

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**

Instituto Biológico

**Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *DICKEYA* CAUSADORAS
DE QUADROS DE PODRIDÃO MOLE EM NÍVEIS ESPECÍFICOS**

BÁRBARA FERNANDA BORTOLOSSI

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

São Paulo

2018

BÁRBARA FERNANDA BORTOLOSSI

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *DICKEYA* CAUSADORAS
DE QUADROS DE PODRIDÃO MOLE EM NÍVEIS ESPECÍFICOS**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientador:

Profº. Dr. Luis Otávio Saggion Beriam

São Paulo

2018

Eu **Bárbara Fernanda Bortolossi**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: Bárbara Fernanda Bortolossi Data / /

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Bortolossi, Bárbara Fernanda.

Identificação de bactérias do gênero *Dickeya* causadoras de quatro de podridão mole em níveis específicos. / Bárbara Fernanda Bortolossi. - São Paulo, 2018. 48 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2018D.BB019

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Luís Otávio Saggion Beriam.

Versão do título para o inglês: Identification of *Dickeya* genus bacteria causing of soft rot at specific levels.

1. Fitobactérias 2. *Erwinia Chrysanthemi* 3. Patogenicidade 4. *Dickeya* spp
I. Bortolossi, Bárbara Fernanda II. Beriam, Luís Otávio Saggion III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2018/019

FOLHA DE APROVAÇÃO

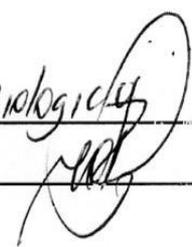
Nome: Bárbara Fernanda Bortolossi

Título: Identificação de bactérias do gênero *Dickeya* causadoras de quadros de podridão mole em níveis específicos.

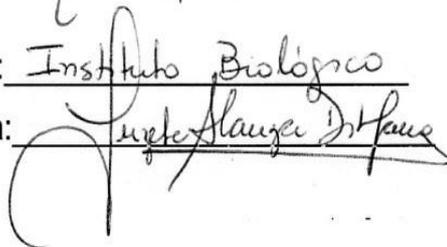
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. LUIS OTAVIO S. BERIAM Instituição: I. Biológico
Julgamento: aprovado Assinatura: 

Prof. Dr. Mariana F. Tonin Instituição: Instituto Biológico
Julgamento: aprovada Assinatura: Mariana F. Tonin

Prof. Dr. Suzete A. L. Destéfano Instituição: Instituto Biológico
Julgamento: aprovada Assinatura: 

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Júlia Maria e Edson, e a toda minha
família, por todo apoio, confiança e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luis Otávio Saggion Beriam, pela atenção, paciência, disponibilidade e auxílio em todo o trabalho, além da amizade e companheirismo.

Aos membros da banca, Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano, Dra. Mariana Ferreira Tonin e Dra. Alessandra Figueiredo de Castro Nassar, pela disponibilidade, carinho e ajuda.

Aos meus amigos queridos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, pelo companheirismo, auxílio, paciência, e principalmente pela amizade, que eu vou levar pro resto da minha vida. Mariana's, Alex, Marcel e Harielly, vocês foram essenciais para que isso fosse possível, obrigada por todo esse tempo que passamos juntos. Suzete e Luis Otávio, obrigada por todos os ensinamentos, admiro vocês ainda mais.

À todos os meus amigos, que mesmo sem saber colaboraram para que isso fosse possível, me dando todo apoio e suporte a qualquer hora do dia e fazendo eu me sentir capaz, em especial a minha amiga Mari, por estar comigo desde a faculdade e ser cada vez mais presente em minha vida.

Às minhas primas amadas Gisela, Gabriela e Camila, e meu primo Gabriel, por todas as conversas, companhias e inspirações enquanto eu desenvolvia essa pesquisa, vocês ocupam um lugar imenso no meu coração e a presença física nada importa comparado ao amor que eu sinto por vocês.

À minha família, minha grande e amada família, vocês jamais imaginariam o quanto são especiais pra mim e o quanto me inspiram todos os dias, mesmo nas menores coisas. Vocês são fenomenais, me sinto especial em poder ter cada um de vocês comigo.

Aos meus pais, por confiarem em mim até aqui, pelo amor de todos os dias, pelos conselhos e abraços, e por vibrar com minhas conquistas. Não imagino o que seria de mim sem vocês. O amor que eu sinto ultrapassa todas as barreiras.

E por fim, à minha Vó Maria, minha linda, que do céu acompanhou toda a minha trajetória, minha professora da vida. Amou e foi amada intensamente, pessoa mais do bem que eu já conheci e vou conhecer. A alma mais iluminada e especial. Essa dissertação é pra VOCÊ! Eu te amo daqui até o céu.

BORTOLOSSI, Bárbara Fernanda. **Identificação de bactérias do gênero *Dickeya* causadoras de quadros de podridão mole em níveis específicos.** 2018. 48 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

RESUMO

Atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies de bactérias fitopatogênicas, que causam problemas para os produtores, como grandes perdas econômicas em diversas espécies vegetais por conta de sua severidade, a facilidade com que elas se disseminam, e a dificuldade em controlá-las. Dentre os mais importantes fitopatógenos causadores de quadros de podridão mole, podem ser citados os gêneros como *Enterobacter*, *Pectobacterium*, *Erwinia* e *Dickeya*, sendo que esse último foi proposto em substituição a antiga *Erwinia chrysanthemi*. Posto isso, o presente projeto teve como objetivo a identificação em nível de espécie de 30 linhagens de *Dickeya* spp., as quais estão incorporadas à Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico IBSBF. Essas linhagens, originalmente enquadradas na espécie *Erwinia chrysanthemi* foram, a partir de 2005, reclassificadas, sendo alocadas no gênero *Dickeya*, englobando sete novas espécies (*D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae*, *D. paradisíaca*, *D. zae* e *D. solani*). Essa fitobactéria é responsável por causar a chamada “podridão mole” em um grande número de hospedeiras, incluindo olerícolas e ornamentais. Desta forma, essas linhagens tiveram suas identificações refeitas a luz das modificações na taxonomia desse importante grupo de fitopatógenos, utilizando-se de diversas ferramentas, como testes bioquímicos, patogênicos e moleculares. Sendo assim, após a realização dos testes bioquímicos, moleculares e comprovação da patogenicidade das bactérias, foi possível até o momento, através da literatura e da comparação com as linhagens tipo pertencentes à Coleção, foi possível identificar 32 linhagens, onde 20 foram alocadas como *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-229, IBSBF-554, IBSBF-920, IBSBF-976, IBSBF-977, IBSBF-1028,

IBSBF-1030, IBSBF-1031, IBSBF-1041, IBSBF-1051, IBSBF-1133, IBSBF-1223, IBSBF-1265, IBSBF-1267, IBSBF-1292, IBSBF-1383, IBSBF-1798, IBSBF-1923, IBSBF-1952, IBSBF-2340), 6 como *Dickeya zea* (IBSBF-933, IBSBF-934, IBSBF-994, IBSBF-1048, IBSBF-1081, IBSBF-1922), 4 como *Dickeya dadantii* (IBSBF-1017, IBSBF-1047, IBSBF-1139, IBSBF-1468), 1 como *Dickeya dieffenbachiae* (IBSBF-846), e 1 como *Dickeya dianthicola* (IBSBF-856).

PALAVRAS-CHAVE: Fitobactérias. *Erwinia chrysanthemi*. Patogenicidade. *Dickeya* spp.

BORTOLOSSI, Bárbara Fernanda. **Identification of *Dickeya* genus bacteria causing of soft rot at specific levels**. 2018. 48 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

ABSTRACT

Currently 150 species of phytopathogenic bacteria are known to cause problems for farmers, such as large economic losses in several plant species because of their severity, the ease with which they spread, and the difficulty in controlling them. Among the most important plant pathogens, we can mention genera such as *Enterobacter*, *Pectobacterium*, *Erwinia* and *Dickeya*, the latter being proposed instead of the old *Erwinia chrysanthemi*. Thus, the present project aimed to corroborate the identification of 30 lines of *Dickeya* spp., which are incorporated into the Collection of Cultures of Phytobacteria of the IBSBF Biological Institute. These strains, originally framed in the species *Erwinia chrysanthemi* were reclassified as of 2005, being allocated in the genus *Dickeya*, including seven new species (*D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae*, *D. paradisíaca*, *D. zea* and *D. solani*). This phytobacter is responsible for causing so-called "soft rot" in a large number of host plants, including olive groves and ornamental plants. In this way, these lineages had their identifications redone in light of the modifications in the taxonomy of this important group of phytopathogens, using several tools, such as biochemical, pathogenic and molecular tests. Thus, after the biochemical tests and confirmation of the pathogenicity of the bacteria, it was possible to identify 32 strains in the literature and in the comparison with the lineages belonging to the Collection, where 20 were identified as *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1032, IBSBF-1031, IBSBF-1041, IBSBF-1051, IBSBF-1133, IBSBF-1223, IBSBF- IBSBF-1265, IBSBF-1267, IBSBF-1292, IBSBF-1383, IBSBF-1798, IBSBF-1923, IBSBF-1952, IBSBF-2340), 6 as *Dickeya zea* (IBSBF-933, IBSBF- (IBSBF-1047, IBSBF-1039, IBSBF-1038, IBSBF-1024, IBSBF-10), 4 as *Dickeya dadantii* (IBSBF-1017,

IBSBF-1047, IBSBF-1139, IBSBF-1468), 1 as *Dickeya dieffenbachiae* (IBSBF-846), and 1 as *Dickeya dianthicola* (IBSBF-856).

KEYWORDS: Phytobacteria. *Erwinia chrysanthemi*. Pathogenicity. *Dickeya* spp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de inoculação	12
Figura 2. Inoculação e expressão de sintomas em folhas de batata.....	16
Figura 3. Produtos de amplificação com o par de <i>primers</i> RS-1/RS-2.....	25
Figura 4. Produtos de amplificação com o par de <i>primers</i> RS-1/RS-2.....	26
Figura 5. Produtos de amplificação com o par de <i>primers</i> RS-1/RS-2.....	27
Figura 6. Digestão dos produtos de amplificação correspondentes a parte do gene <i>recA</i> utilizando as enzimas de restrição <i>Alu I</i> , <i>Dde I</i> e <i>rsA</i>	28
Figura 7. Digestão dos produtos de amplificação correspondentes a parte do gene <i>recA</i> utilizando a enzima de restrição <i>Hpa II</i>	28
Figura 8. Digestão dos produtos de amplificação correspondentes a parte do gene <i>recA</i> utilizando a enzima de restrição <i>Dde I</i>	29
Figura 9. Digestão dos produtos de amplificação correspondentes a parte do gene <i>recA</i> utilizando a enzima de restrição <i>Dde I</i>	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens bacterianas	9
Tabela 2. Sequência do primer utilizado nesse estudo.....	15
Tabela 3. Testes de patogenicidade realizados durante o estudo.	19
Tabela 4. Testes bioquímicos.....	22

SUMÁRIO

RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	V
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVO.....	3
3.REVISÃO DE LITERATURA	4
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
4.1. Linhagens bacterianas	8
4.2. Testes de patogenicidade	8
4.3. Testes bioquímicos e fisiológicos	12
4.4. Testes moleculares	13
4.4.1 Extração de DNA genômico de bactérias em pequena escala.....	13
4.4.2. Amplificação com o par de primers RS-1 e RS-2 (<i>recA</i>).....	14
4.5. PCR-RFLP baseada no gene <i>recA</i>	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5.1. Testes de patogenicidade	16
5.2. Testes bioquímicos	21
5.3. Testes moleculares	24
6. CONCLUSÕES	32
7. REFERÊNCIAS.....	33

1.INTRODUÇÃO

As fitobactérias responsáveis pelo quadro de “podridão mole”, de acordo com Holt e colaboradores (1994), pertencem ao Domínio Bacteria, Divisão Eubacteria, categoria I (eubactérias Gram-negativas com parede celular), grupo 5 (bastonetes Gram negativos, aeróbicos facultativos), sub-grupo 1, e fazem parte da Família Enterobacteriaceae, que inclui patógenos tanto de plantas como de animais.

Dentre os fitopatógenos, podemos citar os gêneros *Brenneria*, *Dickeya*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pectobacterium*, os quais são responsáveis pelo quadro de “podridão mole”, afetando uma grande faixa de plantas hospedeiras, incluindo banana, crisântemo, cravo, milho, batata e tomate (TOTH et al., 2011).

Um dos mais importantes patógenos de plantas, o gênero *Erwinia*, foi estabelecido em 1917, englobando também todas as bactérias que causavam podridão mole em plantas.

Além disso, algumas linhagens de *E. chrysanthemi* causavam doenças em um grande número de plantas, incluindo 16 famílias de dicotiledôneas e 10 famílias de monocotiledôneas, e em função desse grande número de plantas hospedeiras Lelliot e Dickey (1984), subdividiram a espécie *E. chrysanthemi* em seis patovares denominados *chrysanthemi*, *dianthicola*, *dieffenbachiae*, *paradisiaca*, *parthenii* e *zuae*, baseados em especificidade de hospedeiros.

Em 1978, Samson e colaboradores desenvolveram um sistema de identificação baseado em algumas características bioquímicas, propondo a divisão do gênero *Erwinia* em biovares. E em 1998, Hauben e colaboradores propuseram a mudança para o gênero *Pectobacterium*, tendo sido por um tempo denominado *P. chrysanthemi*, para só então, Samson e colaboradores, em 2005, através de um trabalho utilizando hibridização DNA-DNA, análise de sequências do gene 16S rRNA e caracterização bioquímica, propusessem a criação de um novo gênero – *Dickeya*.

O gênero *Dickeya* atualmente tem sido reportado como um dos mais importantes causadores de doenças fitobacterianas, responsável por quadros de podridão mole em muitas plantas cultivadas, como as ornamentais e olerícolas, tanto em regiões tropicais como em subtropicais.

Essas fitobactérias podem causar muitos problemas em um grande número de plantas hospedeiras, prejudicando produtores através de grandes perdas causadas por esses patógenos, o que depende do valor da cultura, severidade do ataque, espécie e subespécie envolvida, condições ambientais, potencial de inóculo e manejo da cultura. (MARIANO et al., 2005).

Praticamente, todas as referências bibliográficas de ocorrências de *Dickeya* spp. em nosso país são anteriores à época que Samson e colaboradores (2005), propuseram o gênero *Dickeya* em substituição à antiga *Erwinia chrysanthemi*, subdividindo-o em seis espécies (*chrysanthemi*, *dianthicola*, *dieffenbacheae*, *paradisiaca*, *dadantii* e *zeae*). Além disso, em 2014, Van Der Wolf e colaboradores propuseram a criação de uma nova espécie - *D. solani*, somando então, sete novas espécies.

Para isso foram utilizados testes que permitiram enquadrar e comparar as linhagens pertencentes à Coleção de Culturas IBSBF, com o objetivo de enquadrá-las dentro das novas espécies descritas (*D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae*, *D. paradisiaca*, *D. zeae* e *D. solani*), tais como os testes bioquímicos baseados em literatura, testes de patogenicidade a partir de inoculações das linhagens em seus respectivos hospedeiros e também em não-hospedeiros, e testes moleculares, através da técnica de PCR-RFLP.

2.OBJETIVO

Essa dissertação tem como objetivo a identificação das linhagens de *Dickeya* spp pertencentes à Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico- IBSBF, através de testes bioquímicos e moleculares, e avaliar a suscetibilidade de diferentes plantas hospedeiras a cada uma das espécies bacterianas através dos testes de patogenicidade.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O cultivo de plantas ornamentais e olerícolas representa grande importância para o país e possui números expressivos no que diz respeito a quantidade de produção, movimentação financeira, importação e exportação. No entanto, produtores devem ficar atentos às pragas que atingem essas culturas, já que fitobactérias, como a *Dickeya*, provocam efeitos devastadores e prejudiciais para essas espécies (EMBRAPA, 2015). Ao que se sabe, os sintomas causados por esses fitopatógenos, em geral, começam a se manifestar na parte aérea das espécies vegetais, e revelam-se principalmente na forma de manchas foliares escurecidas e anasarcadas, para depois evoluírem e atingirem as partes internas, acarretando em parcial decomposição e consequente morte das plantas, resultando em uma queda do valor dessas para a comercialização (ALMEIDA et al., 1996).

O gênero *Dickeya* engloba uma série de bactérias fitopatogênicas responsáveis por quadros de podridão mole, e foi proposto por Samson e colaboradores (2004), substituindo o chamado “complexo *Erwinia chrysanthemi*”, assim, quando foi apresentado, os antigos patovares de *Erwinia chrysanthemi* foram elevados ao nível de espécie do gênero *Dickeya*, compreendendo *D. chrysanthemi* (bv. *chrysanthemi* e *parthenii*), *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae*, *D. paradisiaca* e *D. zeaea*.

Em 2014, Van Der Wolf e colaboradores baseados em estudos de análise de sequência dos genes 16S rRNA, perfil de esterases de ácidos graxos, produção de fosfatase e a habilidade de produzir indol a ácidos a partir de alfa-metil glicoside, propuseram a criação de uma nova espécie – *D. solani*, a qual vem causando sintomas de podridão mole e “canela preta” em plantios de batata na Europa e em Israel.

Em nosso país, *Dickeya* já foi relacionado como patógeno de diversas plantas hospedeiras, incluindo as culturas de abacaxi, abóbora, alcachofra, alface, batata, cebola, cebolinha, cenoura, couve flor, gengibre, mandioquinha-

salsa, milho, pimentão, repolho, tomate (MALAVOLTA et al., 2008; BERIAM et al., 2016).

Em 1953, Bulkholder e colaboradores identificaram *Erwinia chrysanthemi* como patógeno de crisântemo, enquanto Robbs (1980), assinalou a presença de *E. chrysanthemi* em plantas de cebolinha, na região de Campo Grande, Estado do Rio de Janeiro, causando sintomas de podridão mole nas folhas e posteriormente, afetando toda a planta. Os isolados de cebolinha também mostraram-se patogênicos para plantas de crisântemo, fumo, alface, cenoura, batata, batata-doce, pimenta, tomate, palma, comigo-ninguém-pode e bico-de-papagaio, por meio de inoculações artificiais.

Henz, Lopes e Santos (1992), trabalhando com doenças de pós-colheita descreveram a ocorrência de *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. c.* subsp. *atroseptica* e *E. chrysanthemi* em plantas de mandioquinha-salsa, causando quadros de podridão mole.

Almeida, Malavolta Junior e Rodrigues Neto (1994) relacionaram a presença de *E. chrysanthemi* em orquídeas do gênero *Phalaenopsis*, causando manchas foliares, podridão mole e posterior morte da planta. Esses mesmos autores, também em 1994, relataram a presença de *E. chrysanthemi* causando encharcamento e apodrecimento do limbo foliar, do pedúnculo, do pecíolo e da coroa de plantas de violeta. Ainda neste mesmo ano, Moura e colaboradores, 1994, também descreveram uma bacteriose em orchidaceae em Linhares, no Espírito Santo, ocasionada por *E. chrysanthemi*, causando basicamente os mesmos sintomas anteriormente citados.

Almeida e Malavolta Junior (1995) relacionaram a presença de *E. chrysanthemi* em plantas de cravo, mostrando sintomas de subdesenvolvimento do sistema radicular, escurecimento de vasos, necrose na região do colo, podendo chegar à morte da planta.

Malavolta Junior e colaboradores (1997) relataram a ocorrência de *E. chrysanthemi* em plantas de cordeline, ocasionando sintomas de podridão mole. Ainda em 1995, Malavolta e colaboradores descreveram pela primeira vez no

Brasil a ocorrência do patovar *parthenii* de *E. chrysanthemi*, induzindo sintomas de podridão mole em raízes de cenoura e de “talo oco” em plantas de tomateiro, coletadas nos municípios de Campinas e Sumaré, respectivamente.

Em 1996, Almeida e colaboradores descreveram essa bactéria como patógeno de amarilis, mostrando sintomas de podridão mole nas folhas e no bulbo. Com a evolução dos sintomas, as folhas tornavam-se pardacentas, causando destruição do limbo foliar. Essa podridão também atingia as escamas internas e externas do bulbo, culminando com a morte da planta. Ainda em 1996, Malavolta e colaboradores relataram a ocorrência de *E. chrysanthemi* em plantas de comigo-ninguém-pode, coletadas em vários municípios do Estado de São Paulo, mostrando sintomas de podridão mole de estacas e colmos, que em estágios mais avançados podiam levar a morte da planta.

Almeida e colaboradores (1997) assinalaram a ocorrência de *E. chrysanthemi* em plantas de kalanchoe, no município de Holambra, Estado de São Paulo. As plantas mostravam sintomas de podridão mole, com lesões escuras nas folhas, podendo atingir todo o limbo foliar e as hastes, causando morte da gema lateral, além da podridão dos brotos. Nesse mesmo ano, Robbs e colaboradores (1997) detectaram a presença de *E. chrysanthemi* causando problemas em plantas de alface em cultivos hidropônicos, coletadas na região sudeste do país.

Takatsu, Santos e Franco (2001), constataram a presença de moléstia denominada “colapso dos frutos” do abacaxizeiro, causada por *E. chrysanthemi*, em frutos de abacaxi coletados da região de Frutal, Minas Gerais. Frutos na fase de maturação expeliam gases e espumas, podendo emitir chiados nos períodos mais quentes do dia. Os frutos ficavam ocos.

Grabert, Beriam e Almeida (2004) descreveram a presença de *E. chrysanthemi* em plantas de nolina (*Beaucarnea recurvata*), apresentando sintomas de apodrecimento das hastes.

Em 2004, Henz e Lopes relataram a ocorrência de *E. chrysanthemi* em frutos de abóbora no Distrito Federal, que mostravam sintomas de apodrecimento na região central do fruto.

Toth e colaboradores (2011) atribuíram às espécies de *Dickeya* a incidência da chamada “canela preta” em batata na Holanda, na Bélgica e na França. Nos últimos anos esse gênero bacteriano tem aumentado de importância em vários países europeus e em Israel na cultura da batata.

Há ainda relatos de *E. chrysanthemi* em plantas de milho, em várias regiões do Brasil, sempre relacionadas com quadros de podridão mole (MALAVOLTA et al., 2008; BERIAM et al., 2016).

A identificação de fitobactérias é o primeiro passo para o estudo das doenças bacterianas. Informações sobre a identidade, a diversidade e o controle de isolados prevalentes em determinadas regiões são fundamentais para o conhecimento da ecologia do patógeno e controle dessas doenças. Essas informações também são importantes no desenvolvimento de variedades resistentes, além de essencial nos programas de quarentena, detectando e impedindo a entrada de patógenos em áreas em que ainda não tenham sido detectados (SUHARJO, SAWADA e TAKIKAWA, 2014).

Com base em trabalhos recentes, foram realizados testes bioquímicos descritos em literatura e capazes de diferenciar as linhagens pertencentes à Coleção de Culturas, utilizando para fins de comparação as linhagens tipo de *Dickeya zea*, *Dickeya chrysanthemi*, *Dickeya dadantii*, *Dickeya dieffenbachiae* e *Dickeya dianthicola*, para que assim fosse possível a identificação em níveis específicos de todas as linhagens de *Dickeya* depositadas na Coleção de Culturas IBSBF, de acordo com metodologias descritas por Dickey (1979) e Samson e colaboradores (2004).

Os testes bioquímicos utilizados consistiam em meios de cultivos especiais contendo o substrato a ser analisado, com a utilização dos meios

inositol, caseína, D(+) rafinose, manitol, malonato, D(+) lactose, D(-) tartarato, lactose, inulina, fosfatase, D(-) melibiose, β -gentiobiose e indol.

Além disso, foram realizados testes moleculares baseados na literatura de Suharjo, Sawada e Takikawa (2014) com pares de *primers* específicos para confirmar a identificação das linhagens, seguido por amplificação e pela técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length).

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens bacterianas

Foram utilizadas 37, linhagens bacterianas pertencentes à Coleção de Culturas IBSBF, relacionadas na Tabela 1, sendo 5 linhagens Tipo, ou seja, já identificadas, e 32 não identificadas. As linhagens foram reativadas em meio de cultura nutriente ágar “NA” (extrato de carne 3,0 g; peptona 5,0 g; NaCl 5,0 g, agár 17 g, água destilada q.s.p. 1000 mL) e posteriormente mantidas em estufa por 48 h, a 28^o C. Durante o desenvolvimento dos trabalhos, as bactérias foram mantidas em suspensão em água destilada esterilizada.

4.2. Testes de patogenicidade

A partir do crescimento das linhagens bacterianas em meio NA, foram preparadas suspensões bacterianas em água destilada esterilizada, com a concentração aproximada de 10^8 UFC.mL⁻¹ (escala McFarland). Preliminarmente, foram efetuadas inoculações em seus respectivos hospedeiros homólogos, ou seja, os hospedeiros dos quais essas linhagens foram isoladas pela primeira vez (Tabela 1). A partir da reprodução dos sintomas nas partes áreas das plantas como caules e folhas, em hospedeiros homólogos, foram também desenvolvidos testes de inoculação cruzada, nos chamados hospedeiros heterólogos, entre as diversas espécies de plantas relacionadas na Tabela 1. É importante salientar que todas as linhagens, assim que são

recebidas no laboratório, são obrigatoriamente testadas em seus hospedeiros homólogos, e só a partir da observação do desenvolvimento dos sintomas, são depositadas na Coleção de Culturas IBSBF.

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo, que se encontram incorporados na Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF)

IBSBF	ESPÉCIE	HOSPEDEIRO
229	<i>Dickeya sp.</i>	violeta
231	<i>Dickeya chrysanthemi</i> (T)	crisântemo
554	<i>Dickeya sp.</i>	filodendro
846	<i>Dickeya sp.</i>	comigo-ninguém-pode
851	<i>Dickeya dieffenbachiae</i> (T)	comigo-ninguém-pode
852	<i>Dickeya zeae</i> (T)	milho
856	<i>Dickeya sp.</i>	batata
920	<i>Dickeya sp.</i>	batata
933	<i>Dickeya sp.</i>	milho
934	<i>Dickeya sp.</i>	milho
976	<i>Dickeya sp.</i>	cravo
977	<i>Dickeya sp.</i>	cravo
994	<i>Dickeya sp.</i>	tomate
1017	<i>Dickeya sp.</i>	orquídea

Tabela 1. Continuação

1028	<i>Dickeya sp.</i>	violeta
1030	<i>Dickeya sp.</i>	violeta
1031	<i>Dickeya sp.</i>	violeta
1041	<i>Dickeya sp.</i>	cenoura
1047	<i>Dickeya sp.</i>	orquídea
1048	<i>Dickeya sp.</i>	comigo-ninguém-pode
1051	<i>Dickeya sp.</i>	violeta
1081	<i>Dickeya sp.</i>	orquídea
1133	<i>Dickeya sp.</i>	amaralis
1139	<i>Dickeya sp.</i>	orquídea
1223	<i>Dickeya sp.</i>	kalanchoe
1265	<i>Dickeya sp.</i>	gengibre
1267	<i>Dickeya sp.</i>	filodendro
1292	<i>Dickeya sp.</i>	gengibre
1383	<i>Dickeya sp.</i>	bico de papagaio
1468	<i>Dickeya sp.</i>	cebola
1922	<i>Dickeya sp.</i>	pata de elefante
1923	<i>Dickeya sp.</i>	pata de elefante

Tabela 1. Continuação

1798	<i>Dickeya sp.</i>	milho
1952	<i>Dickeya sp.</i>	tomate
2340	<i>Dickeya sp.</i>	batata
2912	<i>Dickeya dadantii</i> (T)	malva de cheiro
2918	<i>Dickeya dianthicola</i> (T)	cravo

(T) Linhagens tipo

Tanto para as inoculações em hospedeiros homólogos como em hospedeiros heterólogos, as plantas testes foram mantidas em condições de casa-de-vegetação, em vasos com terra, sendo regadas periodicamente, de acordo com a necessidade de cada espécie. Além disso, após a inoculação todas as plantas permaneceram em câmara úmida por 48 horas. Foram inoculados quatro vasos para cada planta hospedeira, sendo que um dos vasos foi tratado com água destilada (controle negativo).

Para as inoculações, os vasos foram etiquetados e numerados de acordo com as linhagens utilizadas. A partir disso foram selecionadas ao acaso seis folhas de cada planta, as quais foram identificadas e inoculadas através de seis microlesões foliares efetuadas com o auxílio de agulhas embebidas nas suspensões bacterianas (Figura 1).

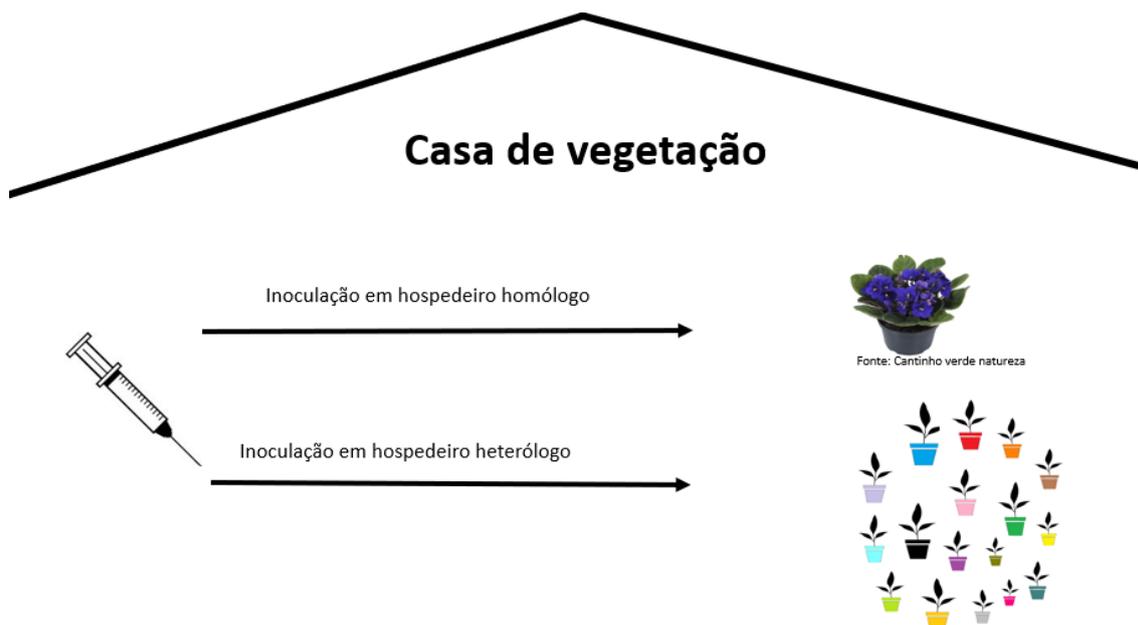


Figura 1. Ilustração indicando como foram efetuadas as inoculações, de acordo com as linhagens e hospedeiros utilizados.

4.3. Testes bioquímicos

Os testes bioquímicos foram desenvolvidos de acordo com metodologia descrita por Dickey (1979) e Samson e colaboradores (2004). Para identificação em nível de gênero foram utilizados os seguintes testes: produção de fosfatase, produção de indol (Tripton 10,0 g; Extrato de levedo 5,0 g; água destilada q.s.p. 1000 mL), produção de ácido a partir dos carboidratos, D(+) lactose, m-inositol e utilização de ácidos orgânicos a partir de malonato.

As diferenciações em nível de espécies foram efetuadas por meio dos seguintes testes: β -gentiobiose, D(-) tartarato, inulina, lactose, D(-) melibiose, D(+) rafinose, manitol e caseína.

No caso de testes bioquímicos líquidos, foram preparadas suspensões com água destilada para todas as bactérias envolvidas e com o auxílio de uma micro-pipeta foi adicionada uma quantidade padrão da suspensão em cada tubo contendo o meio. Já para os testes bioquímicos com meios sólidos, as inoculações foram efetuadas a partir do crescimento bacteriano em meio Nutriente Ágar.

A partir dos resultados, que variaram de sete dias a um mês para serem obtidos, as características dos testes foram comparadas com a literatura para assim confirmar a identificação das linhagens pertencentes a Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico IBSBF. Para cada teste bioquímico realizado, foram efetuadas três repetições para confirmação dos resultados.

4.4. Testes moleculares

4.4.1 Extração de DNA genômico de bactérias em pequena escala

As extrações de DNA foram realizadas a partir de amostras de *Dickeya spp.* incorporadas a Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), seguindo a metodologia de Pitcher e colaboradores (1989).

A partir do crescimento bacteriano em meio nutriente ágar, por 48h a 28°C, foram transferidos cerca de 100 mg de biomassa da bactéria para um tubo com cerca de 5 mL de meio de cultura líquido (NB), o qual foi incubado a 28 °C por 12 a 16 horas. A cultura líquida foi submetida a centrifugação e as células foram suspensas em 100 µL de solução de TE pH 8,0 (10 mM Tris; 1 mM EDTA) contendo 2 mg/mL de lisozima dissolvida, e incubadas a 37°C por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 500 µL da solução de tiocionato guanidina 5 M, para promover a lise da célula, com ligeira agitação. Posteriormente foram adicionados 250 µL de acetato de amônio 7,5 M. Os tubos foram invertidos gentilmente por várias vezes, e incubados no gelo por mais 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v), agitados manualmente e centrifugados a 7500 g, por 10 min.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga, contendo 0,54 vol. de isopropanol, aproximadamente 450 µL, para precipitar o DNA. A solução foi centrifugada a 6400 g por 2 minutos e o sedimento de DNA foi lavado três vezes com etanol 70% (v/v), secando a vácuo. O sedimento foi seco à temperatura ambiente para depois ser suspenso em 200 µL de tampão

TE pH 8,0. Em seguida, foram adicionados 2 μ L de RNase (10mg/mL) e a solução foi incubada novamente a 37 °C por uma hora. Posteriormente, foram adicionados 40 μ L de cloreto de lítio 8 M e 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), aproximadamente 240 μ L. Após centrifugação de 10 min. a 6400g, a fase aquosa foi então transferida para um novo microtubo, e o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, cerca de 400 μ L, e os sedimentos foram lavados com etanol 70% duas vezes e colocados para secar em temperatura ambiente. Após isso, o DNA foi suspenso em 20 a 50 μ L de água milli-Q e estocado a -20 °C

A pureza e quantificação do DNA das amostras foram determinadas através de eletroforese em gel de agarose 0,6% em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato/0.001 M EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídeo (10mg/mL), visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação.

4.4.2. Amplificação com o par de *primers* RS-1 e RS-2 (*recA*)

Os experimentos de amplificação foram realizados preparando-se reações de 25 μ L, contendo em média 200ng de DNA cromossômico; 1X tampão da enzima *Taq*DNA polimerase (Fermentas); 1X BSA (*Bovine Serum Albumine*) (10 mg/mL); 0,4 μ M de cada *primer* (RS-1:TTCATRCGRATCTGGTTGAT e RS-2: ATCGCTCAATGGATGTTGAAA); 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs e 2U da enzima *Taq*DNA polimerase (Fermentas). O programa de amplificação das amostras consistiu em um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C/5 min.; seguido de 30 ciclos a 94 °C por 1min; extensão do *primer*: 72 °C/1 min; ciclo de extensão final a 72 °C/7. Amplificação para PCR: desnaturação inicial: 94 °C, 5 min, seguido de 32 ciclos com desnaturação de 94 °C por 30 s; extensão final da enzima a 72 °C, por 7 min (SUHARJO, SAWADA & TAKIKAWA, 2014).

Para a amplificação foi utilizado o termociclador Geneamp PCR System 9700; Perkin-Elmer e os produtos de amplificação foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%. O par de *primers* utilizado em todas as

reações tem o comprimento do produto de PCR de 499 pares de bases e está relacionado na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência do par de *primers* que foi utilizado neste estudo.

MLSA cod	Sequencia (5´- 3´)	Comprimento do produto de PCR (pb)	Região Amplificada	Referência
RS-1	TTCATRCGRATCTGGTTGAT	499	<i>RecA</i> PCR-RFLP	(SUHARJO et al.,2014)
RS-2	ATCGCTCAATGGATGTTGAAA			

4.5. PCR-RFLP do gene *recA* (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length)

Para essa análise, foi utilizado o gene *recA* como sendo marcador molecular para diferenciar primeiramente as linhagens Tipos da Coleção de Culturas IBSBF, e posteriormente as demais linhagens de interesse. Para a técnica de amplificação já citada, foram utilizados o par de *primers* RS-1 e RS-2, provenientes do gene *recA*. Com a obtenção dos produtos da amplificação do gene em questão (499 pb), procedeu-se a digestão com enzimas de restrição. Nesse caso, foram utilizadas enzimas para meios de comparação e para que fosse possível analisar a mais eficiente, são elas: *Alu I*, *Dde I*, *Rsa I* e *Hpa II*. Para as reações de PCR, foram utilizados 5 µL dos produtos de amplificação (reações de 15 µL contendo 5U da enzima por reação incubadas durante a noite). A observação dos resultados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo, para então serem visualizados e fotografados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Testes de patogenicidade

Foram testadas 12 espécies vegetais entre ornamentais e olerícolas, como kalanchoe, cravo, violeta, amarílis, poinsettia, crisântemo, orquídea, malva de cheiro, comigo-ninguém-pode, tomate, cebola e batata (Figura 2), sendo inoculadas na maioria dos casos com suas linhagens homólogas e algumas heterólogas. Há ainda, situações onde o hospedeiro homólogo não foi testado com sua respectiva linhagem, a qual foi inoculada em hospedeiros heterólogos, podendo expressar ou não sintomas, isso porque assim que o Laboratório de Bacteriologia Vegetal recebe uma linhagem já identificada ou com alguma suspeita de identificação, essa é inoculada já em seu hospedeiro homólogo para observar a expressão de sintomas e confirmar a identificação, por isso a não necessidade de inocular linhagens em hospedeiros homólogos.

Essa técnica de inoculação foi também utilizada por Samson e colaboradores (2004), para identificar o nível de homologia entre a linhagem e seu hospedeiro homólogo, e também em hospedeiros heterólogos, porém seus resultados foram baseados em porcentagens para cada expressão de sintomas.



Figura 2. Inoculação da linhagem bacteriana IBSBF-920 em folhas de batata (hospedeiro homólogo) e posterior expressão de sintomas, indicando um resultado positivo.

As plantas que apresentaram suscetibilidade foram aquelas que quando inoculadas com uma ou mais linhagens bacterianas, expressaram sintomas característicos a pelo menos uma dessas bactérias, sintomas esses que variam dependendo do tipo de planta, do lugar onde foi inoculada a suspensão bacteriana, e da agressividade da linhagem (ALMEIDA et al., 1996).

Os sintomas, na maioria dos casos, apareceram em forma de manchas escuras nas partes áreas das plantas, como caule e folhas, a murcha também é muito comum, já que ocorre uma obstrução dos vasos vasculares do caule, impedindo o fluxo de água até as folhas, por exemplo, além do apodrecimento, parcial ou total, das plantas.

Sendo assim, as linhagens IBSBF-1265 (gengibre), IBSBF-1292 (gengibre), IBSBF-1041 (cenoura), IBSBF-1922 (pata de elefante), IBSBF-1923 (pata de elefante), IBSBF-1798 (milho), IBSBF-933 (milho), IBSBF-934 (milho), IBSBF-852 (milho), IBSBF-1267 (imbé), IBSBF-554 (imbé), não foram inoculadas em seus hospedeiros homólogos, porém todas elas foram inoculadas em hospedeiros heterólogos diversos, não expressando sintomas em nenhum deles.

Segundo os testes realizados descritos na tabela 2, a linhagem IBSBF-976 isolada de cravo, além de expressar sintomas em hospedeiro homólogo apresentou sintomas em violeta, kalanchoe e tomate; a linhagem IBSBF-1028, isolada de violeta, apresentou sintomas em seu hospedeiro homólogo e também em tomate; a linhagem IBSBF-1952, isolado de tomate, apresentou sintomas em seu hospedeiro homólogo e também em cravo; a linhagem IBSBF-2912 apresentou sintomas em seu hospedeiro homólogo, malva de cheiro, e também em violeta; a linhagem IBSBF-231, isolado de crisântemo, apresentou sintomas em seu hospedeiro homólogo e também em violeta; a linhagem IBSBF-2918, isolado de cravo, apresentou sintomas em seu hospedeiro homólogo e também em violeta; a linhagem IBSBF-977 apresentou sintomas em seu hospedeiro homólogo, cravo, e também em poinsettia; já a linhagem IBSBF-1030, apresentou sintomas em seu hospedeiro homólogo, violeta, e também em kalanchoe; a linhagem IBSBF-1051 apresentou sintomas em seu hospedeiro homólogo, violeta, e também em cravo e a linhagem IBSBF-856 apresentou sintomas em seu hospedeiro homólogo, batata, e também em tomate. As linhagens IBSBF-

1081, IBSBF-1468, IBSBF-920, IBSBF-1383, IBSBF-1133, IBSBF-229, IBSBF-846, IBSBF-851, IBSBF-1017, IBSBF-1031, IBSBF-1223, IBSBF-1048, IBSBF-1047, IBSBF-1139, IBSBF-2340 e IBSBF-994 (isoladas respectivamente de orquídea, cebola, malva de cheiro, batata, poinsétia, amarílis, violeta, comigo-ninguém-pode, comigo-ninguém-pode, orquídea, violeta, kalanchoe, comigo-ninguém-pode, orquídea, orquídea, batata e tomate) , expressaram sintomas apenas em seus hospedeiros homólogos, indicando então uma especificidade dessa linhagem.

Para as linhagens que apresentaram patogenicidade também em hospedeiros heterólogos, foi fundamental que sua confirmação de identificação tenha sido em nível específico, já que seria provável que tais linhagens pertencessem a uma mesma espécie que as fitobactérias relacionadas para esse trabalho.

Samson e colaboradores, 2005, obtiveram resultados semelhantes em relação a heterogeneidade, já que muitas das espécies de *Dickeyas* utilizadas em seu trabalho, expressaram sintomas em outras plantas, além de suas hospedeiras homólogas.

Os resultados obtidos a partir dos testes de patogenicidade podem ser observados na Tabela 3.

(T) linhagens Tipo

(+) linhagens que, quando inoculadas, expressaram sintomas positivos nas espécies vegetais;

(-) linhagens que, quando inoculadas, não expressaram sintomas nas espécies vegetais.

Todas essas linhagens foram preservadas através de métodos de manutenção a longo prazo, como a liofilização e a criopreservação, com o principal objetivo de preservar as características morfológicas, fisiológicas e genéticas desses fitopatógenos. Segundo Sola (2011), a liofilização consiste na remoção de água presente em amostras biológicas viáveis e posterior congelamento. Considerada uma das técnicas mais eficientes em casos de preservação, ela garante a viabilidade dos agentes por longos períodos e costuma ser aplicável para a maioria deles. Já a criopreservação, é utilizada para manter diversos tipos celulares em baixas temperaturas (-20 °C a -80 °C em freezers), com o objetivo de minimizar danos em materiais biológicos, como as bactérias.

Porém, tanto a liofilização, quanto a criopreservação, oferecem riscos aos microrganismos armazenados. No caso da liofilização, as etapas que compõe o processo (congelamento, desidratação primária e desidratação secundária) podem causar danos celulares e uma série de alterações na permeabilidade da membrana celular. Já a criopreservação oferece problemas intimamente relacionados com a mudança de temperatura das amostras armazenadas, como a alternância brusca da temperatura, ou temperaturas muito elevadas para os microrganismos. Todos esses fatores que afetam amostras liofilizadas e criopreservadas podem afetar a viabilidade e estabilidade celular, inclusive alterando as características relacionadas à patogenicidade do isolado, induzindo a prejuízos irreversíveis e deixando o material seriamente lesado (SOLA, 2011).

Ainda segundo Miyamoto-Shinohar e colaboradores (2008), bactérias Gram negativas, que é o caso do gênero *Dickeya*, apresentam índices menores de sobrevivência em suas estruturas quando submetidas a esses métodos de manutenção, quando comparadas com bactérias Gram positivas.

5.2. Testes bioquímicos

Segundo Dickey (1979), características fenotípicas podem ser utilizadas para separar *Erwinia chrysanthemi* de outras espécies do gênero *Erwinia* que causavam podridão mole, incluindo produção de fosfatase, produção de gás de glicose, produção de indol e inabilidade de produzir ácido a partir de D-trealose.

Os resultados dos testes bioquímicos obtidos, baseados no trabalho de Dickey (1979), Takatsu (2007) e Samson e colaboradores (2005), quando comparados à literatura, permitiram enquadrar 32 linhagens descritas na Tabela 1, em algumas das novas espécies propostas por SAMSON e colaboradores (2005), das quais 20 foram alocadas como *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-229, IBSBF-554, IBSBF-920, IBSBF-976, IBSBF-977, IBSBF-1028, IBSBF-1030, IBSBF-1031, IBSBF-1041, IBSBF-1051, IBSBF-1133, IBSBF-1223, IBSBF-1265, IBSBF-1267, IBSBF-1292, IBSBF-1383, IBSBF-1798, IBSBF-1923, IBSBF-1952, IBSBF-2340), 6 como *Dickeya zaeae* (IBSBF-933, IBSBF-934, IBSBF-994, IBSBF-1048, IBSBF-1081, IBSBF-1922), 4 como *Dickeya dadantii* (IBSBF-1017, IBSBF-1047, IBSBF-1139, IBSBF-1468), 1 como *Dickeya dieffenbachiae* (IBSBF-846), e 1 como *Dickeya dianthicola* (IBSBF-856). Todos os testes bioquímicos propostos por SAMSON et al. (2004) foram realizados com todas as linhagens relacionadas na Tabela 1.

No geral, foram utilizados testes bioquímicos sugeridos através de literaturas, os quais permitiram, de acordo com os resultados, diferenciar todas as espécies do gênero *Dickeya* disponíveis na Coleção de Culturas IBSBF.

Esses testes foram importantes para confirmar a identificação das espécies de bactérias em foco, onde no caso de resultados positivos, foi possível observar transformações químicas, resultado da ação das enzimas dos microrganismos, e no caso de resultados negativos a aparência dos meios continuaram as mesmas, ou seja, esses testes permitiram a classificação das linhagens bacterianas através do seu metabolismo, apresentando ou não capacidade de degradar os determinados substratos.

Os resultados dos testes bioquímicos estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4. Continuação

Meio / IBSBF	229	1292	1031	1267	1051	1081	1048	1041	1798	1923	2340
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+) Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+) Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(-) Tartarato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Inulina	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Fosfatase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(-)Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β -gentiobiose	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Indol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(IBSBF) nome da Coleção de Culturas do Laboratório de Bacteriologia vegetal

(Meio) meios de cultivos utilizados para os testes bioquímicos

(-) testes bioquímicos com resultados negativos

(+) testes bioquímicos com resultados positivos

Quadro Resumo

D. crisanthemii > Positivo para: Inositol, Caseína, D(+) Rafinose, Manitol, Malonato, D(+) Lactose, Inulina, Fosfatase, D(-) Melibiose, β -gentiobiose e Indol.

> Negativo para: D(-) Tartarato e Lactose.

D. dieffenbachiae > Positivo para: Inositol, Caseína, Manitol, Malonato, D(+) Lactose, Fosfatase, β -gentiobiose e Indol.

> Negativo para: D(+) Rafinose, D(-) Tartarato, Lactose, Inulina e D(-) Melibiose.

D. zea > Positivo para: Inositol, Caseína, D(+) Rafinose, Manitol, Malonato, D(+) Lactose, Lactose, Fosfatase, D(-) Melibiose e Indol.

Negativo para: D(-) Tartarato, Inulina e β -gentiobiose.

D. dadantii > Positivo para: Inositol, Caseína, D(+) Rafinose, Manitol, Malonato, D(+) Lactose, Lactose, Fosfatase, D(-) Melibiose, β -gentiobiose e Indol.

Negativo para: D(-) Tartarato e Inulina.

D. dianthicola > Positivo para: Inositol, Caseína, Manitol, Malonato, D(+) Lactose, D(-) Tartarato, Inulina, Fosfatase, β -gentiobiose e Indol.

Negativo para: D(+) Rafinose, Lactose, D(-) Melibiose.

5.3. Testes moleculares

SUHARJO, SAWADA & TAKIKAWA (2014) utilizaram diversos pares de *primers* *recA*, *dnaX*, *rpoD* e *gyrB* para confirmar a identificação de 41 espécies de *Dickeya* isoladas de 24 plantas no Japão, entre elas as espécies *D. chrysanthemi*, *D. zea*, *D. dianthicola*, *D. dadantii* e *D. dieffenbachiae*. A partir da escolha de tais *primers*, os autores deram continuidade e prosseguiram com a amplificação das linhagens de *Dickeya* e em seguida pela técnica de PCR-RFLP, com o *primer recA* foram utilizadas as enzimas de restrição *Sall*, *BglII*, *PstI*, *SphI*, *HaeIII* e *AluI*, com o *primer rpoD* foram utilizadas as enzimas *HindIII*, *DdeI* e *BglII*, e com o *primer gyrB*, as enzimas de restrição utilizadas foram *BamHI* e *DdeI*, possibilitando a identificação das diferentes espécies a partir das

características de bandas visualizadas em eletroforese. Os resultados obtidos no trabalho permitiram que fossem utilizados exatamente o par de *primers* específico para as linhagens necessárias neste trabalho e as enzimas de restrição para reagissem e digerissem os produtos de PCR.

A partir das extrações e quantificações dos DNAs de interesse, foi realizada a amplificação das linhagens tipo: IBSBF-231, IBSBF-851, IBSBF-852, IBSBF-2912 e IBSBF-2918, cada uma delas pertencentes a uma espécie diferente de *Dickeya*, as quais são *D. chrysanthemi*, *D. dieffenbachiae*, *D. zeae*, *D. dadanti* e *D. dianthicola*, respectivamente e de outras 21 linhagens: IBSBF-1030, IBSBF-1468, IBSBF-1952, IBSBF-1265, IBSBF-1028, IBSBF-1133, IBSBF-1383, IBSBF-1139, IBSBF-1223, IBSBF-1922, IBSBF-554, IBSBF-994, IBSBF-920, IBSBF-977, IBSBF-1047, IBSBF-976, IBSBF-933, IBSBF-1017, IBSBF-934, IBSBF-846, IBSBF-856, com o par de *primers* RS1 e RS2 correspondentes a parte do gene *recA* descrito em literatura (SUHARJO et al.,2014).

..... Os resultados mostraram que todas as linhagens testadas apresentaram amplificação de parte do gene *recA* (499pb), todas com as mesmas característica de banda, tanto as linhagens tipo, quanto as outras linhagens, ou seja, todas essas linhagens apresentaram sinal positivo de amplificação do fragmento em questão (*recA*) de aproximadamente 499 pares de bases. As demais linhagens não incluídas nestes experimentos, permanecem identificadas apenas por testes bioquímicos. Foi possível também, através da técnica de PCR, confirmar a amplificação do fragmento e o tamanho de parte do gene *recA* citado em literatura, com aproximadamente 499 pb para cada linhagem testada (Figuras 3, 4 e 5).

M 1 2 3 4 5 6

500 pb

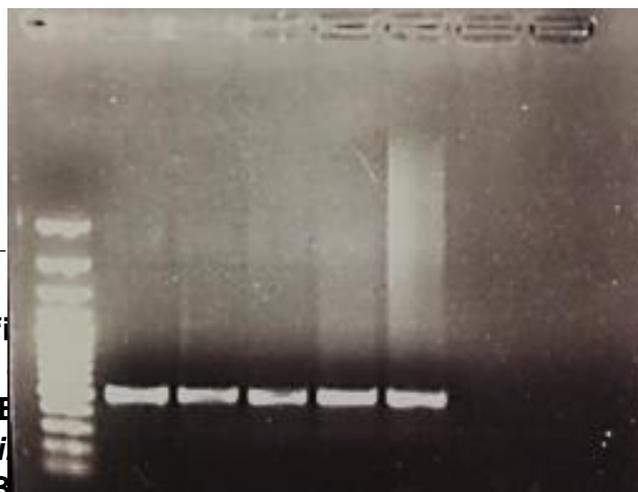


Figura 3. Amplificação do gene *recA* em linhagens de *Dickeya* utilizando os *primers* RS-1 e RS-2. (M) Marcador de DNA de 500 pb. (1) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-231^T); (2) *Dickeya dieffenbachiae* (IBSBF-851^T); (3) *Dickeya zeae* (IBSBF-852^T); (4) *Dickeya dadanti* (IBSBF-2912^T); (5) *Dickeya dianthicola* (IBSBF-2918^T); (6) *Dickeya* sp. (IBSBF-1030^T); (7) *Dickeya* sp. (IBSBF-1468^T).

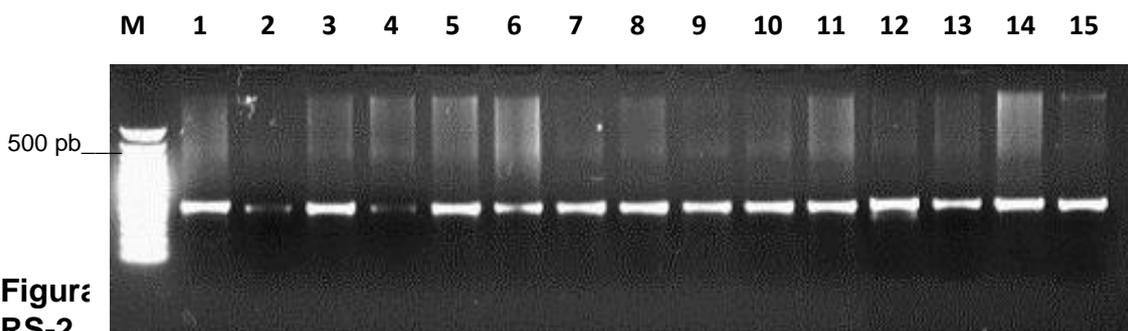


Figura RS-2.

chrysanthemi (IBSBF-1468); (4) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1952); (5) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1265); (6) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1028); (7) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1133); (8) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1798); (9) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1383); (10) *Dickeya dadantii* (IBSBF-1139); (11) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1223); (12) *Dickeya zeae* (IBSBF-1922); (13) *Dickeya zeae* (IBSBF-852^T); (14) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-554); (15) *Dickeya dadantii* (IBSBF-1047).

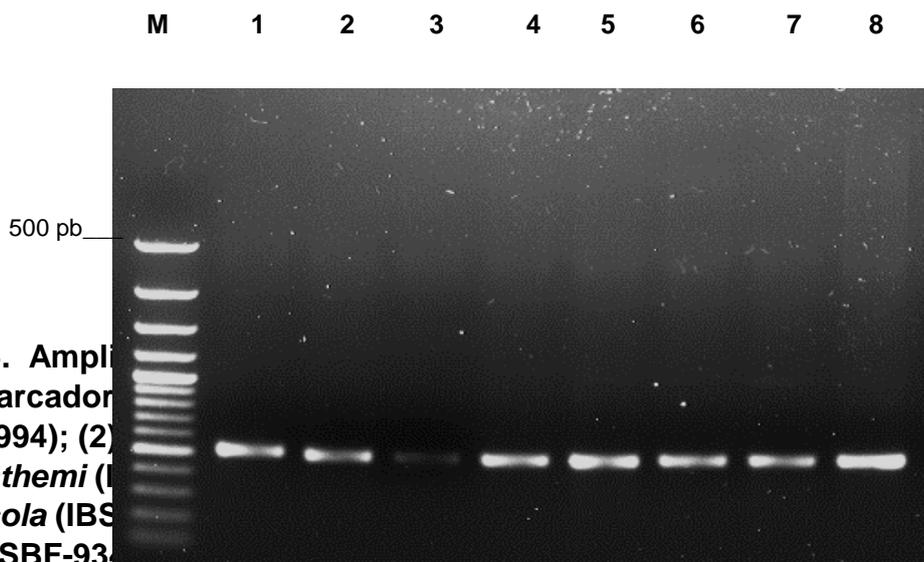
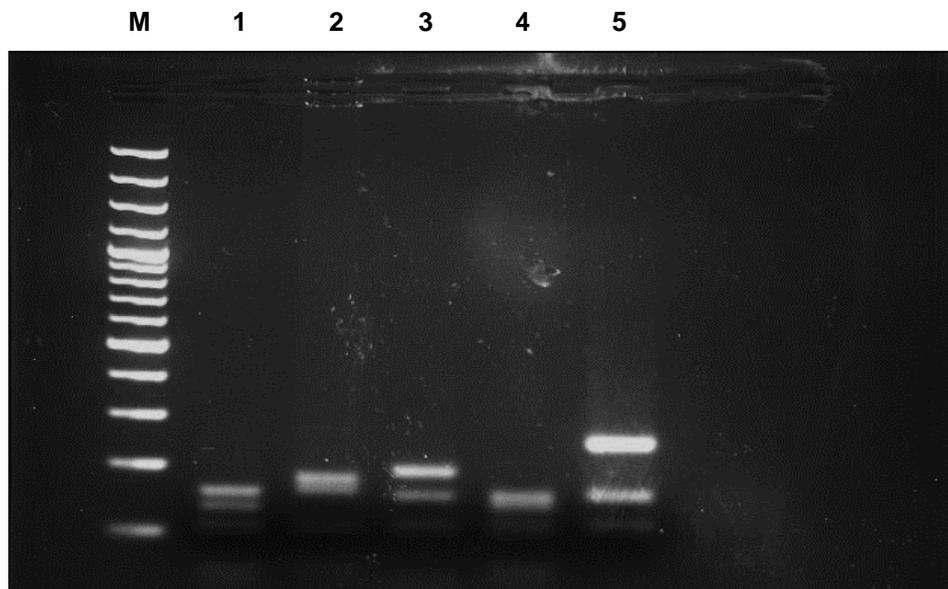
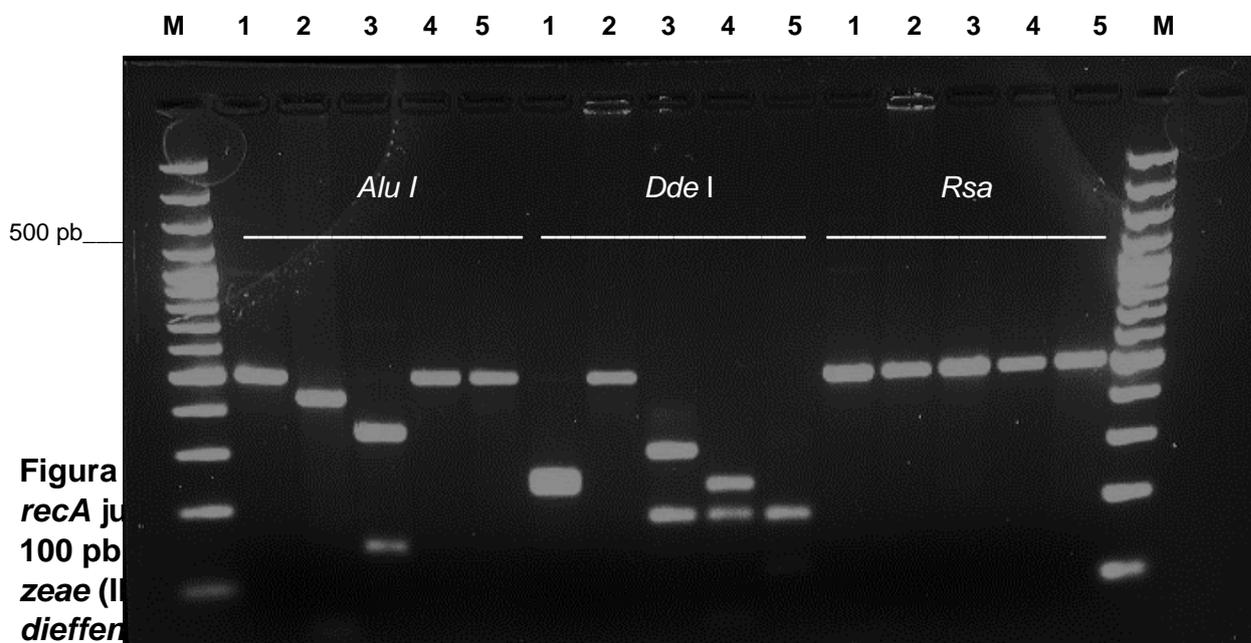


Figura 5. Amplificação de DNA de linhagens de *Dickeya* RS-2. (M) Marcador de DNA (IBSBF-994); (2) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1468); (3) *Dickeya dianthicola* (IBSBF-1468); (4) *Dickeya zeae* (IBSBF-931); (5) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1468); (6) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1468); (7) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1468); (8) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1468).

..... A partir do resultado positivo com a amplificação primeiro das linhagens tipos, e posteriormente das demais linhagens, foi realizada a

digestão dos produtos amplificados pela técnica chamada PCR-RFLP. Para isso, de início, foram utilizadas as cinco linhagens tipos (IBSBF-231 *D. chrysanthemi*, IBSBF-852 *D. zea*, IBSBF-2912 *D. dadantii*, IBSBF-851 *D. dieffenbachiae*, IBSBF-2918 *D. dianthicola*) para que reagissem com as enzimas de restrição *Alu* I, *Dde* I, *Rsa*, *Hpa* II. A enzima de restrição *Alu* I, quando testada, permitiu a diferenciação apenas das linhagens IBSBF-231, IBSBF-852 e IBSBF-2912. Já com a enzima *Dde* I, foi possível diferenciar todas as linhagens tipos entre si, as quais apresentaram perfis distintitos. Com a enzima *Rsa* todas as linhagens tipos apresentaram o mesmo perfil, não sendo possível então diferenciá-las entre si (Figura 6), enquanto a enzima *Hpa* II, apesar de ter diferenciado todas as linhagens, o resultado não foi tão perceptível visualmente quando comparado à enzima *Dde* I (Figura 7).



500 pb_____

Figura 7. Digestão dos produtos de amplificação utilizando parte do gene *recA* junto à enzima *Hpa II*. (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-231^T); (2) *Dickeya zeae* (IBSBF-852^T); (3) *Dickeya dadantii* (IBSBF-2912^T); (4) *Dickeya dieffenbachiae* (IBSBF-851^T); (5) *Dickeya dianthicola* (IBSBF-2918^T).

..... Os resultados mostraram que com a enzima *Dde I*, foi possível observar perfis de restrição distintos para cada uma das espécies analisadas. Diante disso, os produtos de PCR correspondentes à parte do gene *recA* das demais linhagens de *Dickeya* spp. foram submetidos a digestão com a enzima *Dde I*

foi dada continuidade no experimento e as demais linhagens também foram digeridas com a enzima *Dde I*.

Sendo assim, foi possível confirmar que, comparando-se com os perfis de restrição das linhagens Tipo, as linhagens de *Dickeya* spp. foram identificadas como : *Dickeya chrysanthemi*, as linhagens IBSBF-1030, IBSBF-1952, IBSBF-1265, IBSBF-1028, IBSBF-1133, IBSBF-1383, IBSBF-1223. A linhagem que apresentou o mesmo perfil de restrição quando comparada com a *Dickeya zeae* foi a IBSBF-1922, já com a *Dickeya dadantii*, as linhagens que demonstraram o mesmo perfil de restrição foram IBSBF-1468 e IBSBF-1139 (Figura 8).

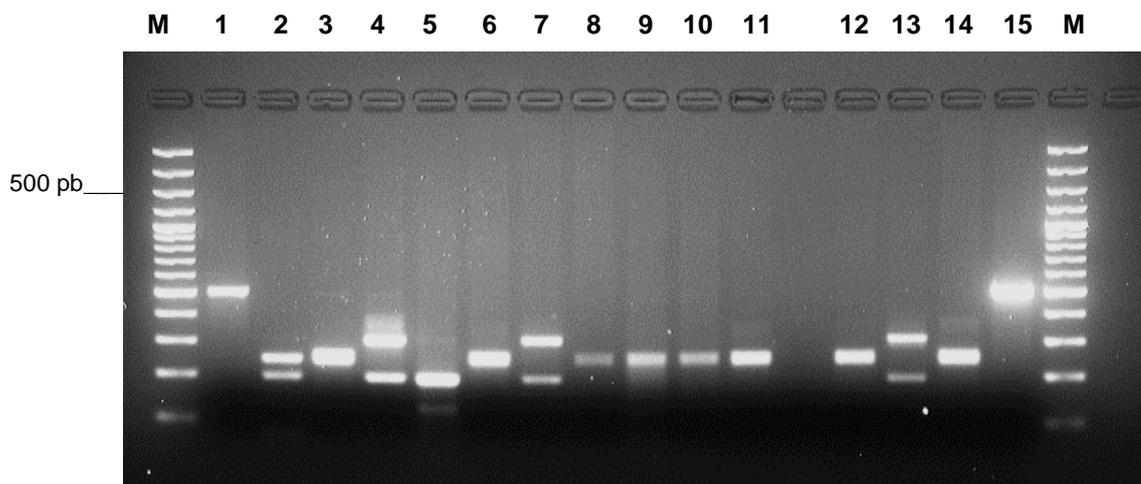


Figura 8. Digestão dos produtos de amplificação utilizando parte do gene *recA* junto à enzima *Dde I*. (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1)

Dickeya zeae (IBSBF-852^T); (2) *Dickeya dieffenbachiae* (IBSBF-851^T); (3) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-231^T); (4) *Dickeya dadantii* (IBSBF-2912^T); (5) *Dickeya dianthicola* (IBSBF-2918^T); (6) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1030); (7) *Dickeya dadantii* (IBSBF-1468); (8) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1952); (9) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1265); (10) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1028); (11) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1133); (12) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1383); (13) *Dickeya dadantii* (IBSBF-1139); (14) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-1223); (15) *Dickeya zeae* (IBSBF-1922).

Já o segundo gel, com as mesmas configurações do primeiro, permitiu identificar as linhagens IBSBF-554, IBSBF-920, IBSBF-977 e IBSBF-976 como sendo *Dickeya chrysanthemi*; as linhagens com os mesmos perfis de restrição a *Dickeya zeae* foram IBSBF-994, IBSBF-933 e IBSBF-934; já as linhagens IBSBF-1047 e IBSBF-1017, possuem o mesmo perfil de restrição que a *Dickeya dadantii*, enquanto a linhagem IBSBF-846 se mostrou semelhante à *Dickeya dieffenbachiae* e, por fim, a linhagem IBSBF-856 apresentou perfil de restrição idêntico à *Dickeya dianthicola* (Figura 9).

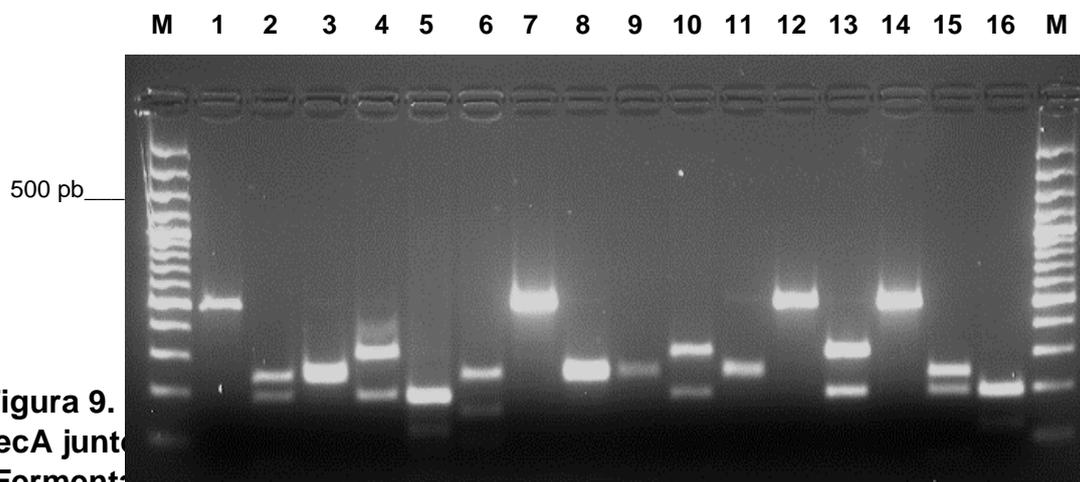


Figura 9. Digestão dos produtos de amplificação utilizando parte do gene *recA* junto à enzima *Dde I*. (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1)

Dickeya zeae (IBSBF-852^T); (2) *Dickeya dieffenbachiae* (IBSBF-851^T); (3) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-231^T); (4) *Dickeya dadantii* (IBSBF-2912^T); (5) *Dickeya dianthicola* (IBSBF-2918^T); (6) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-554); (7) *Dickeya zeae* (IBSBF-994); (8) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-920); (9) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-977); (10) *Dickeya dadantii* (IBSBF-1047); (11) *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF-976); (12) *Dickeya zeae* (IBSBF-933);

(13) *Dickeya dadantii* (IBSBF- 1017); (14) *Dickeya zea* (IBSBF-934); (15) *Dickeya dieffenbachiae* (IBSBF-846); (16) *Dickeya dianthicola* (IBSBF-856).

Por fim, foi possível identificar, através dos testes moleculares citados, as linhagens IBSBF-1030, IBSBF-1468, IBSBF-1952, IBSBF-1265, IBSBF-1028, IBSBF-1133, IBSBF-1383, IBSBF-1139, IBSBF-1223, IBSBF-1922, IBSBF-554, IBSBF-994, IBSBF-920, IBSBF-977, IBSBF-1047, IBSBF-976, IBSBF-933, IBSBF-1017, IBSBF-934, IBSBF-846 e IBSBF-856 (*D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. chrysanthemi*, *D. chrysanthemi*, *D. chrysanthemi*, *D. chrysanthemi*, *D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. chrysanthemi*, *D. zea*, *D. chrysanthemi*, *D. zea*, *D. chrysanthemi*, *D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. chrysanthemi*, *D. zea*, *D. dadantii*, *D. zea*, *D. dieffenbachiae* e *D. dianthicola*, respectivamente) sendo que todas essas linhagens, identificadas através da técnica de PCR-RFLP, apresentaram resultados concordantes com aqueles obtidos através dos testes bioquímicos e de patogenicidade.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir também que, a partir de agora, 21 linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Dickeya* estão à disposição na Coleção de Culturas IBSBF identificadas seguramente por meio de testes bioquímicos, patogênicos e moleculares, e outras 11 linhagens estão também à disposição, e foram identificadas através de testes bioquímicos e patogênicos.

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JR., V. A. Ocorrência e caracterização de *Erwinia chrysanthemi* em cravo (*Dianthus caryophyllus*) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, 1995. v. 21. 184-187p.
- ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JR., V. A.; RODRIGUES NETO, J. Podridão mole em orquídea (*Phalenopsis* hib.) causada por bactérias do gênero *Erwinia*. **Summa Phytopathologic**,. 1994. v. 20. p. 47p.
- ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JR., V. A.; RODRIGUES NETO, J. Podridão em violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) causada por *Erwinia chrysanthemi*. **Summa Phytopathologica**, 1994. v. 20. 47p.
- ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JR., V. A. RODRIGUES NETO, J. Podridão em kalanchoe, causada por *Erwiniachrysanthemi*, no Brasil. **Summa Phytopathologica**, 1997. v 23. 54p.
- ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V.A. Amarilis, novo hospedeiro de *Erwinia chrysanthemi*. **Summa Phytopathologica**, 1996. v 22. 66p.
- BERIAM, L.O.S. et al. 2016. Bactérias fitopatogênicas no Brasil – levantamento bibliográfico. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/publicações/bactériasfitopatogênicas>
- BURKHOLDER, W.D.; McFADDEN, L.A.; DIMOCK, A.W. A bacterial blight of chrysanthemi. **Phytopathology**, 1953. v. 43. 522-526p.
- CHRISTENSEN, H. et al..Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2007. v. 57. 166-178p.

- DICKEY, R.S. *Erwinia chrysanthemi*: a comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. **Phytopathology**, 1979. v. 69. 324-329p.
- GRABERT, E.; BERIAM, L.O.S.; ALMEIDA, I.M. G. 2004. Ocorrência de *Erwinia chrysanthemi* em nolina (*Beaucarnea recurvata* L em.) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, 2004. v. 30. 129p.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **NucleicAcidsSymposium Series**, 1999. v. 41, 95-98p.
- HAUBEN, L. et al. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. Syst. **Appl.Microbiol**, 1998. v. 21. 384-397p.
- HENZ, G.P, & LOPES, C.A. Ocorrência da podridão mole de frutos de abóbora (*Cucurbita moschata*) causada por *Erwiniachrysanthemi*. **Fitopatol.bras**, 2004. v.29.
- HENZ, G.P.; LOPES, C.A. & SANTOS, F.F. 1992. Doenças pós-colheita de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Horticultura brasileira**, 1994. v. 10. 56p.
- HOLT, J.C. et al.. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th. Ed. Baltimore. Williams & Wilkins. 1994
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 1980. v. 16. 111-120p.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment, versão 3.1. **Briefings in Bioinformatics**, 2004. v. 5. 150-163p.
- LELLIOT, R.A. & DICKEY, R.S. Genus VII.*Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buckanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920, 209AL. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. Eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v.1. Gram-

negative Bacteria of General, Medical or Industrial Importance. Baltimore, MD- USA: Williams & Wilkins, 469-76p.

MALAVOLTA JR., V.A.; ALMEIDA, I.M.G. & RODRIGUES NETO, J. Podridão em comigo-ninguém-pode causada por *Erwinia chrysanthemi*, no Brasil. **Summa Phytopathologica**, 1996. v. 22. 66p.

MALAVOLTA JR., V.A.; ALMEIDA, I.M.G. & RODRIGUES NETO, J. Podridão em *Cordyline* sp. causada por *Erwinia chrysanthemi*. Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 100. Campinas, Estado de S. Paulo. 1997. p.63.

MALAVOLTA JR., V.A. et al. Podridão em cenoura e tomate causada por *Erwinia chrysanthemi* pv. *parthenii*. **Summa Phytopathologica**, 1995. v.21. 48p.

MALAVOLTA JR., V.A. et al. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, 2008. v. 34. 9-88p.

MARIANO, R.L.R. et al. 2005. Bactérias fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros *Pectobacterium* E *Dickeya*. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, Recife, vol. 2, p.121-153.

MIYAMOTO, S.Y. et al. 2008. Survival of freeze-dried bacteria. **The Journal of general and Applied Microbiology**. Tokyo, v. 54, n.1, p. 9-24.

MOURA, A.B. et al. Uma nova bacteriose em Orchidaceae incitada por *Erwinia chrysanthemi*. **Fitopatologia brasileira**, 1994. v.19. 274p.

OLIVEIRA, K. Z. 2010. Construção de árvores filogenéticas baseadas em genomas completos. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letter in Applied Microbiology**, 1989. v.8. 151-156p.

- ROBBS, C.F. *Erwinia chrysanthemi*: agente de uma “podridão mole” em cebolinha. **Fitopatologia brasileira**, 1980. v.5. 453p.
- ROBBS, C.F. et al. Bactérias patogênicas a alface produzidas por hidroponia na região Sudeste do Brasil. **Summa Phytopathologica**, 1997. v.23. 70p.
- SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, 1987. v. 4. 406p.
- SAMSON, R. et al. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Brenner et al. 1973) Hauben et al. 1998 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* com. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species: *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, n.4, 1415-1427p. 2004.
- SAMSON, R. & NASSAN-AGHA, N. 1978. Biovars and serovars among strains of *Erwinia chrysanthemy*. IN: *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, 547-553, Edited by M. Ridé. Angers, INRA
- SOLA, M.C. Manutenção de Microrganismos: conservação e viabilidade. 2011. 31 f. Tese (Sanidade, Higiene e Tecnologia de Alimentos). Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2011.
- SUHARJO, R.; SAWADA, H. & TAKIKAWA, Y. 2014. Phylogenetic study of Japanese *Dickeya* spp. and development of new rapid identification methods using PCR-RFLP. **J.GenPlantPathol.** v.80. 237-254p.
- TAKATSU, A.; SANTOS, M.R. DOS & FRANCO, M.M. Colapso do fruto do abacaxi causado por *Erwinia chrysanthemi*. **Fitopatologia brasileira**, 2001. v. 26. 276p.
- TOTH, I.K. et al. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. **Plant Pathology**, 2011. v.60. 385-399p.

VAN DER WOLF, J.M. et al. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). **Int.J.Syst. Evol. Microbiol**, 2014. v.64. 768-774p.

ZIEGLER, D.R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **Int.J.Syst. Evol. Microbiol**, 2003. v.53. 1893-1900p.