detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* potatoes: **Laboratory Manual. Dundee**. Scottish Crop Research Institute. p. 38-48, 1998.
- BLACK, R.; HOLT, J.; SWEETMORE, S. **BACTID**: Bacteriological identification system for resource-poor plant pathology laboratories. Chatham: Natural Resources Institute, p. 31, 1996.
- BOARI, A. de J. et al. Doenças em hortaliças cultivadas na Região Metropolitana de Belém. **Embrapa Amazônia Oriental-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, p. 57, 2017.
- BRADY, C. L. et al. Proposal to reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand and Schroth 1967) Hauben et al. 1999 into a new genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* comb. nov., descriptions of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* subsp. *iberica* subsp. nov. and *Lonsdalea quercina* subsp. *britannica* subsp. nov., emendation of the description of the genus *Brenneria*, reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* comb. nov., and emendation of the description of *Dickeya dadantii*. International DW, **B Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p.1592- 602, 2012.
- CAPPELLINI, R. A.; CEPONIS, M. J.; WELLS, J. M.; LIGHTNER, G. W. Disorders in potato shipments to the New York Market. **Plant Disease**, v. 68, p. 1018–1020, 1984.

- CARDOZA, Y. F.; DUARTE, V.; LOPES, C. A. First Report of Blackleg of Potato Caused by *Dickeya solani* in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 1, p. 243-243, 2017.
- CARDOZA, Y. F.; DUARTE, V.; LOPES, C. A. Registro de *Dickeya solani* associada à batata no Brasil. **Embrapa Hortaliças-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2017.
- CEPONIS M. J.; CAPPELLINI, R. A.; LIGHTNER, G. W. Disorders in fresh pepper shipments to the New York market, 1972–1984. **Plant Disease**, v. 71, p. 380–382, 1987.
- CEPONIS, M. J.; CAPPELLINI, P. A.; LIGHTNER, G. W. Disorders in tomato shipments to the New York market, 1972–1984. **Plant Disease**, v. 70, p. 261–265, 1986.
- CEPONIS, M. J.; CAPPELLINI, R. A.; LIGHTNER, G. W. Disorders in crisphead lettuce shipments to the New York Market. **Plant Disease**, v. 69, p. 1016–1020, 1985.
- CHANDRASHEKAR, B. S. et al. First report of bacterial soft rot of carrot caused by *Klebsiella variicola* in India. **New Disease Reports**, v. 37, p. 21-21, 2018.
- CHI, Xiangbo; LIU, Min; CHEN, Yaokai. *Yokenella regensburgei* Septicemia in a Chinese Farmer Immunosuppressed by HIV: A Case Report and Literature Review. **Case reports in infectious diseases**, v. 2017, 2017.
- CUPPELS, D.; KELMAN, A. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. **Phytopathology**, 1974, v. 64, p. 468-475.
- CZAJKOWSKI, R. et al. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. **Annals of Applied Biology**, v. 166, n. 1, p. 18-38, 2015.
- DARRASSE, A. et al. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. **Journal Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1437-1443, 1994.
- DE BOER, S. H.; KELMAN, A. *Erwinia* soft rot group: In: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B., CHUN, W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, St. Paul: **APS Press**, p. 56-72, 2001.
- DE BOER, S. H.; Mc NAUGHTON, M. E. Monoclonal antibodies to the lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* serogroup I. **Phytopathology**, v. 77, p. 828-724, 1987.
- 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.
- DICKEY, R. S. *Erwinia chrysanthemi*: A comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. **Phytopathology**, vol. 69, p. 324-329, 1979.
- DICKEY, R. S.; KELMAN, A. *Erwinia*: "*carotovora*" or soft rot group. In: Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria. p. Schaad, N.W. 2 ed. St. Paul: **APS**. p.44-59, 1988.

- DRANCOURT, M. et al. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 925-932, 2001.
- DUARTE, V. et al. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* causing blackleg of potato in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 96, p. 535-545, 2004.
- DUARTE, V.; EL TASSA, S. O. M. Taxonomia do gênero *Pectobacterium*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, vol. 11, p. 1-41, 2003.
- DYE, D. W. A. Taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The “*carotovora*” group. **New Zealand Journal of Science**. Wellington, v.12, p.81-97, 1969.
- EL TASSA, S. O. M.; DUARTE, V. Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* através de PCR-RFLP do gene recA. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 31, n. 1 (jan./fev. 2006), p. 23-28, 2006.
- EL TASSA, S. O. M.; DUARTE, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata semente no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 29, p. 620- 625, 2004.
- FAN, H. C. et al. First report of banana soft rot caused by *Klebsiella variicola* in China. **Plant Disease**, v. 100, n. 2, p. 517-517, 2016.
- FARMER III, John J. My 40-year history with *Cronobacter/Enterobacter sakazakii*—lessons learned, myths debunked, and recommendations. **Frontiers in pediatrics**, v. 3, p. 84, 2015.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.35, p. 783-791, 1985.
- FESSEHAIE, A.; DE BOER, S. H.; LEVESQUE, C. A. Molecular characterization of DNA encoding 16S-23S RNA intergenic spacer region and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 48, p. 387-398, 2002.
- FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, J. P. How close in close: 16S rRNA sequence identity may not be suficiente to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 166- 170, 1992.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, Tanahiri et al. *Enterobacter cloacae*, an Emerging Plant-Pathogenic Bacterium Affecting Chili Pepper Seedlings. **The plant pathology journal**, v. 34, n. 1, p. 1, 2018.
- GARCIA-MARTINEZ J. et al. RISSC: a novel database for ribosomal 16S–23S RNA gene spacer regions. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 178–180, 2001.
- GARDEN, L. et al. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov., *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 53, p. 381-391, 2003.

- GERHARDT, P. E. Methods for general and molecular bacteriology. Washington: **American Society for Microbiology**, 1994. p. 791.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp.** Ser. v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAUBEN, L. et al. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 21, p. 384-397, 1998.
- HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; DUARTE, V. Erwinia chrysanthemi: pectolytic bacterium causing soft rot outbreaks of arracacha in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1567-1571, 2006.
- HEPPERLE, D. SeqAssem - analysis and contig assembly of sequences. **SequentiX-Digital DNA Processing**, Klein Raden, Germany, 2004.
- HOLT, J. C. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th. Ed. Baltimore, 1994.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Disponível em:** < <http://sidra.ibge.gov.br> >. **Acesso em:** 05 de março de 2019.
- JENKINS, C. et al. *Enterobacteriaceae*. **Infectious Diseases**, p. 1565–1578, 2017. doi:10.1016/b978-0-7020-6285-8.00180-5.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. 1970, v.60, n.6, p.969-976.
- KANG, H. W.; KWON, S. W.; GO, S. J. PCR à base de detecção específica e sensível de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* por iniciadores gerados a partir de uma banda polimórfica URP-PCR fingerprinting derivado. **Plant Pathology**, vol. 52, p. 127-133, 2003. Doi: 10.1046 / j.1365-3059.2003.00822.x
- KHAYI, S. et al. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5379-5383, 2016.
- KOSAKO, Yoshimasa; SAKAZAKI, Riichi; YOSHIZAKI, Etsuro. Yokenella regensburgei gen. nov., sp. nov.: a new genus and species in the family Enterobacteriaceae. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 37, n. 3, p. 117-124, 1984.
- KWON, S. W. et al. Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rRNA gene sequence. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Berlin, v.47, p.1061-1067, 1997.
- KWON, S. W. et al. Phylogenetic analysis of *Pectobacterium* species using the 16s-23s rRNA intergenic spacer regions. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v.16 n.2 p.98- 104, 2000.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *In*: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. John Wiley and Sons, New York., USA, p. 115-175, 1991.

- LEITE, L. N. et al. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in the Netherlands. **New Disease Reports**, vol, 29, p. 24, 2014. Doi: org/10.5197/j.2044-0588.2014.029.024.
- LELLIOTT, R. A.; DICKEY, R. S. Genus VII. *Erwinia* Winslow, Brodahurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkins. p. 469-476, 1984.
- MA, B. M. E. et al. The host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. **Phytopathology**, vol. 97, p.1150–1163, 2007.
- MAKI-VALKAMA, T.; KARJALAINEN, R. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *carotovora* by RAPD-PCR. **Annals of Applied Biology**. p. 125-301, 1994.10.1111/ aab. 1994. 125.issue-2
- MARIANO, R. L. R. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora Universitária, p. 171, 2000.
- MARIANO, R. L. R. et al. Bactérias Fitopatogênicas Pectinolíticas dos Gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, Recife, vol. 2, p.121-153, 2005.
- MARIANO, R. L. R; SOUZA, E. B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife, PE: EDUFRPE, 2016.
- MEDINA, Virginia et al. Characterized non-transient microbiota from stinkbug (*Nezara viridula*) midgut deactivates soybean chemical defenses. **PloS one**, v. 13, n. 7, p. e0200161, 2018.
- MORAES, A. J. G. First Report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* Causing Soft Rot of *Cucurbita pepo* in Brazil. **Plant Disease**, vol. 101, n. 2, p. 379, 2017.
- MORAIS, V. P. et al. Enteric fever-like syndrome caused by *Raoultella ornithinolytica* (*Klebsiella ornithinolytica*). **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 3, p. 868-869, 2009.
- NABHAN, S. et al. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v.63, p.2520-2525, 2013.
- NABHAN, S. et al. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* subsp. nov. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.113, p.904-913, 2012.
- NABHAN, S. et al. The use of two complementary DNA assays, AFLP and MLSA, for epidemic and phylogenetic studies of pectolytic enterobacterial strains with focus on the heterogeneous species *Pectobacterium carotovorum*. **Plant Pathology**, Oxford, v.61, p.498-508. 2011.
- NAKASONE, E. S. et al. Emergence of *Raoultella ornithinolytica* on O 'ahu: a case of community-acquired *R. ornithinolytica* urinary tract infection. **Hawai'i Journal of Medicine & Public Health**, v. 74, n. 5, p. 174, 2015.

- NTUSHELO, K.; MAFOFO, J. Draft genome of a South African strain of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. **brazilian journal of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 11-12, 2017.
- PARKINSON, N. et al. *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 64, p. 2264-266, 2014.
- PÉROMBELOM, M. C. M. Potato blackleg: Epidemiology, host-pathogen interaction and control. **Netherland Journal of Plant Pathology**, vol. 98, p.135-146, 1992.
- PODSCHUN, Rainer; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.
- PUBLIC HEALTH ENGLAND. (2015). Identification of Enterobacteriaceae. **UK Standards for Microbiology Investigations**. ID 16 Issue 4. Disponível em: < <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>>. Acesso em: 20 out. 2018.
- RODRÍGUEZ M. et al. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* CP1 aislada de bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.). **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia**, v. 32, n. 3, 2015.
- ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2 ed. Editora UFV, 2005.
- ROMEIRO, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2001.
- ROSENBLUETH, M. et al. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. **Systematic and applied microbiology**, v. 27, n. 1, p. 27-35, 2004.
- ROSSKOPF, E.; HONG, J. First report of bacterial stem rot of “Heirloom” tomatoes caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in Florida. **Plant Disease**, v. 100, n. 6, p. 1233-1233, 2016.
- SAHA, R., et al. *Klebsiella michiganensis* sp. nov., a new bacterium isolated from a tooth brush holder. **Current microbiology**, v. 66, n. 1, p. 72-78, 2013.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SAMSON, R. et al. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiacal* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 5, p. 1415-1427, 2005.
- SCHAAD, N.W., JONES, J. B.; CHUN, W. (Eds.). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 ed. Saint Paul. **American Phytopathological Society**, 2001.
- SLEDS, W. et al. Genetic diversity of *Erwinia carotovora* strains isolated from infected plants grown in Poland, 2000. **OEPP/EPP Bull.** 30:403–407.10.1111/j.1365-8322338.2000.tb00919.x

- SMID, E. J.; JANSEN, A. H. J.; GORRIS, L. G. M. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. **Plant Pathology**, v. 44, p. 1058-1069, 1995. Doi: 10.1111/j.1365-3059.1995.tb02665.x
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA:DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 846-849, 1994.
- TAKATSU, A.; MELLO, S. C. M.; GARCIA, E. S. D. B. Fruto de pimentão como meio parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 550-551, 1978.
- TAMURA, K., et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- TOTH, I. K. et al. Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **J Appl Microbiol**, v. 87, p.158–850, 1999. 10.1046/j.1365-2672.1999.00808.x
- TOTH, I. K.; AVROVA, A. O.; HYMAN, L. J. Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16s-23s intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. **Journal Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.4070-4076, 2001.
- TOTH, I.K., PRITCHARD, L., BIRCH, P.R.J. Comparative genomics reveals what makes an enterobacterial plant pathogen. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 44 n. 1. p. 305–336, 2006.
- VOS, B.; LAUREYS, M. Giant renal cyst as cause of colic obstruction. **Revue medicale de Bruxelles**, v. 30, n. 2, p. 107-109, 2009.
- WAYNE, L. G. et al. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 463-464, 1987.
- WEISBLUM, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 39, n. 3, p. 577-585, 1995.
- WILSON, E. E.; ZEITOUN, F. M.; FREDRICKSON, D. L. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. **Phytopathology**, v. 57, p. 618-621, 1967.
- YOUNG J. M. et al. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 21, p.153-177, 1978.
- YU, Z. et al. Complete genome sequence of N<sub>2</sub>-fixing model strain *Klebsiella* sp. nov. M5al, which produces plant cell wall-degrading enzymes and siderophores. **Biotechnology reports**, v. 17, p. 6-9, 2018.
- ZHANG, Y., FAN, Q.; LORIA, R. A re-evaluation of the taxonomy of phytopathogenic genera *Dickeya* and *Pectobacterium* using whole-genome sequencing data. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 39, p. 252–259, 2016.